

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

Die Bedeutung der NO/cGMP-Signalkaskade für den renalen Blutfluss

Dissertation

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

vorgelegt von
Manuel Johannes Thieme
2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Johannes Stegbauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Christian Heiß

Meinen Eltern

Veröffentlichungen

Originalartikel:

(1)

Thieme M., Sivritas S.H., Mergia E., Potthoff S.A., Yang G., Hering L., Grave K., Hoch H., Rump L.C., Stegbauer J. (2017)

“Phosphodiesterase 5 inhibition ameliorates angiotensin II- dependent hypertension and renal vascular dysfunction”

American Journal of Physiology - Renal Physiology Published 2 March 2017 Vol. 312 no. 3, F474-F481

(2)

Mergia, E.; Thieme, M.; Hoch, H.; Daniil, G.; Hering, L.; Yakoub, M.; Scherbaum, C.R.; Rump, L.C.; Koesling, D.; Stegbauer, J.

“Impact of the NO-Sensitive Guanylyl Cyclase 1 and 2 on Renal Blood Flow and Systemic Blood Pressure in Mice”

International Journal of Molecular Sciences, Published 23 March 2018, 19, 967

Zusammenfassung

Hypertonie ist der bedeutendste Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Niere spielt eine wichtige Rolle für die Pathogenese der Hypertonie, indem sie zum peripheren Widerstand beiträgt und die Salzausscheidung reguliert. Wichtige Stellgröße hierfür ist der renale Blutfluss (RBF), der durch die Angiotensin II (Ang II)-vermittelte renale Vasokonstriktion und die NO/cGMP-vermittelte Vasodilatation reguliert wird. Die lösliche Guanylatcyclyase (sGC) ist der Rezeptor für NO und existiert in den Isoformen GC1 und GC2. Welche Isoform für die Regulation des RBF und den Blutdruck (BP) verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Hier präsentierten GC1-KO Mäuse die geringsten Veränderungen des RBF nach Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME oder exogener Gabe von NO durch GSNO. *In vitro* zeigte sich eine verstärkte Ang II-abhängige renale Vasokonstriktion nur in der GC1-KO Maus, die Expression von sGC in den Nierenarterien von GC1-KO Mäusen war deutlich vermindert. Somit scheint die GC1 hauptverantwortlich für die Regulation des renalen Gefäßtonus und RBF zu sein. Da die renale Durchblutung einen wichtigen Einfluss auf die Blutdruckregulation und Entstehung von Hypertonie ausübt, wurden die analogen Blutdruckveränderungen gemessen. Hier führte die Gabe von GSNO in der GC1-KO-Maus zu einem geringeren Blutdruckabfall als WT, Ang II Gabe resultierte in GC1-KO Mäusen zu höheren BP-Anstiegen als in WT. Dennoch, GC1- und GC2-KO präsentierten einen erhöhten Ruheblutdruck, dessen Ursache vor dem Hintergrund der unveränderten renalen Vasorelaxation *in vitro* und *in vivo* in GC2-KO nicht renaler Ursache zu sein scheint. Zusammenfassend zeigte sich bis hierhin eine vorherrschende Rolle der GC1 für die Regulation der renalen Durchblutung und des BP. Wichtige Regulatoren der NO/cGMP-Signalkaskade sind die Phosphodiesterasen (PDE) 5 und 1, die cGMP inaktivieren und die Vasodilatation hemmen. Die PDEs werden als Teil des Pathomechanismus der Ang II-induzierten Hypertonie diskutiert. Welche PDE maßgeblich die renalen Widerstandsgefäße und den RBF als wichtige Regulatoren des Blutdrucks beeinflussen, ist nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Verbesserung des RBF *in vivo* und der renalen Vasorelaxation *in vitro* in hypertensiven Mäusen nur durch PDE5-Hemmung und widerspricht damit Arbeiten, die der PDE1 einen wichtigen Beitrag zur Regulation der Gefäßfunktion in hypertensiven Bedingungen zuschreiben. Außerdem konnte nur die PDE5-Hemmung den BP senken. Zusammenfassend zeigte sich also ein wesentlicher Beitrag der PDE5 zur Regulation des RBF und des BP. Die Wirkung der PDE5-Hemmung auf die renale Gefäßfunktion und den BP war unter Einfluss von Ang II verstärkt und könnte auf eine mögliche Aktivierung der PDE5 durch Ang II als Teil des Pathomechanismus der Ang II-induzierten Hypertonie hindeuten. Unter der Berücksichtigung der Bedeutung der PDE5 für den RBF sowie einer möglichen Interaktion zwischen PDE5 und Ang II sollte die PDE5-Hemmung als möglicher medikamentöser Therapieansatz gegen Hypertonie in Zukunft nicht aus den Augen verloren werden.

Summary

Hypertension is the leading risk factor for cardiovascular diseases. The kidney plays an outstanding role for the pathogenesis of hypertension by contributing to the peripheral resistance and by regulating the renal salt excretion. The renal blood flow (RBF) depends on the Angiotensin (Ang) II-induced vasoconstriction and on the NO/cGMP-induced vasodilation and has been shown to have an important influence on blood pressure (BP) regulation. The soluble guanylyl cyclase (sGC) is the receptor for NO in the vasculature and exists in two isoforms called GC1 and GC2. It is not known, which isoform exerts mayor influence on RBF and BP. In our study, inhibition of the NO synthase by L-NAME or exogenous application of NO via GSNO showed poorer influence on the changes of RBF in GC1-KO compared to WT and GC2-KO. GC1-KO but not GC2-KO presented an increased Ang II-dependent renal vasoconstriction *in vitro*, furthermore the expression of sGC in renal arteries of GC1-KO mice was markedly reduced compared to WT. Consequently, GC1 seems mainly responsible for the regulation of renal vascular tone and the RBF. Considering the important influence of RBF on BP, we expect GC1 also to contribute dominantly to BP control. Accordingly, application of GSNO resulted in a smaller BP decrease just in GC1-KO and application of Ang II led to higher BP increases in GC1-KO than in WT, but not in GC2-KO. Surprisingly, GC2-KO and GC1-KO presented a higher resting BP than WT. In view of the unaffected RBF and renal vasculature function in GC2-KO, the increased resting BP in GC2-KO does not appear to stem from altered renal hemodynamics. Summarising, GC1 seems being dominantly responsible for the regulation of RBF and BP.

Other important regulators of the NO/cGMP-signalling cascade are the phosphodiesterase (PDE) 5 and 1. They deactivate cGMP, inhibit the vasodilation and are considered to play an important role in the pathogenesis of Ang II-dependent hypertension. Nevertheless, it is not known, which PDE dominantly contributes to the regulation of the renal vasculature, RBF and therefore BP. In the present work, inhibition of PDE5 resulted in increased RBF *in vivo* and enhanced renal vasodilation *in vitro* in hypertensive mice and contradicts therefore studies from others, who considered the PDE1 to be responsible for regulation of vascular function during Ang II dependent hypertension. Furthermore, just the inhibition of PDE5, but not PDE1, decreased BP. We conclude that the PDE5 contributes dominantly to the regulation of RBF and BP. Furthermore, the effects of PDE5-inhibition on renal vasodilation and BP decrease were intensified in conditions of Ang II-treatment and could therefore suggest that an activated state of PDE5 is one pathomechanism for the development of Ang II-dependent hypertension and vascular dysfunction. Having in mind the substantial influence of PDE5 on the regulation of RBF and a possible interaction between Ang II and PDE5, the inhibition of PDE5 should still be considered as a therapeutic approach against hypertension in future.

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	1
Zusammenfassung.....	2
Summary	3
Abbildungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung	8
1.1 Die Rolle der Niere für die Blutdruckregulation.....	8
1.2 Die NO/cGMP-Signalkaskade	9
1.2.1 Die Bedeutung der NO/cGMP-Signalkaskade für den Blutdruck	9
1.2.2 Die lösliche Guanylatcyclase	10
1.2.3 Die Phosphodiesterasen	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Akute Perfusion.....	14
2.1.1 Mäuse	14
2.1.2 Technische Hilfsmittel und Materialien.....	14
2.1.3 Reagenzien und Medikamente	14
2.1.4 Versuchsablauf der akuten Perfusion.....	16
2.1.5 Ang II-Bolus Gabe in der akuten Perfusion ohne Vorbehandlung durch Sildenafil	17
2.1.6 Ang II Bolus Gabe in der akuten Perfusion mit Vorbehandlung durch Sildenafil	17
2.1.7 Inhibition der eNOS durch L-NAME in der akuten Perfusion	17
2.1.8 Gabe von Sildenafil, Vinpocetin und GSNO ohne gleichzeitige Ang II-Infusion in der akuten Perfusion	18
2.1.9 Gabe von Sildenafil, Vinpocetin und GSNO mit gleichzeitiger Ang II-Infusion in der akuten Perfusion	18
2.1.10 Verwendete Medikamente und Substanzen in der akuten Perfusion	18
2.2 Isoliert perfundierte Niere	19
2.2.1 Technische Hilfsmittel und Materialien.....	19
2.2.2 Reagenzien und Medikamente	19
2.2.3 Krebs-Henseleit-Lösung	20

2.2.4	Implantation von osmotischen Minipumpen zur Erzeugung einer Ang II-abhängigen Hypertonie	20
2.2.5	Explantation der Nieren zur Durchführung der isoliert perfundierten Niere	20
2.2.6	Renale Vasokonstriktion durch Ang II in der isoliert perfundierten Niere	21
2.2.7	Renale Endothel-unabhängige Relaxation mit GSNO in der isoliert perfundierten Niere	22
2.3	Western Blot zur Darstellung von GC-β1	22
2.3.1	Materialien	22
2.3.2	Reagenzien und Antikörper.....	22
2.3.3	Organentnahmen	23
2.3.4	Lysieren der Gewebeproben zur Isolierung von GC- β1	23
2.3.5	Gelelektrophorese und Western Blot	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Untersuchung der sGC-Isoformen.....	25
3.1.1	Blutdruck und renaler Blutfluss in Ruhebedingungen	25
3.1.2	Blutdruckmessung nach Inhibition der endothelialen NO-Synthase durch L-NAME in der akuten Perfusion	26
3.1.3	Messung des RBF nach Inhibition der endothelialen NO-Synthase durch L-NAME in der akuten Perfusion.....	27
3.1.4	Blutdruckanstiege durch Ang II in der akuten Perfusion.....	29
3.1.5	Verminderung des RBF durch Ang II in der akuten Perfusion.....	29
3.1.6	Blutdruckverminderung durch GSNO in hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion.....	31
3.1.7	Anstieg des RBF durch GSNO in hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion.....	31
3.1.8	Renale Vasokonstriktion durch Ang II in der isoliert perfundierten Niere	32
3.1.9	Deutlich verminderte Expression der löslichen Guanylatcyclase in der A. renalis von GC1-KO Mäusen.....	33
3.2	Untersuchung der Phosphodiesterasen 5 und 1	35
3.2.1	Blutdruck in Ruhe nach oraler Behandlung mit Sildenafil	35
3.2.2	RBF in Ruhe nach oraler Behandlung mit Sildenafil.....	36
3.2.3	Blutdruckanstiege durch Ang II nach Vorbehandlung mit Sildenafil in der akuten Perfusion.....	37
3.2.4	Verminderung des RBF durch Ang II nach Vorbehandlung mit Sildenafil in der akuten Perfusion.....	37

3.2.5	Veränderung des Blutdrucks durch akute PDE5- oder PDE1-Hemmung in normotensiven Bedingungen in der akuten Perfusion	39
3.2.6	Veränderung des RBF durch akute PDE5- oder PDE1-Hemmung in normotensiven Bedingungen in der akuten Perfusion	39
3.2.7	Veränderung des Blutdrucks durch akute PDE5- oder PDE1-Hemmung in hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion.....	40
3.2.8	Veränderung des RBF durch akute PDE5- oder PDE1-Hemmung in hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion.....	41
3.2.9	Vergleich der PDE5-Wirkung auf den Blutdruck in normotensiven und hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion.....	43
3.2.10	Relaxation der renalen Widerstandsgefäße durch GSNO mit und ohne Sildenafil oder Vinpocetin in der isoliert perfundierten Niere.....	43
4	Diskussion.....	45
4.1	Die Rolle der löslichen Guanylatcylase für die Nierendurchblutung und den Blutdruck.....	45
4.1.1	GC1-KO und GC-2-KO Mäuse präsentieren einen erhöhten Ruheblutdruck	45
4.1.2	Der renale Blutfluss ist maßgeblich von GC1, die Regulation des Blutdrucks hingegen von beiden sGC-Isoformen abhängig	46
4.1.3	Die GC1 ist hauptverantwortlich für die Regulation der renalen Durchblutung und des Blutdrucks unter Einfluss von Ang II.....	47
4.2	Die Rolle der PDE 5 und 1 für die Nierendurchblutung und den Blutdruck	50
	Literaturverzeichnis	55
	Danksagung.....	61

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Die NO/cGMP-Signalkaskade	9
Abb. 1.2	Aktivierungsmechanismus der PDE5	12
Abb. 1.3	Aktivierungsmechanismus der PDE1	13
Abb. 2.1	Schlauchsystem für die Kanülierung der Vena jugularis dextra.....	16
Abb. 2.2	Wirkstoffkonzentrationen für die akute Perfusion.....	18
Abb. 2.3	Versuchsaufbau der isoliert perfundierten Niere	21
Abb. 2.4	Pufferlösungen für die SDS-Gelelektrophorese und den Western Blot.....	24
Abb. 3.1	Ruheblutdruck in WT, GC1-KO und GC2-KO	25
Abb. 3.2	Renaler Blutfluss (RBF) in Ruhebedingungen	26
Abb. 3.3	Blutdruckanstiege nach L-NAME Gabe	27
Abb. 3.4	RBF-Verminderungen nach L-NAME Gabe	28
Abb. 3.5	Blutdruckanstiege durch Ang II.....	29
Abb. 3.6	RBF-Verminderung durch Ang II.....	30
Abb. 3.7	Verminderung des Blutdrucks durch GSNO in hypertensiven Bedingungen...31	
Abb. 3.8	Steigerung des RBF durch GSNO in hypertensiven Bedingungen.....	32
Abb. 3.9	Renale Vasokonstriktion durch Ang II in der isoliert perfundierten Niere.....	33
Abb. 3.10	Darstellung der sGC durch einen Primärantikörper gegen GC- β 1 in der A. renalis von WT und GC1-KO	34
Abb. 3.11	Ruheblutdruck in Mäusen nach oraler Behandlung mit Sildenafil.....	35
Abb. 3.12	RBF in Ruhebedingungen nach oraler Behandlung mit Sildenafil.....	36
Abb. 3.13	Blutdruckanstiege durch Ang II nach oraler Vorbehandlung mit Sildenafil	37
Abb. 3.14	Verminderungen des RBF durch Ang II nach oraler Vorbehandlung mit Sildenafil	38
Abb. 3.15	Blutdruckveränderungen durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) oder PDE1-Hemmung (Vinpocetin) in normotensiven Bedingungen	39
Abb. 3.16	Veränderungen des RBF durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) oder PDE1-Hemmung (Vinpocetin) in normotensiven Bedingungen	40
Abb. 3.17	Blutdruckveränderung durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) oder PDE1-Hemmung (Vinpocetin) in hypertensiven Bedingungen	41
Abb. 3.18	Veränderung des RBF durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) oder PDE1-Hemmung (Vinpocetin) in hypertensiven Bedingungen	42
Abb. 3.19	Vergleich der Blutdruckveränderungen durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) in normotensiven Bedingungen und hypertensiven Bedingungen.....	43
Abb. 3.20	Renale Vasorelaxation in der isoliert perfundierten Niere.....	44

1 Einleitung

1.1 Die Rolle der Niere für die Blutdruckregulation

Hypertonie ist der bedeutendste Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und tritt mit einer Häufigkeit von 25 % weltweit auf. Hypertonie steht dabei eng in Zusammenhang mit der Entstehung von Gefäßdysfunktion und Atherosklerose, die Endorganschäden wie chronische Niereninsuffizienz (1, 2), und chronische Herzinsuffizienz (3, 4) nach sich ziehen.

Die Niere spielt eine zentrale Rolle für die Blutdruckregulation und Pathogenese der chronischen Hypertonie. Jedwede Erhöhung des totalen peripheren Widerstandes durch die Kontraktion der Widerstandsgefäße führt nach dem Ohmschen Gesetz zu einem Blutdruckanstieg. Somit führt zu einer Vasokonstriktion der renalen Widerstandsgefäße, die mit ca. 25 % zum gesamten peripheren Widerstand beitragen, zu einem unmittelbaren Blutdruckanstieg. Zum anderen beeinflusst die Niere durch ihre Modulation der Natrium- und Wasserbilanz den Blutdruck mittelfristig. In diesem Sinne führt eine gesteigerte Natrium- und Wasserretention in der Niere zu einer Erhöhung des Blutdrucks (5, 6). Der renale Gefäßtonus und die Regulation der renalen Salzausscheidung sind dabei eng miteinander verknüpft (7). So konnte gezeigt werden, dass die Ang II-induzierte renale Vasokonstriktion den renalen medullären Blutfluss vermindert und dadurch die renale Natriumexkretion herabsetzt (8, 9).

Der renale Gefäßwiderstand unterliegt der strengen Regulation durch vasokonstriktive und vasodilatative Signalwege. Eine wichtige Bedeutung kommt dem Angiotensin II (Ang II) zu, das als zentraler Metabolit des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) fungiert. Ang II vermittelt über den Angiotensin 1 (AT1)-Rezeptor eine Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen und wirkt somit direkt blutdrucksteigernd (10-12). Die genaue Wirkung von Ang II im renalen Gefäßbett der Niere ist nicht eindeutig geklärt, aktuelle Studien weisen aber auf einen bedeutenden Einfluss der Ang II-Wirkung auf die Nierendurchblutung und Blutdruckeinstellung hin (13, 14). In diesem Zusammenhang untersuchte die Arbeitsgruppe um Crowley et al. (13) die Wirkung des AT1 Rezeptors in der Niere. Es zeigte sich, dass Mäuse, denen der AT1 Rezeptor nur in der Niere fehlt, nach Gabe von Ang II keine Hypertonie entwickelten. In der gleichen Arbeitsgruppe konnte anschließend gezeigt werden, dass insbesondere die Wirkung des Ang II auf die renale Durchblutung über eine Regulation der Salzausscheidung für die Entstehung der Hypertonie verantwortlich ist (11).

Um eine ausgewogene Durchblutung der Nieren aufrecht zu erhalten, bedarf es somit einer Balance zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Signalen.

1.2 Die NO/cGMP-Signalkaskade

1.2.1 Die Bedeutung der NO/cGMP-Signalkaskade für den Blutdruck

Die NO/cGMP-Signalkaskade vermittelt einen starken vasodilatativen Stimulus und kann als einer der bedeutendsten Regulatoren des peripheren Gefäßwiderstandes angesehen werden. Die NO-vermittelte Relaxation glatter Muskelzellen stellt somit eine wichtige Gegenantwort gegen die durch Ang II erzeugte Vasokonstriktion dar. In der Niere nimmt die NO-vermittelte Vasorelaxation aufgrund der Abhängigkeit des Blutdrucks vom renalen Gefäßtonus direkt Einfluss auf die Blutdruckregulation. Eine Dysfunktion der NO/cGMP-Signalkaskade führt zur vaskulären Dysfunktion und trägt zur Pathogenese der arteriellen Hypertonie bei (15-19). Abb. 1.1 schafft einen Überblick über die NO/cGMP-Signalkaskade.

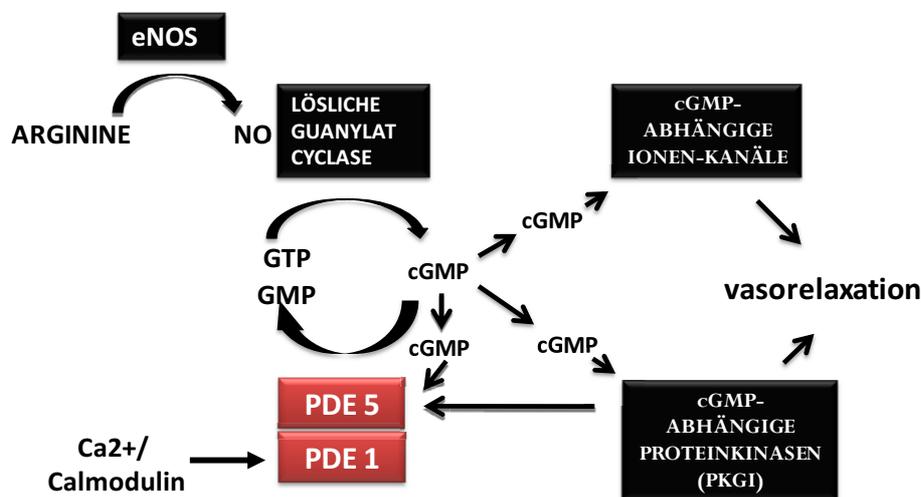


Abb. 1.1 Die NO/cGMP-Signalkaskade

NO aktiviert in glatten Gefäßmuskelzellen die lösliche Guanylatcyclase. Diese produziert cGMP, das seinen Effekt über die Aktivierung von Ionenkanälen, Proteinkinasen und Phosphodiesterasen vermittelt. Wichtiger Mechanismus der Vasodilatation ist die Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration durch Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinasen. Die Phosphodiesterasen hydrolysieren cGMP zu GMP und regulieren dadurch das cGMP-vermittelte Signal.

Quelle: eigene Darstellung

Im Endothel wird NO von der Endothel-spezifischen NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin produziert. NO aktiviert anschließend die lösliche Guanylatcyclase (soluble Guanylylcylcase = sGC), welche die Bildung von zyklischem Guanosinmonosphosphat (cGMP) reguliert. cGMP übt seinen Effekt über cGMP-aktivierte Ionenkanäle (20), cGMP-abhängige Phosphodiesterasen und cGMP-abhängige Proteinkinasen aus (21, 22).

In der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt NO über die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen (PKG1) eine Erniedrigung der zytosolischen Calcium-Konzentration, in

deren Folge es zur Vasorelaxation kommt (23-25). Daraus lässt sich die wichtige Bedeutung der NO/cGMP-abhängigen Vasorelaxation auf den Blutdruck ableiten. Z.B. führt die verminderte Aktivität der eNOS durch pharmakologische Hemmung oder genetischen Knockout zur Entwicklung einer Hypertonie (17, 26, 27). Auch der Knockout der sGC im Gefäßsystem von Mäusen resultiert in der Entstehung einer Hypertonie (15). Eine Dysfunktion der NO/cGMP-Signalkaskade im Gefäßsystem trägt somit zur Entstehung und Aufrechterhaltung von arterieller Hypertonie bei.

1.2.2 Die lösliche Guanylatcyclase

Die lösliche Guanylatcyclase (sGC) ist der einzige Rezeptor für NO und ein Schlüsselenzym der NO/cGMP-Signalkaskade. Die sGC ist ein Heterodimer und setzt sich zusammen aus einer α - und einer β -Untereinheit (28-30). Während die C-terminale Domäne für die katalytische Funktion verantwortlich ist, bindet die N-terminale Domäne eine Häm-Gruppe und ist für die NO-Bindung verantwortlich (31). Die Bindung von NO führt zu einer 200-fachen Steigerung der katalytischen Aktivität der sGC und führt zur Bildung von cGMP aus GTP.

Es existieren zwei Isoformen der sGC, die sich durch die gleiche β -Untereinheit mit jeweils einer unterschiedlichen α -Untereinheit auszeichnen. Die $\alpha 1\beta 1$ -Isoform wird als GC1, die $\alpha 2\beta 1$ -Isoform als GC2 bezeichnet. Bisher konnte kein Unterschied der Enzymaktivität oder Substrat-Affinität der GC1 oder GC2 festgestellt werden (28, 32).

Anhand der Untersuchung von Knockout Mäusen, denen entweder die $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Untereinheit und in dessen Folge die enzymatische Aktivität der GC1 oder GC2 fehlt, konnte der Stellenwert der sGC-Isoformen weiter untersucht werden.

Es zeigte sich, dass beide Isoformen sich deutlich in ihrer organspezifischen Verteilung unterscheiden. Während sich im ZNS äquivalente Expressionsraten von GC1 und GC2 feststellen ließen, scheint in der glatten Gefäßmuskulatur und im Lungengewebe die GC1 als dominante Isoform vorzuliegen (33, 34).

Mäuse, denen beide sGC-Isoformen durch ein Knockout der GC- $\beta 1$ nur in glatten Gefäßmuskelzellen fehlen, entwickeln rasch einen Bluthochdruck (15). Unklar ist jedoch, welchen individuellen Beitrag die beiden sGC-Isoformen im Gefäßsystem zur Blutdruckerhöhung leisten. In glattmuskulären Zellen großer Gefäße wie der Aorta repräsentiert GC1 mit 94 % der Gesamtaktivität der sGC die dominante Isoform (34). Jedoch ist die für die Regulation der kleineren, blutdruckwirksamen Widerstandsgefäße verantwortliche sGC bisher nicht bekannt. Auch der jeweilige Beitrag der beiden sGC-Isoformen zur Regulation der renalen Gefäßfunktion und des renalen Blutflusses ist ungeklärt. Nicht alle Mäuse, denen die GC1 fehlt, entwickeln einen Bluthochdruck. So konnte zwar bei GC1-KO Mäusen des 129S6-Hintergrundes ein Bluthochdruck festgestellt

werden (35), über die Entwicklung eines Bluthochdrucks in GC1-KO Mäusen vor dem C57BL/6-Hintergrund existieren jedoch widersprüchliche Daten (34, 36).

Ziel dieser Arbeit war es, *in vivo* und *ex vivo* gezielt die Bedeutung der sGC-Isoformen auf die renale Gefäßfunktion und die renale Durchblutung, sowie auf den Blutdruck zu untersuchen.

1.2.3 Die Phosphodiesterasen

Neben der sGC nehmen die Phosphodiesterasen (PDE) eine Schlüsselposition innerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade ein. In den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur sind die PDE1, die PDE3 und die PDE5 von Bedeutung (37). Die PDEs hydrolisieren cGMP zu GMP und führen es somit in seine inaktive Form zurück. Dadurch regulieren sie die Aktivität der NO/cGMP-Signalkaskade und nehmen Einfluss auf die Gefäßfunktion. Ein besonderer Stellenwert kommt der PDE 5 zu, die im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus direkt durch cGMP sowie durch cGMP-abhängige Proteinkinasen, insbesondere die Proteinkinase G (PKG), aktiviert wird und das cGMP-Signal terminiert (37-42). Dabei scheint cGMP für die alleinige Aktivierung von PDE5 auszureichen, während die PKG-abhängige Phosphorylierung der PDE5 deren Affinität für cGMP erhöht (21). Neben der PDE5 hat die PDE1 einen bedeutenden Einfluss auf die Gefäßfunktion. Sie wird direkt durch Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexe aktiviert und scheint somit gerade in Bedingungen verstärkter Vasokonstriktion für die Regulation des cGMP-Signals verantwortlich zu sein (43-46). Einen Überblick über die Aktivierungsmechanismen der PDE5 und PDE1 schaffen Abb. 1.2 und Abb. 1.3.

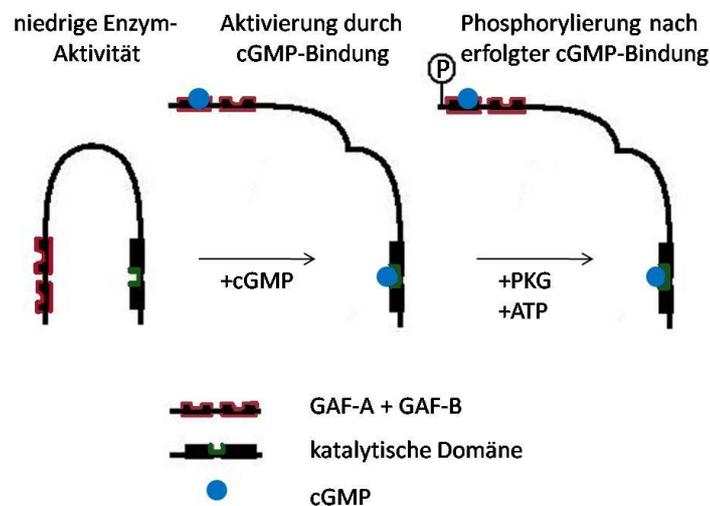


Abb. 1.2 Aktivierungsmechanismus der PDE5

PDE5 wird durch die cGMP Bindung an der GAF-A Domäne aktiviert. Ohne cGMP-Bindung befindet sich die PDE5 in einem inaktivierten Zustand. Nur die aktivierte PDE5 kann durch die PKG phosphoryliert werden, wodurch die Affinität für cGMP erhöht wird.

Quelle: eigene Darstellung nach Vorlage aus (37)

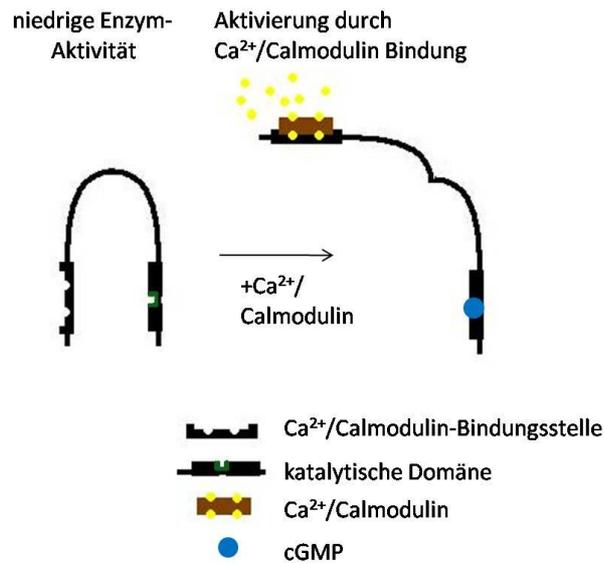


Abb. 1.3 Aktivierungsmechanismus der PDE1

Die Bindung von Ca²⁺/Calmodulin ist notwendig für die Aktivierung der PDE1 und vervielfacht deren Aktivitätslevel um das 3-10 fache, abhängig vom Gewebetyp. Die Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration hebt den Stellenwert der PDE1 für die cGMP-Deaktivierung gerade während kontraktile Aktivität in glatten Muskelzellen hervor.

Quelle: eigene Darstellung

Der Zusammenhang der Aktivität der Phosphodiesterasen mit der Entstehung vaskulärer Dysfunktion und Hypertonie ist Inhalt aktueller Studien (47-50). So wurde eine Aktivierung der PDE1 durch Ang II mit konsekutiver Erhöhung der Kontraktilität großer Gefäße *in vitro* beschrieben (44, 51). Auch gibt es Anhalte für eine Erhöhung der PDE5-Aktivität durch Ang II in der Aorta, in deren Folge die cGMP-abhängige Vasorelaxation gehemmt und die Gefäßfunktion *in vitro* verschlechtert wird (49).

Unklar bleibt, welche PDE vorherrschend zur Regulation der blutdruckwirksamen Widerstandsgefäße in der Ang II-induzierten Hypertonie *in vivo* beiträgt. Auch der Stellenwert der PDEs für die Funktion der renalen Widerstandsgefäße ist bisher nicht eindeutig geklärt. Studien deuten darauf hin, dass *in vitro* die Hemmung der PDE 5 durch Sildenafil die Funktion der renalen Widerstandsgefäße verbessert (36). Ziel der aktuellen Arbeit war, durch selektive Inhibition der PDE5 und PDE1 *in vivo* den individuellen Beitrag der PDEs zur Regulation des renalen Blutflusses und des Blutdrucks während Ang II-induzierter Hypertonie zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Akute Perfusion

2.1.1 Mäuse

Als Versuchstiere wurden Mäuse verwendet, denen entweder die α_1 (C57/BL6; $\alpha_1^{-/-}$ =GC1-KO) oder α_2 -Untereinheit (C57/BL6; $\alpha_2^{-/-}$ =GC2-KO) der löslichen Guanylatcyclase fehlte. Die Mäuse stammen vom C57BL/6 Hintergrund ab und wurden durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Koesling, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ruhr- Universität, Bochum, generiert. Alle Versuche wurden mit der Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter dem Aktenzeichen AZ. 8.87-50.10.34.08.216 durchgeführt.

2.1.2 Technische Hilfsmittel und Materialien

- LabChart Version 5 (ADInstrumente Europe, Oxford, United Kingdom)
- ML866 PowerLab 4/30 Data Acquisition System mit BRIDGE Amp (ADInstruments Europe, Oxford, United Kingdom)
- Transonic TS420 Perivascular Flow Module mit Perivascular Flow Probe (Transonic Systems Inc., Ithaca, USA)
- Polyethylene-Schläuche (Fine Bore) ID 0,28 mm und 0,58 mm (Smiths medical, Grasbrunn, Deutschland)
- Spritzen Injekt 10 ml / Luer Solo; Omnifix-F-Tuberculin (B.Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Kanülen 21 G x 1 1/2“; 27 G x 1/2“; 26 G x 1/2“ (B.Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Silikonschlauch ID=1 und ID=2 mm (VWR, Darmstadt, Deutschland)

2.1.3 Reagenzien und Medikamente

- Angiotensin II human (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Bovines Serum Albumin Protease frei (VWR, Darmstadt)
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Heparin-Rotexmedica 25000 I.E./5ml (Rotexmedica, Trittau, Deutschland)
- Isotonische Kochsalzlösung 0,9 % (B.Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Ketavet (Ketaminhydrochlorid) (Pfizer, New York, USA)
- N-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-Name) (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid) (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)

- Sildenafil 100 mg / Tbl. (Pfizer, New York, USA)
- Sildenafil Pulver (Pfizer, New York, USA)
- Vinpocetin (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- S-Nitrosogluthathione (GSNO) (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)
- N-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochlorid (L-NAME) (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)

2.1.4 Versuchsablauf der akuten Perfusion

Die Operation diente der Schaffung eines intraarteriellen Zugangs zur invasiven Blutdruckmessung, der intravenösen Applikation von Medikamenten sowie der Messung des renalen Blutflusses. Dafür wurden die Versuchsmäuse durch die intraperitoneale Verabreichung einer Xylazin/Ketamin-Narkose betäubt und auf einer 38°C warmen Wärmeplatte platziert. Die Dosierung der Narkotika betrug Xylazin 5 mg/kg Körpergewicht und Ketamin 100 mg/kg Körpergewicht. Es wurde ein ventraler sagittaler Hautschnitt vom Mandibulum bis zum Sternum gesetzt. Durch Präparation der Glandula submandibularis und der zervikalen Muskelschicht wurde freie Sicht auf die A. carotis communis dextra (ACCD) geschaffen und diese vom begleitenden Nervus vagus dextra getrennt. Der Blutfluss der ACCD nach kranial wurde durch eine Ligatur unterbrochen. Nach Setzen einer Gefäßklemme wurde die ACCD mit einem Polyethylenschlauch kanüliert, der mit dem System zur Messung des Blutdrucks verbunden war. Nach Öffnen der Klemme konnte der Blutdruck invasiv über LabChart5 gemessen werden.

Nach Kanülierung der ACCD wurde die Vena jugularis interna dextra (VJD) vom umliegenden Bindegewebe getrennt. Durch Setzen von Ligaturen wurde der kraniale und dorsale Zufluss des venösen Blutes unterbunden. Anschließend wurde die VJD mit einem Polyethylenschlauch kanüliert und zur Vermeidung einer Thrombus-Bildung die Infusion einer isotonischen Kochsalz-Lösung (0,32 ml/KG min/) begonnen.

Alternativ zur einfachen Kanülierung der VJD konnten zwei Polyethylenschläuche in die Vene platziert werden. Dies ermöglichte die gleichzeitige und voneinander unabhängige Gabe zweier unterschiedlicher Wirkstoffe. Die Wirkstoff-Gabe erfolgte in das zur Injektionszwecken vorgesehene Mittelstück des Schlauchsystems (Abb. 2.1). Vor jedem Versuch wurde das Schlauchsystem mit einer 1%BSA-Lösung gespült

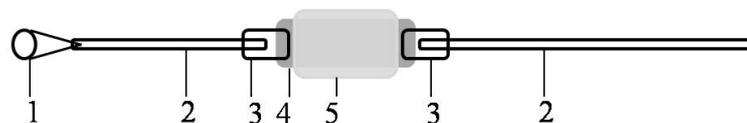


Abb. 2.1 Schlauchsystem für die Kanülierung der Vena jugularis dextra

(1) Kanüle 27 G; (2) Polythene-Tube ID 0,28 mm; (3) Polythene-Tube ID 0,58 mm; (4) Silikonschlauch ID 1 mm; (5) Silikonschlauch ID 2 mm. Die Injektion von Medikamenten erfolgt in den Silikonschlauch (5).

Quelle: eigene Darstellung

Nach Abschluss der Kanülierung der ACCD und VJD wurde das Versuchstier um die eigene Längsachse auf den Bauch gedreht. Ein Hautschnitt wurde links paravertebral im Bereich über der linken Niere gesetzt und die Haut von der Muskelfaszie getrennt. Nach

Lateralisierung der Muskulatur wurde die Capsula adiposa renis weitgehend entfernt. Die linke Niere wurde aus dem Körper exponiert. Es folgte die Entfernung der Capsula fibrosa renis und Exposition der A. und V. renalis. Nach Trennung der Arterie von der Vene wurde eine Ultraschall-Sonde (Perivascular Flow Probe) um die A. renalis gelegt. Die Wundhöhle wurde zur Verbesserung der Messqualität mit Kochsalzlösung gefüllt und die Niere wieder ins Retroperitoneum reponiert.

2.1.5 Ang II-Bolus Gabe in der akuten Perfusion ohne Vorbehandlung durch Sildenafil

Nach Stabilisierung des Blutdrucks und des renalen Blutflusses wurde Angiotensin II als Bolus in aufsteigender Dosis appliziert. Vor jeder weiteren Bolus-Gabe wurde die Stabilisierung des Blutdrucks und renalen Blutflusses auf Baseline-Niveau abgewartet. Die Blutdruckanstiege bzw. Verminderungen des renalen Blutflusses nach Ang II-Gabe wurden als Abweichung von der jeweiligen Baseline ausgewertet und in Δ mmHg bzw. Δ ml/min angegeben. Die Versuche wurden in C57Bl/6-Wildtyp-, GC1-KO- und GC2-KO-Mäusen durchgeführt.

2.1.6 Ang II Bolus Gabe in der akuten Perfusion mit Vorbehandlung durch Sildenafil

Mäuse wurden einer oralen Behandlung mit Sildenafil, einem selektiven PDE5-Inhibitor, unterzogen. Dafür wurde Sildenafil in angesäuertem Trinkwasser (pH 3) gelöst. Die Wirkstoffkonzentration betrug 400 mg Sildenafil/L H₂O. Bei einer durchschnittlichen Trinkwasser-Aufnahme von 0,2 L/kg Maus/Tag wurde eine geschätzte Wirkstoffaufnahme von 80 mg Sildenafil/kg/Tag erreicht (52). Nach fünf Tagen der oralen Behandlung mit Sildenafil wurde die Dosis-Wirkungs-Kurve für den Blutdruck und renalen Blutfluss durch Angiotensin II durchgeführt. Es wurden ausschließlich C57BL/6-Wildtyp-Mäuse verwendet.

2.1.7 Inhibition der eNOS durch L-NAME in der akuten Perfusion

Nach Stabilisierung des Blutdrucks und renalen Blutflusses wurde N-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), ein unspezifischer NO-Synthase-Inhibitor, als einmaliger Bolus verabreicht (32 mg/kg KG). Veränderungen des Blutdrucks und des renalen Blutflusses wurden als Abweichung von der jeweiligen Baseline ausgewertet. Die Versuche wurden in C57BL/6-Wildtyp, GC1-KO- und GC2-KO Mäusen durchgeführt.

2.1.8 Gabe von Sildenafil, Vinpocetin und GSNO ohne gleichzeitige Ang II-Infusion in der akuten Perfusion

Nach Stabilisierung des Blutdrucks und des renalen Blutflusses wurden Sildenafil, Vinpocetin, ein spezifischer PDE1-Hemmer, und GSNO, ein NO-Donor, als Bolus in aufsteigenden Konzentrationen appliziert. Zur Vergleichbarkeit wurde Sildenafil und Vinpocetin jeweils in äquivalenten Dosierungen verwendet. Vor jeder Bolus-Gabe wurde die Stabilisierung des Blutdrucks und des renalen Blutflusses auf einem Baseline-Niveau abgewartet. Die Versuche mit den PDE-Hemmern wurden in C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen, die Versuche mit GSNO in C57Bl/6-Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO-Mäusen durchgeführt.

2.1.9 Gabe von Sildenafil, Vinpocetin und GSNO mit gleichzeitiger Ang II-Infusion in der akuten Perfusion

Durch kontinuierliche Infusion mit Ang II (200 ng/kg/min) wurde ein Bluthochdruck-Plateau erzeugt. Anschließend wurden Sildenafil, Vinpocetin, oder GSNO als Bolus in aufsteigenden Konzentrationen appliziert. Auch hier wurden Sildenafil und Vinpocetin in äquivalenter Dosierung verwendet. Die Veränderungen des Blutdrucks und des renalen Blutflusses wurden als Abweichung von der jeweiligen Baseline ausgewertet. Die Versuche mit den PDE-Hemmern wurden in WT-Mäusen, die Versuche mit GSNO in GC1-KO, GC2-KO und WT durchgeführt.

2.1.10 Verwendete Medikamente und Substanzen in der akuten Perfusion

Abb. 2.2 zeigt alle in der akuten Perfusion verwendeten Wirkstoffe inklusive Dosierung. Bolus-Applikationen erfolgten immer als 30 µL Bolus des Wirkstoffes plus 30 µL Bolus Kochsalzlösung zur Spülung des Schlauchsystems.

Wirkstoff	Wirkstoffkonzentration/kg/KG	Lösungsmittel
Ang II	1,2 ng, 3,6ng, 12,5ng, 37,5ng, 125,5ng, 376,5ng, 1,2 µg	NaCl 0,9 %
Sildenafil	0,8 µg, 8 µg, 80 µg, 800 µg	DMSO, NaCl 0,9 %
Vinpocetin	0,8 µg, 8 µg, 80 µg, 800 µg	DMSO, NaCl 0,9 %
GSNO	0,01 mg, 0,1 mg bis 1,0 mg	NaCl 0,9 %
L-NAME	32,3 mg	NaCl 0,9 %

Abb. 2.2 Wirkstoffkonzentrationen für die akute Perfusion

Quelle: eigene Darstellung

2.2 Isoliert perfundierte Niere

2.2.1 Technische Hilfsmittel und Materialien

- Julabo UC-5B/3 Umwälzthermostat mit Bad / Temperierbecken (Julabo, Seelbach, Deutschland)
- Minipuls 2 Peristaltische Pumpe (Gilson Inc., Middleton, Vereinigte Staaten)
- ML866 PowerLab 4/30 Data Acquisition System mit BRIDGE Amp (ADInstruments Europe, Oxford, United Kingdom)
- LabChart Version 5 (ADInstrumente Europe, Oxford, United Kingdom)
- Blood FlowMeter (ADInstruments Europe, Oxford, United Kingdom)
- Fine Bore Polythene Schlauch ID 0,28 und 0,58 mm, AD 0,96 mm (Smiths medical, Grasbrunn, Deutschland)
- Injekt 10 ml / Luer Solo, Omnifix-F Tuberculin (B.Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Kanülen 21 G x 1 1/2“, 23G x 1“, 26 G x 1/2“, 27 G x 1/2“ (B.Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Silikonschlauch ID=1 mm, ID=1,52 und ID=2 mm (VWR, Darmstadt, Deutschland)
- Sterilfilter Filtropur S 0,45 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Verbindungsstück mit Injektionsport Luer Lock (B.Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Combifix Adapter Luer (B.Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Osmotische Minipumpen Alzet Model 1002 (Durect Corp., Cupertino, USA)

2.2.2 Reagenzien und Medikamente

- Angiotensin II human >93% (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- S-Nitrosogluthathione (GSNO) (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)
- Corticosteron (Calbiochem/Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- (-)-Noradrenalin (=Norepinephrin) (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- N-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochlorid (L-NAME) (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)
- Diclofenac (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Bovines Serum Albumin Protease frei (VWR, Darmstadt, Deutschland)
- D-Glucose monohydrate (Fluka, St.Gallen, Schweiz)
- Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumhydrogenphosphat (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)
- Kalziumchlorid (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- L (+)-Ascorbinsäure (Riedel-deHaen, Seelze, Deutschland)
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

- Natriumchlorid (Applichem, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumhydrogencarbonat (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)
- S-Nitrosogluthathione (GSNO) (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)
- Titriplex III (EDTA) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.2.3 Krebs-Henseleit-Lösung

Für die Perfusion der isolierten Nieren wurde Krebs-Henseleit-Lösung verwendet. Diese setzte sich zusammen aus NaCl (118 mM/L), KCL (4,7 mM/L), MgSO₄ (0,45 mM/L), NaHCO₃ (25 mM/L), KH₂PO₄ (1,03 mM/L), Glucose (11,1 mM/L), CaCl₂ (2,5 mM/L), EDTA (0,067 mM/L) und Ascorbinsäure (0,07 mM/L). Die Lösung wurde auf 37 °C aufgewärmt und mit Sauerstoff (Carbogen) angereichert.

2.2.4 Implantation von osmotischen Minipumpen zur Erzeugung einer Ang II-abhängigen Hypertonie

Mäuse wurden durch intraperitoneale Gabe von Ketamin 100 mg/kg und Xylazin 5 mg/kg anästhesiert. Nach ausführlicher und zeitgerechter Desinfektion wurde ein ca. 0,5 cm linksseitiger Flankenschnitt durchgeführt. Anschließend erfolgte die stumpfe Präparation einer ca. 3-4 cm tiefen subkutanen Tasche, in die eine mit Ang II gefüllte Minipumpe (500 ng/kg/min) gesteckt wurde. Nach Platzieren der Pumpe wurde die Tasche wieder zugenäht. Die Tiere wurden nach der Operation beobachtet und am ersten Tag nach der Operation mit einem langwirksamen Analgetikum (Carprofen 5mg/kg s.c) behandelt. 14 Tage nach Implantation der osmotischen Pumpen wurden die Tiere euthanasiert und die Nieren zur Durchführung der der isoliert perfundierten Niere (siehe 2.2.5) entnommen. Für die Versuche wurden C57BL/6-Wildtyp-Mäuse verwendet.

2.2.5 Explantation der Nieren zur Durchführung der isoliert perfundierten Niere

Unter ausreichender Narkose und anschließender Euthanasie wurde bei dem Versuchstier eine mediane Laparotomie durchgeführt und die Aorta abdominalis unterhalb des Abgangs der A. renalis sinister mit einem Polyethylenschlauch kanüliert. Die Bauchorgane wurden daraufhin mit einer auf 37 °C erwärmten und oxygenierten Krebs-Henseleit-Lösung gespült. Die Capsula fibrosa der rechten Niere wurde entfernt und der Ureter dextra durchschnitten. Es erfolgte die Kanülierung der A. renalis dextra mit einem Polyethylenschlauch. Anschließend wurde die Niere aus dem Situs entfernt und mit einer kontinuierlichen Laufrate der Krebs-Henseleit-Lösung gespült. Die linke Niere wurde analog zur rechten durch eine Kanülierung der A. renalis sinister über den kranialen Anteil der Aorta aus dem Situs entfernt und ebenfalls an das Perfusionssystem angeschlossen.

Der Versuchsaufbau diente dazu, die Vasokonstriktion und Vasorelaxation der Nieren *ex vivo* zu untersuchen. Die Veränderung des Tonus der renalen Widerstandsgefäße nach Gabe von Vasokonstriktiva oder Vasodilativa konnte als Veränderung des Systemdrucks gemessen werden. Abb. 2.3 zeigt den Aufbau der isoliert perfundierten Niere.

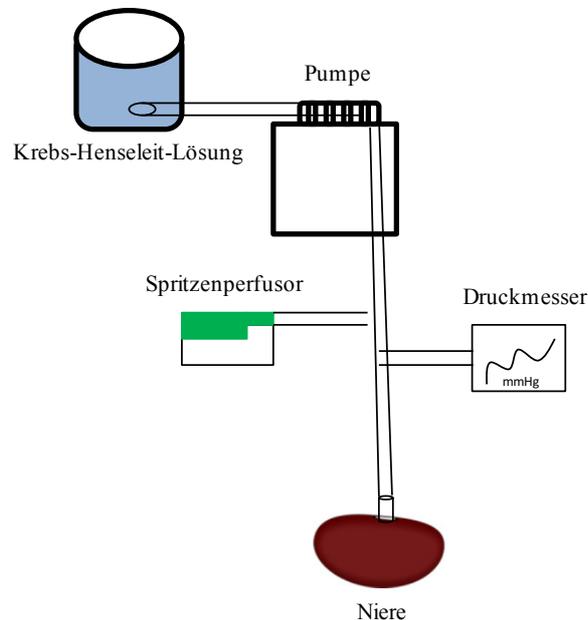


Abb. 2.3 Versuchsaufbau der isoliert perfundierten Niere

Oxygenierte Krebs-Henseleit-Lösung wird über eine Pumpe (Laufrate = 7,25 ml/min/g Niere) durch ein blasenfreies Schlauchsystem in die A. renalis geleitet. Über ein Verbindungsstück (nicht dargestellt) wird das Schlauchsystem mit einem Druckmesser und einer Perfusor-Spritze verbunden. Die Änderung des Tonus der renalen Widerstandsgefäße nach Gabe von Vasokonstriktiva oder Vasodilativa führt zu Druckänderungen im System. Die Niere befindet sich in einem Behälter mit Umgebungstemperatur von ca. 37°C (nicht dargestellt).

Quelle: eigene Darstellung

2.2.6 Renale Vasokonstriktion durch Ang II in der isoliert perfundierten Niere

Nach einer 30-minütigen Stabilisierungsphase der Nieren im Versuchsapparat wurden die renalen Widerstandsgefäße einmalig mit KCL (60mM) vorkontrahiert. Nach erneuter ca. 30-minütiger Druckstabilisierung wurden die Nieren mit Ang II (Laufrate = 0,158 ml/min) in aufsteigender Konzentration ($1e^{-11}$; $3e^{-11}$; $1e^{-10}$; $3e^{-10}$; $1e^{-9}$; $3e^{-9}$; $1e^{-8}$ [molar]) durchspült. Vor jeder Steigerung der Konzentration wurde die Ausbildung eines konstanten Druckniveaus abgewartet. Die renale Druckantwort wurde als relative Änderung des gemessenen Systemdrucks in Bezug zur Baseline berechnet. Für die Versuche wurden C57Bl/6-Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO Mäuse verwendet.

2.2.7 Renale Endothel-unabhängige Relaxation mit GSNO in der isoliert perfundierten Niere

Die Nieren wurden in der isoliert perfundierten Niere mit KCL (60mM) vorkontrahiert. Anschließend wurden Sildenafil (300 nM) oder Vinpocetin (10 μ M) der Krebs-Henseleit-Lösung hinzugefügt. Danach wurde mit Noradrenalin (1 μ M) eine Vasokonstriktion der renalen Widerstandsgefäße durchgeführt. Nach Erreichen eines stabilen erhöhten Druckniveaus wurde GSNO in aufsteigender Konzentration ($1e^{-8}$; $3e^{-8}$; $1e^{-7}$; $3e^{-7}$; $1e^{-6}$; $3e^{-6}$; $1e^{-5}$; $3e^{-5}$ [molar]) über den Perfusor appliziert und dadurch eine renale Relaxation herbeigeführt. Der Wechsel zur nächsthöheren Konzentration fand in zweiminütigen Abständen statt. In der Auswertung wurden die durch GSNO erzeugten Drucksenkungen auf das Delta des Noradrenalin- induzierten Druckanstiegs bezogen. Die Versuche wurden in Anwesenheit von L-NAME (300 μ M) und Diclofenac (3 μ M) in der Krebs-Henseleit-Lösung durchgeführt. Für die Versuche wurden C57Bl/6 Wildtyp-Mäuse nach 14 tägiger Behandlung mit Ang II Minipumpen und unbehandelte Kontrolltiere verwendet.

2.3 Western Blot zur Darstellung von GC- β 1

2.3.1 Materialien

- Fine Bore Polyethylene (Polythene) Schlauch ID 0,28 mm, AD 0,61 mm (Smiths medical, Grasbrunn, Deutschland)
- Polyethylene-Schläuche (Fine Bore) ID 0,28 mm und 0,58 mm (Smiths medical, Grasbrunn, Deutschland)
- Spritzen Injekt 10 ml / Luer Solo (B.Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Kanülen 21 G x 1 1/2“; 27 G x 1/2“; 26 G x 1/2“ (B.Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- LN2 (bereitgestellt von Linde, München, Deutschland)
- Bradford Reagenz (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)

2.3.2 Reagenzien und Antikörper

- Dulbeccos PBS (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Complete Mini (Merck, Mannheim, Deutschland)
- Dithiothreitol (DTT) (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Triethanolamin hydrochlorid (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Natriumchlorid (Applichem, Darmstadt, Deutschland)
- Titriplex III (EDTA) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- APS 10 % (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Bovines Serum Albumin Protease frei (VWR, Darmstadt, Deutschland)

- Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Hybri-Max (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Glycine p.A (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Laemmli 4x Puffer (eigene Herstellung)
- Methanol p.A. zur Analyse (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Sodium Chloride Molecular biology grade (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Sodium dodecyl Sulfat (SDS) (Biomol, Hamburg, Deutschland)
- Temed (99% p.a. für Elektrophorese) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris Pufferan >99,9% p.a. (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Trizma hydrochloride (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Tween 20 (Polysorbat) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Rotipuran “Roti-Block” 30 % (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- $\beta 1_1$ Antikörper (hergestellt durch das Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum, Referenz siehe (34))
- ECL-Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey) (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK)

2.3.3 Organentnahmen

Unter ausreichender Narkose wurden die Versuchstiere euthanasiert. Anschließend wurde die Aorta abdominalis freigelegt, mit einem Polyethylenschlauch kanüliert und die Bauchorgane mit eiskaltem PBS durchspült. Nach Auswaschen des Blutes wurden Nierecortex, Nierenmedulla, Aorta und Aa. renales entnommen und schockgefroren. Zur Organentnahme wurden C57BL/6-Wildtyp, GC1-KO- und GC2-KO-Mäuse verwendet.

2.3.4 Lysieren der Gewebeproben zur Isolierung von GC- $\beta 1$

Für die Aufbereitung des Gewebes zur Isolierung von GC- $\beta 1$ wurde ein vorbeschriebener Puffer (34) verwendet. Der Puffer war zusammengesetzt aus Triethanolamin/HCT (50 mM), NaCl (50 mM), EDTA (1 mM) und DTT (2 mM), PMSF (4,4 $\mu\text{L}/\text{ml}$ Lysis Puffer) und Complete mini (1 Tbl/10 ml Lysis Puffer). Der pH-Wert wurde auf 7,4 bei 4°C titriert.

Etwa gleichgroße Teile der schockgefrorenen Organproben wurden in 250 – 300 μL Lysispuffer mit frisch zugesetztem DTT (2 mM) und PMSF (4,4 $\mu\text{L}/\text{ml}$) gegeben. Das Gewebe wurde anschließend mit dem Glaspotter bei 900 U/min für 30 Sekunden im Eisbad zerkleinert und 30 Minuten auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Zentrifugierung der Cortex-Homogenate für 10 Minuten bei 800 G und 4°C, renale Medulla und Aorta wurden nicht zentrifugiert. Der Überstand der Cortex-Proben und das Homogenat der

Proben von Medulla und Aorta wurde mit 4xLämmli/DTT versetzt und für die Gel-Elektrophorese verwendet.

2.3.5 Gelelektrophorese und Western Blot

Die Sodiumdodecylsulfat (SDS) -Gelelektrophorese diente der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in den Gewebeproben nach Molekülgröße. Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Bradford-Methode kolorimetrisch bestimmt. Anschließend wurden die mit 4xLaemmli/DTT versetzten Gewebslysate ungekocht in das Sammelgel gegeben. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 70 V für ca. 1,5 Stunden in einem 7,5 % SDS-Gel, das Blotten auf die Nitrocellulosemembran bei 250 mA für eine Stunde. Zur Blockung der Membran wurde Rotiblock für 30 Minuten bei Raumtemperatur verwendet. Die Darstellung des GC- β 1 erfolgte anhand des β 1_1 Antikörper in einer Verdünnung von 1/25.000 in einer 3 % Ovalbumin-Lösung und einer Inkubation bei 4°C über Nacht. Als Sekundärantikörper wurde ECL-IgG Anti-Rabbit in einer Verdünnung von 1/500 verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit Pierce ECL Western Blotting Substrate („Super ECL“) bei einer Belichtungszeit von 30 Sekunden. Abb. 2.4 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer/Gel	Reagenzien
Sammelgel	Tris HCL 0,2384 M, Tris Base 0,0078 M, SDS 0,0067 M, APS 0,00518 M, Temed 0,147 %
Trenngel 10% Acrylamid	Rotiphorese (Acrylamid) 10 %, Tris HCL 0,177 M, Tris Base 0,563 M, SDS 0,0068 M, APS 0,00433 M, Temed 0,164 %
Transferpuffer für Western Blot	Tris Base 0,03 M, Glycin 0,24 M, Methanol 20 %
Laufpuffer für SDS-Page	Glycin 0,19 M, Tris Base 0,023 M, SDS 0,0034 M
Proteinwaschpuffer für Western Blot	Tween 20 0,0014 M, Tris-HCL 0,012 M, NaCl 0,128 M

Abb. 2.4 Pufferlösungen für die SDS-Gelelektrophorese und den Western Blot

Quelle: eigene Darstellung

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der sGC-Isoformen

3.1.1 Blutdruck und renaler Blutfluss in Ruhebedingungen

Der Blutdruck von narkotisierten C57BL/6-Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO Mäusen wurde in Ruhebedingungen gemessen. Als Messzeitpunkt wurden der initial gemessene Blutdruck nach Kanülierung der A. carotis dextra, sowie der Zeitpunkt nach Platzieren der Ultraschallsonde um die A. renalis sinister und Stabilisierung des Blutdrucks und renalen Blutflusses gewählt. Den Mäusen war eine an das Körpergewicht adaptierte Menge einer Ketamin/Xylazin-Narkose intraperitoneal appliziert worden (siehe 2.1.4).

GC1-KO als auch die GC2-KO Mäuse zeigten zu beiden Messzeitpunkten einen signifikant höheren Ruheblutdruck als WT (Abb. 3.1).

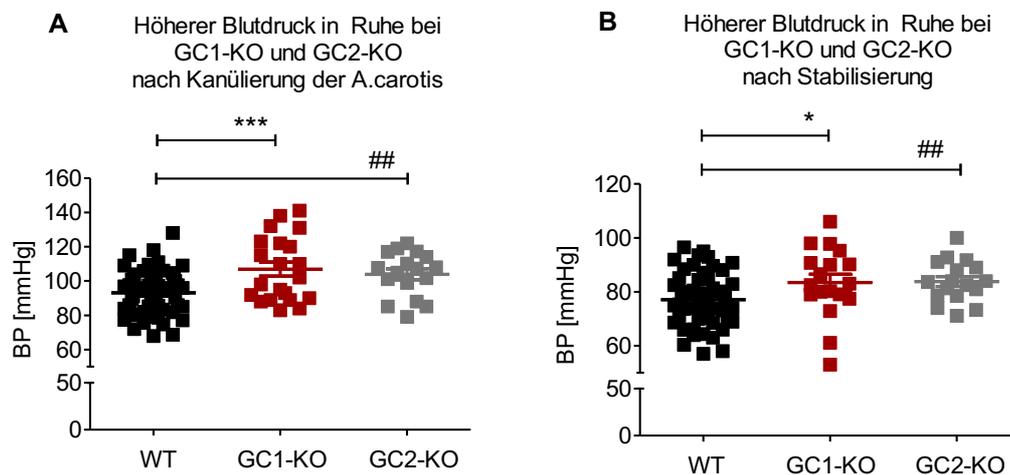


Abb. 3.1 Ruheblutdruck in WT, GC1-KO und GC2-KO

Ruheblutdruck nach gewichtsadaptierter Gabe von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) zum Zeitpunkt nach Kanülierung der A. carotis dextra (A) und nach abgeschlossener Operation (B). Dargestellt sind die Mittelwerte der Blutdrücke mit Standardfehlern von WT (n=5), GC1-KO (n=13) und GC2-KO (n=10). *** p < 0,001, * p < 0,05 GC1-KO vs. WT; ## p < 0,01 GC2-KO vs. WT; student's unpaired t-test

Quelle: eigene Darstellung

Der renale Blutfluss (RBF) von narkotisierten C57BL/6-Wiltyp, GC1-KO und GC2-KO Mäusen wurde nach Platzieren der Ultraschallsonde um die A. renalis und Stabilisierung des renalen Blutflusses auf ein stabiles Niveau gemessen. Trotz eines signifikanten Unterschieds des Blutdrucks zeigte sich kein Unterschied des renalen Blutflusses zwischen GC1-KO, GC2-KO und WT in Ruhebedingungen (Abb. 3.2).

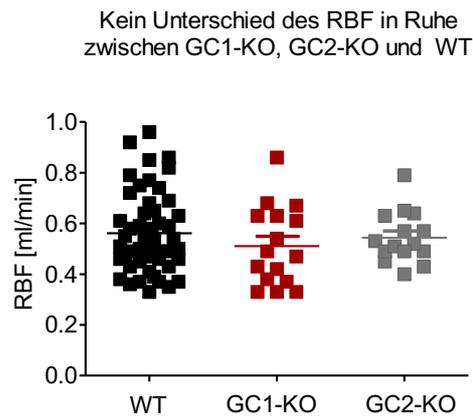


Abb. 3.2 Renaler Blutfluss (RBF) in Ruhebedingungen

RBF nach gewichtsadaptierter Gabe von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) zum Zeitpunkt nach Platzieren der Ultraschallsonde um die A. renalis. Dargestellt sind die Mittelwerte der renalen Blutflüsse mit Standardfehlern von WT (n=52), GC1-KO (n=16) und GC2-KO (n=15). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Quelle: eigene Darstellung

3.1.2 Blutdruckmessung nach Inhibition der endothelialen NO-Synthase durch L-NAME in der akuten Perfusion

NO wird durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) im Endothel produziert. Durch Inhibition von eNOS kommt es zu einer verminderten Bildung von NO und somit zur abgeschwächten cGMP-abhängigen Vasorelaxation der Widerstandsgefäße. Wir verglichen den Effekt der eNOS Inhibition durch den unspezifischen NO-Synthase-Inhibitor L-Arginine-Methyl-Ester (L-NAME) auf den Blutdruck in C57BL/6-Wildtyp, GC1-KO, GC2-KO-Mäusen.

GC1-KO Mäuse zeigten einen signifikant geringeren absoluten Blutdruckanstieg als WT und GC2-KO. Der Unterschied zwischen GC1-KO und WT war mitunter dem erhöhten Ruheblutdruck in GC1-KO geschuldet, weshalb zusätzlich der relative Blutdruckanstieg ermittelt wurde. Dieser war in GC1-KO und in GC2-KO gegenüber WT vermindert, signifikant am geringsten jedoch in GC1-KO (Abb.3.3).

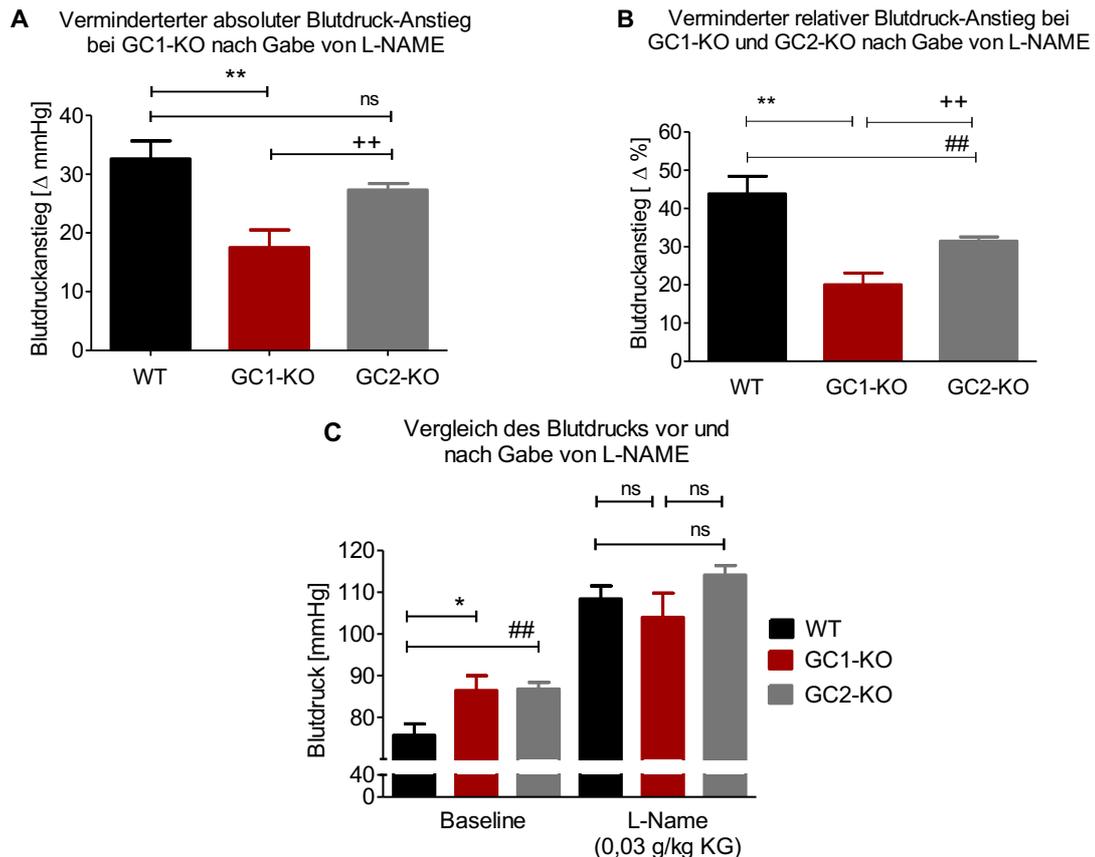


Abb. 3.3 Blutdruckanstiege nach L-NAME Gabe

Absoluter Blutdruckanstieg (A), Blutdruckspitzen (C) und relativer Blutdruckanstieg (B) nach NOS-Inhibition durch L-NAME (0,03 g/kg). Nach Platzieren der Ultraschallsonde um die A. renalis wurde die Ausbildung eines stabilen Blutdruckniveaus und Stabilisierung des RBF abgewartet. Anschließend wurde L-NAME als Bolus verabreicht. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Blutdruckanstiege nach Gabe von L-NAME in GC1-KO (n=5), GC2-KO (n=7) und WT (n=9). ** p < 0,01, * p < 0,05 GC1-KO vs. WT; ## p < 0,01 GC2-KO vs. WT; ++ p < 0,01 GC2-KO vs. GC1-KO; Student's unpaired t-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.1.3 Messung des RBF nach Inhibition der endothelialen NO-Synthase durch L-NAME in der akuten Perfusion

Eine eNOS-Inhibition führt auch in der A. renalis über eine Verminderung der NO-Produktion zu einer abgeschwächten Vasorelaxation und somit Reduktion des renalen Blutflusses. Neben dem in Abb. 3.3 dargestellten Blutdruckanstieg präsentierten alle drei Mausgruppen eine Verminderung des renalen Blutflusses nach NOS-Inhibition durch L-NAME Gabe. GC1-KO zeigte dabei eine geringere absolute Verminderung des RBF als GC2-KO, sowie eine geringere relative Verminderung als WT und GC2-KO. GC2-KO präsentierte eine stärkere Verminderung des renalen Blutflusses als WT. Die Ergebnisse deuten auf einen geringeren Effekt der NOS-Inhibition in GC1-KO hin (Abb.3.4).

3 Ergebnisse

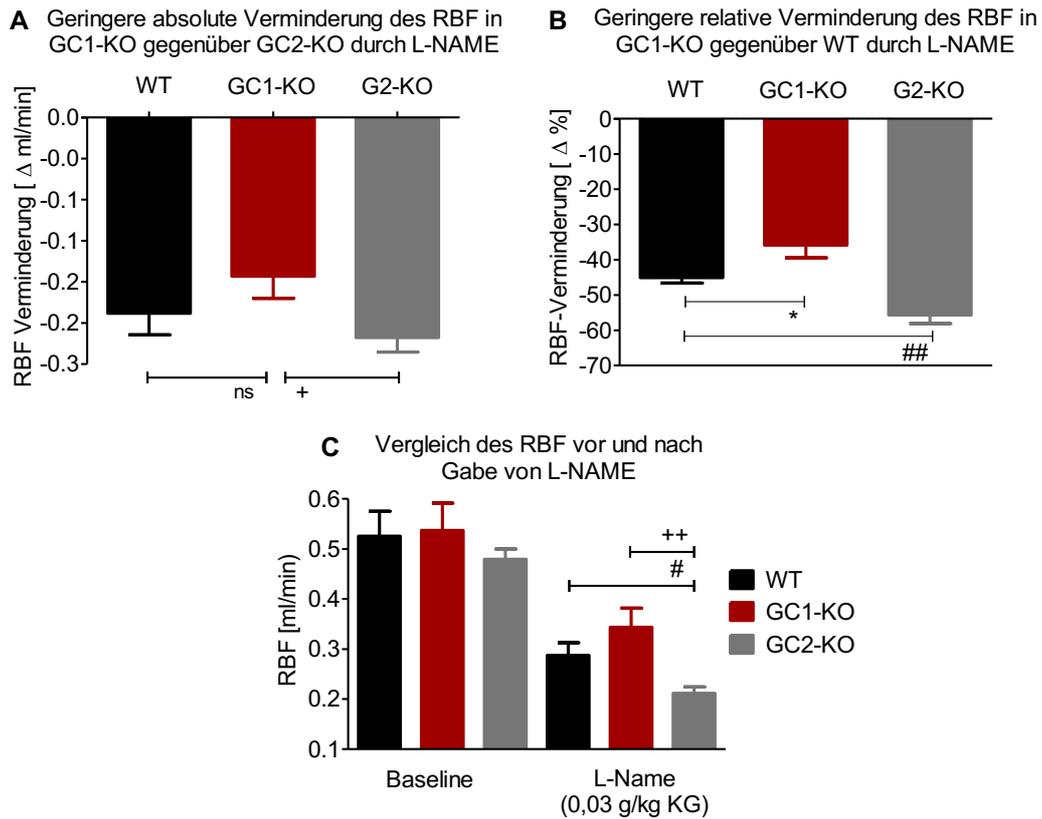


Abb. 3.4 RBF-Verminderungen nach L-NAME Gabe

Absolute Verminderungen des RBF (A), Absolutwerte des RBF (C) und relative Verminderung des RBF (B) nach NOS-Inhibition durch L-Name (0,03 g/kg). Nach Platzieren der Ultraschallsonde um die A. renalis und Stabilisierung des Blutdrucks und RBF wurde L-NAME als Bolus verabreicht. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Verminderung des RBF in GC1-KO (n=4), GC2-KO (n=6) und WT (n=7). * $p < 0,05$ GC1-KO vs. WT; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ GC2-KO vs. WT; ++ $p < 0,01$, + $p < 0,05$ GC2-KO vs. GC1-KO, Student's unpaired t-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.1.4 Blutdruckanstiege durch Ang II in der akuten Perfusion

Ang II bewirkt über den AT1-Rezeptor eine Vasokonstriktion und führt somit über eine Erhöhung des peripheren Widerstands zu einem Blutdruckanstieg. Der Vasokonstriktion wirkt die NO-vermittelte Vasodilatation entgegen und bestimmt dadurch den Schweregrad der Blutdruckerhöhung. Wir untersuchten den Einfluss der sGC-Isoformen auf den systemischen Blutdruck während akuter Ang II- abhängiger Vasokonstriktion. Dabei zeigten sich die Blutdruckanstiege sowie die Blutdruckspitzen in GC1-KO gegenüber WT erhöht. Es bestand kein Unterschied zwischen GC2-KO und WT (Abb. 3.5).

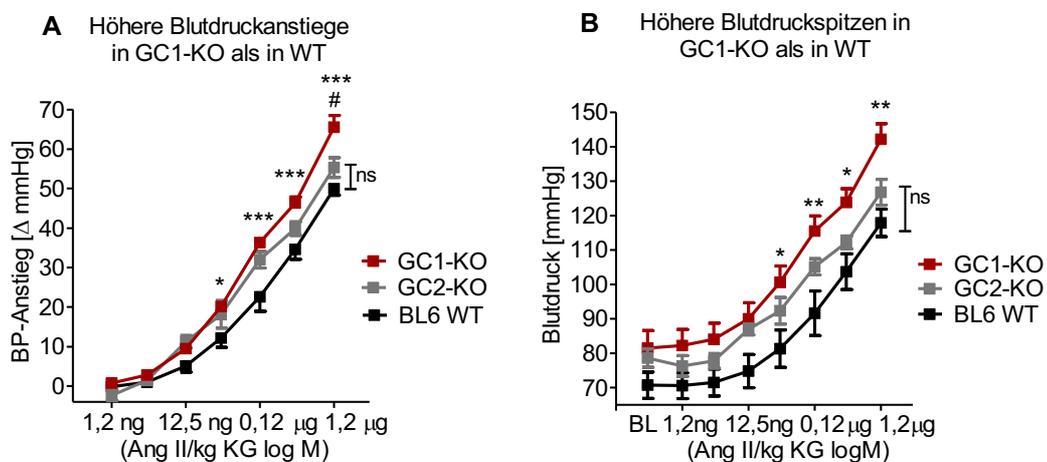


Abb. 3.5 Blutdruckanstiege durch Ang II

Blutdruckanstiege (A) und Blutdruckspitzen (B) nach Gabe von Ang II als Bolus in aufsteigender Konzentration. Vor jeder Ang II-Gabe wurde die Rückkehr zum Ruheblutdruck abgewartet. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Blutdruckerhöhungen (A) und Blutdruckspitzen (B) in GC1-KO (n=9), GC2-KO (n=5) und WT (n=8). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ GC1-KO vs. WT, # $p < 0,05$ GC1-KO vs. GC2-KO. 2way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test.

Quelle: eigene Darstellung

3.1.5 Verminderung des RBF durch Ang II in der akuten Perfusion

Ang II vermittelt eine Vasokonstriktion der renalen Widerstandsgefäße und führt dadurch zu einer Verminderung des renalen Blutflusses (RBF). Der Ang II-induzierten renalen Vasokonstriktion wirkt die NO-vermittelte Vasodilatation entgegen. Wir untersuchten den Stellenwert der sGC-Isoformen für die Funktion der renalen Gefäße anhand Messung des renalen Blutflusses in C57BL/6-Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO -Mäusen während akuter Ang II-Infusion.

Es zeigte sich kein Unterschied in der Verminderung des RBF zwischen GC1-KO, GC2-KO und WT. Obwohl die eingeschränkte Vasodilatation in GC1-KO in höheren

3 Ergebnisse

Blutdruckanstiegen resultierte (Abb. 3.5), ließ sich kein Effekt auf den renalen Blutfluss feststellen (Abb. 3.6).

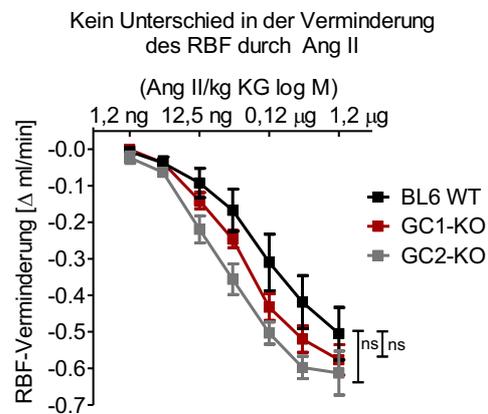


Abb. 3.6 RBF-Verminderung durch Ang II

Verminderungen des RBF nach Gabe von Ang II als Bolus in aufsteigender Konzentration. Vor jeder Ang II-Gabe wurde die Rückkehr des Blutdrucks und des RBFs zur Baseline abgewartet. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der RBF-Verminderungen in GC1-KO (n=9), GC2-KO (n=4) und WT (n=8). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Quelle: eigene Darstellung

3.1.6 Blutdruckverminderung durch GSNO in hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion

Die Wirkung der NO-vermittelten Vasodilatation auf den Blutdruck wurde untersucht. Dafür erzeugten wir durch kontinuierliche Ang II-Infusion ein stabiles Bluthochdruckniveau in C57Bl/6-Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO-Mäusen. GSNO, ein endogener NO-Donor, wurde in aufsteigenden Konzentrationen als Bolus verabreicht.

Die Gabe von GSNO führte in allen Mausgruppen zu einem signifikanten Blutdruckabfall. GC1-KO Mäuse zeigten dabei einen signifikant geringeren Blutdruckabfall als WT und GC2-KO. Es zeigte sich kein Unterschied der Blutdrucksenkung zwischen GC2-KO und WT. Bei WT und GC2-KO genügte eine Verzehnfachung der GSNO-Dosis zur Steigerung der Blutdruckverminderung, bei GC1-KO wurde eine Verhundertfachung der GSNO Dosis benötigt, die Dosis Wirkungs-Kurve war somit bei GC1-KO nach rechts verschoben (Abb. 3.7).

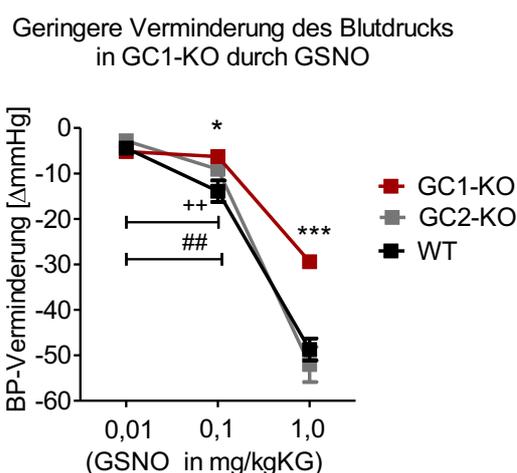


Abb. 3.7 Verminderung des Blutdrucks durch GSNO in hypertensiven Bedingungen

Durch kontinuierliche Ang II- Infusion (200 ng/kg/min) wurde ein stabiles Bluthochdruckniveau erzeugt. Anschließend wurde GSNO in aufsteigender Konzentration als Bolus verabreicht. Vor jeder weiteren GSNO-Gabe wurde die Rückkehr des Blutdrucks zur ursprünglichen Baseline unter Ang II-Gabe abgewartet. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Blutdruckverminderungen durch GSNO. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ GC1-KO vs. WT; ++ $p < 0,01$ WT 0,1 mg/kg vs. WT 0,01 mg/kg; ## $p < 0,01$ GC2-KO 0,1 mg/kg vs. GC2-KO 0,01 mg/kg. 2way ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-test und unpaired t test.

Quelle: eigene Darstellung

3.1.7 Anstieg des RBF durch GSNO in hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion

Die Vasokonstriktion der renalen Widerstandsgefäße durch Ang II trägt in besonderem Ausmaß zur Entstehung von Bluthochdruck bei. Der Ang II-vermittelten renalen

Vasokonstriktion wirkt die NO-vermittelte Vasodilatation entgegen. Wir untersuchten die renale Vasodilatation anhand Messung des renalen Blutflusses in hypertensiven C57Bl/6-Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO-Mäusen nach Gabe von GSNO.

Analog zum geringeren Blutdruckabfall in GC1-KO gegenüber WT und GC2-KO zeigte sich ein verminderter Anstieg des RBF durch GSNO in GC1-KO. WT und GC2-KO präsentierten den gleichen Anstieg des RBF nach Gabe von GSNO. Die Ergebnisse weisen somit auf einen vorherrschenden Beitrag der GC1 zur Regulation der renalen Vasodilatation und des renalen Blutflusses hin (Abb. 3.8).

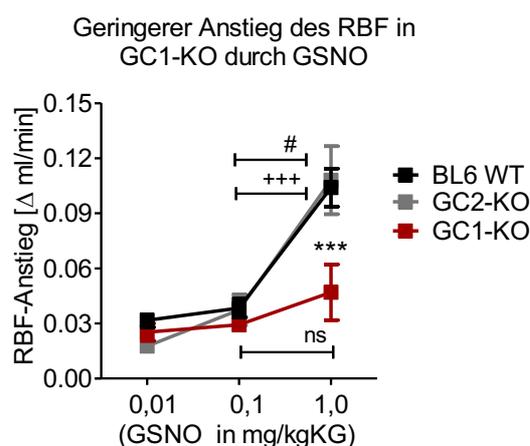


Abb. 3.8 Steigerung des RBF durch GSNO in hypertensiven Bedingungen

Durch kontinuierliche Ang II Infusion (200 ng/kg/min) wurde ein stabiles Bluthochdruckniveau erzeugt. Anschließend wurde GSNO in aufsteigender Konzentration als Bolus verabreicht. Vor jeder weiteren GSNO-Gabe wurde die Rückkehr des Blutdrucks und RBFs zur ursprünglichen Baseline unter Ang II-Gabe abgewartet. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Veränderung des RBF durch GSNO. *** $p < 0,001$ GC1-KO vs. WT; # $p < 0,05$ GC2-KO 1 mg/kg vs. GC2-KO 0,1 mg/kg; +++ $p < 0,001$ WT 1 mg/kg vs. WT 0,1 mg/kg. 2way ANOVA und Bonferroni post-hoc-test und unpaired t-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.1.8 Renale Vasokonstriktion durch Ang II in der isoliert perfundierten Niere

Die isoliert perfundierte Niere ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung der renalen Widerstandsgefäße *in vitro*. Nach Fokussierung auf den renalen Blutfluss in der akuten Perfusion *in vivo*, nutzten wir die isoliert perfundierte Niere zur gezielten Untersuchung der renalen Vasodilatation unabhängig vom systemischen Blutdruck in C57BL/6-Wildtyp, GC1-KO, GC2-KO-Mäusen.

Dabei führte Ang II Gabe in aufsteigender Konzentration in GC1-KO Mäusen zu einer signifikant höheren Druckantwort als in GC2-KO und WT. GC2-KO zeigte keine höhere Druckantwort auf Ang II als WT, hier zeigte sich bei der höchsten Dosierung von Ang II

ein niedrigerer Druckanstieg (Abb. 3.9). Die Ergebnisse deuten auf einen vorherrschenden Beitrag der GC1 zur Regulation der renalen Vasodilatation hin.

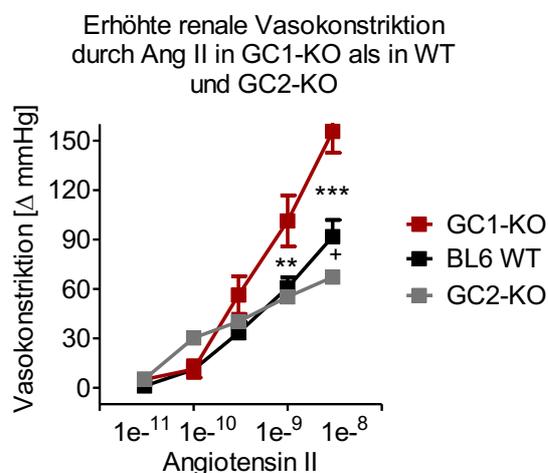


Abb. 3.9 Renale Vasokonstriktion durch Ang II in der isoliert perfundierten Niere

Die Nieren wurden mit Ang II in aufsteigender Konzentration perfundiert. Vor jedem Wechsel zur nächsthöheren Ang II- Dosis wurde die Stabilisierung des Drucks auf eine neue Baseline abgewartet. Dargestellt werden die Mittelwerte der Druckerhöhung und Standardfehler. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ GC1-KO vs. WT; + $p < 0,05$ GC2-KO vs. WT. 2way ANOVA und Bonferroni post-hoc-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.1.9 Deutlich verminderte Expression der löslichen Guanylatcyclase in der A. renalis von GC1-KO Mäusen

Studien konnten zeigen, dass die GC1 die vorherrschende Isoform in der glatten Muskulatur der großen Gefäße ist (34). Die Verteilung der sGC-Isoformen in der A. renalis ist nicht bekannt. Wir untersuchten die Expression von GC- $\beta 1$ anhand eines $\beta 1$ -Primärantikörpers in der A. renalis von C57Bl/6-Wildtyp und GC1-KO-Mäusen. Voraussetzung dafür ist, dass die $\beta 1$ -GC-Untereinheit nicht ohne ihren Dimerisierungspartner, die jeweilige α -Untereinheit, existieren kann. Die Darstellung von $\beta 1$ erlaubt somit eine zuverlässige Auskunft über die Expression der Gesamt-GC in Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO Mäusen.

Die Expression von GC- $\beta 1$ in Aa. renales von GC1-KO zeigte sich im Vergleich zu WT deutlich vermindert (Abb. 3.10). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen des renalen Blutflusses und den Versuchen in der isoliert perfundierten Niere, die ebenfalls eine vorherrschende Rolle von GC1 in den renalen Gefäßen zeigten.

Geringe Expression von β 1-GC in Arteria renalis von GC1-KO

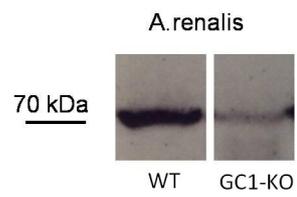


Abb. 3.10 Darstellung der sGC durch einen Primärantikörper gegen GC- β 1 in der A. renalis von WT und GC1-KO

Quelle: eigene Darstellung

3.2 Untersuchung der Phosphodiesterasen 5 und 1

3.2.1 Blutdruck in Ruhe nach oraler Behandlung mit Sildenafil

Die Phosphodiesterasen (PDEs) stellen durch die Inaktivierung von cGMP einen wichtigen Regulator der NO/cGMP-Signalkaskade dar und nehmen darüber Einfluss auf den Tonus der Widerstandsgefäße. Wir untersuchten den Einfluss einer chronischen PDE5-Hemmung auf den Ruheblutdruck in C57BL/6-Mäusen. Dafür wurden Mäuse fünf Tage oral mit einem PDE5-Hemmer (Sildenafil) behandelt. Anschließend wurde der Ruheblutdruck zum Zeitpunkt nach Kanülierung der A. carotis und kurz nach dem Platzieren der Ultraschallsonde um die A. renalis gemessen. Zu beiden Messzeitpunkten zeigten die mit Sildenafil vorbehandelten Tiere einen signifikant niedrigeren Ruhe-Blutdruck als die vergleichbare WT-Gruppe (Abb. 3.11).

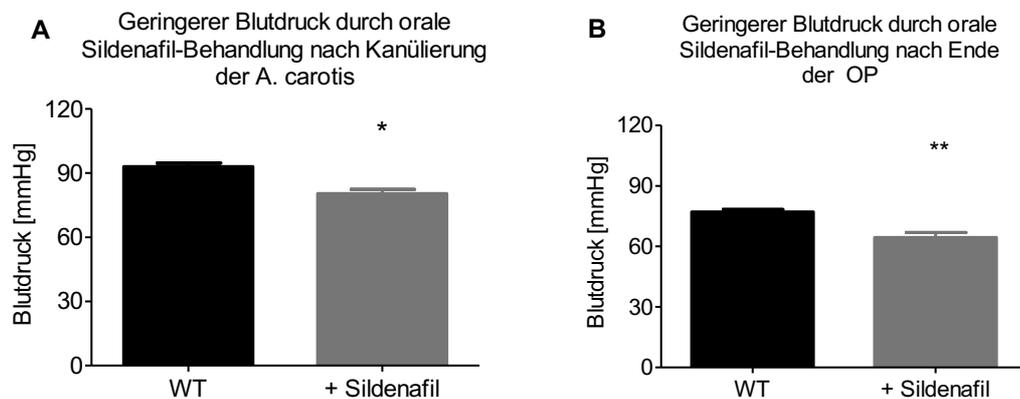


Abb. 3.11 Ruheblutdruck in Mäusen nach oraler Behandlung mit Sildenafil

Der Blutdruck wurde nach oraler Behandlung mit Sildenafil (80 mg/kg/Tag für 5 Tage) zum Zeitpunkt nach Kanülierung der A. carotis (A) und nach dem Platzieren der Ultraschallsonde um die A. renalis (B) gemessen. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der gemessenen Blutdrücke. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ WT vs. WT + Sildenafil. Student's unpaired t-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.2.2 RBF in Ruhe nach oraler Behandlung mit Sildenafil

Neben dem Effekt auf den Blutdruck untersuchten wir den Effekt der PDE5-Hemmung auf den Tonus der renalen Widerstandsgefäße in Ruhe durch Messen des renalen Blutflusses (RBF). Es zeigte sich kein Unterschied des RBF in Tieren, die mit Sildenafil behandelt wurden (Abb. 3.12). Somit bestand in Ruhebedingungen ein blutdruckwirksamer Effekt der PDE5-Hemmung, der sich jedoch nicht in einer veränderten Durchblutung der Nieren niederschlug.

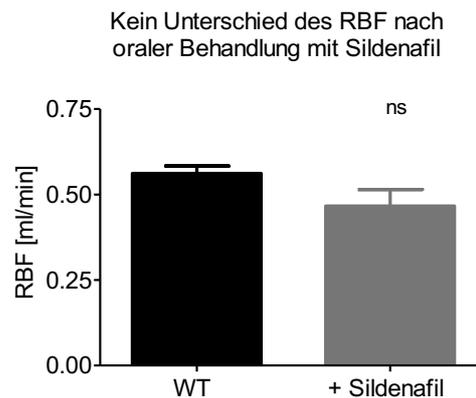


Abb. 3.12 RBF in Ruhebedingungen nach oraler Behandlung mit Sildenafil

Der RBF wurde in Mäusen nach oraler Behandlung mit Sildenafil (80 mg/kg/Tag für 5 Tage) kurz nach dem Platzieren der Ultraschallsonde um die A. renalis gemessen. Dargestellt werden die Mittelwerte der renalen Blutflüsse mit Standardfehlern. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Quelle: eigene Darstellung

3.2.3 Blutdruckanstiege durch Ang II nach Vorbehandlung mit Sildenafil in der akuten Perfusion

Angiotensin II bewirkt über eine Vasokonstriktion einen Blutdruckanstieg, dessen Ausmaß durch die NO/cGMP-vermittelte Vasorelaxation reguliert wird. Die PDE5 und PDE1 inaktivieren cGMP und vermindern somit die NO/cGMP-vermittelte Vasorelaxation. Durch den Einsatz eines PDE5-Hemmers wird der cGMP-Abbau inhibiert und die Vasorelaxation wieder verbessert. Wir untersuchten den Effekt chronischer PDE5-Hemmung durch Sildenafil auf das Ausmaß akuter Ang II-induzierter Blutdruckanstiege in C57BL/6 Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO-Mäusen.

Es zeigte sich keine Veränderung der Ang II-induzierten Blutdruckanstiege durch die orale Vorbehandlung mit Sildenafil (Abb. 3.13).

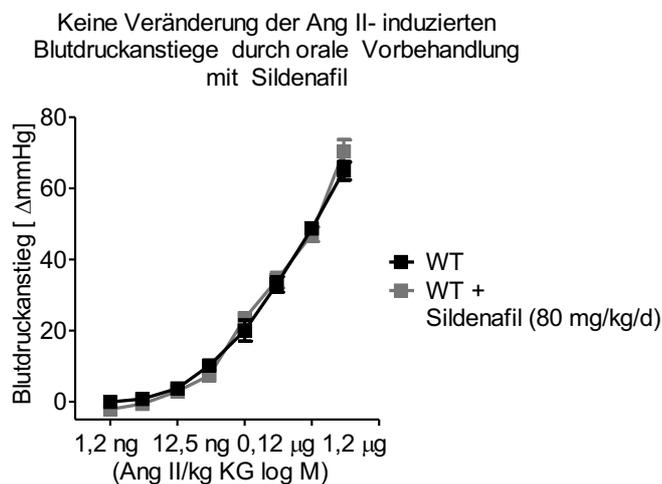


Abb. 3.13 Blutdruckanstiege durch Ang II nach oraler Vorbehandlung mit Sildenafil

Blutdruckanstiege nach Gabe von Ang II als Bolus in aufsteigender Konzentration in Mäusen nach oraler Vorbehandlung mit Sildenafil (80 mg/kg/Tag für 5 Tage). Vor jeder Ang II-Gabe wurde die Rückkehr des Blutdrucks und des RBFs zur Baseline abgewartet. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Blutdruckanstiege. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Quelle: eigene Darstellung

3.2.4 Verminderung des RBF durch Ang II nach Vorbehandlung mit Sildenafil in der akuten Perfusion

Wir untersuchten den Einfluss der PDE5-Hemmung auf die akute Ang II-vermittelte Vasokonstriktion der renalen Widerstandsgefäße durch Messen des RBF. Dabei zeigte sich analog zu den Ergebnissen der Blutdruckmessung (Abb. 3.13) die Ang II-abhängige Verminderung des RBF in der mit Sildenafil vorbehandelten Gruppe nicht verändert (Abb. 3.14).

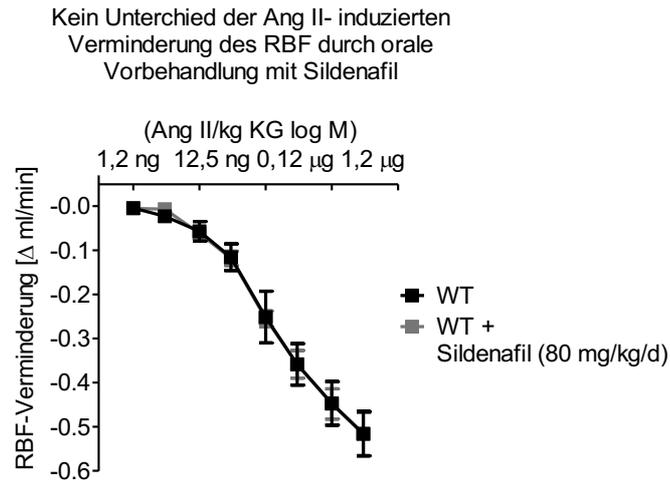


Abb. 3.14 Verminderungen des RBF durch Ang II nach oraler Vorbehandlung mit Sildenafil

Verminderungen des RBF nach Gabe von Ang II als Bolus in aufsteigender Konzentration nach oraler Vorbehandlung mit Sildenafil (80 mg/kg/Tag für 5 Tage). Vor jeder Ang II-Gabe wurde die Rückkehr des Blutdrucks und RBFs zur Baseline abgewartet. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der RBF-Verminderung. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Quelle: eigene Darstellung

3.2.5 Veränderung des Blutdrucks durch akute PDE5- oder PDE1-Hemmung in normotensiven Bedingungen in der akuten Perfusion

Nachdem wir den Einfluss der chronischen PDE5-Hemmung auf den Blutdruck und den RBF in Ruhebedingungen und während Ang II-induzierter Vasokonstriktion untersucht hatten, untersuchten wir die Wirkung akuter PDE5- und PDE1-Hemmung auf den Blutdruck.

Die Applikation von Sildenafil in aufsteigender Konzentration führte in normotensiven Bedingungen zu einer signifikanten Blutdrucksenkung. Die Gabe des PDE1-Hemmers Vinpocetin führte zu keiner signifikanten Veränderung des Blutdrucks (Abb. 3.15).

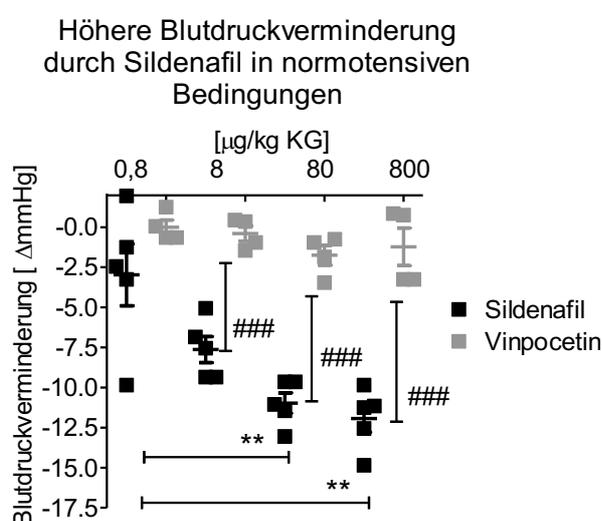


Abb. 3.15 Blutdruckveränderungen durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) oder PDE1-Hemmung (Vinpocetin) in normotensiven Bedingungen

Sildenafil und Vinpocetin wurden in äquivalenter Dosis in aufsteigender Konzentration als Bolus appliziert. Vor jeder weiteren Gabe wurde die Rückkehr des Blutdrucks auf ein Baseline-Niveau abgewartet. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Blutdruckveränderungen. ** $p < 0,01$ Sildenafil vs. Sildenafil 0,8 µg/kgKG; ### $p < 0,001$ Sildenafil vs. Vinpocetin in äquivalenter Dosis. Student's unpaired t-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.2.6 Veränderung des RBF durch akute PDE5- oder PDE1-Hemmung in normotensiven Bedingungen in der akuten Perfusion

Wir untersuchten die Wirkung der akuten PDE5- und PDE1-Hemmung auf den renalen Vasotonus durch Messen des RBF *in vivo*.

Akute Gabe von Sildenafil führte zu einer signifikanten Verminderung des RBF. Die Blutdrücke nach der Gabe von Sildenafil betragen jedoch in der zweithöchsten Konzentration durchschnittlich 57,9 mmHg und in der höchsten Konzentration 56,9 mmHg, so dass die Verminderung des RBF am ehesten einer renalen Hypoperfusion bei

Hypotonie geschuldet war. Die Gabe von Vinpocetin hatte keinen Einfluss auf den RBF (Abb. 3.16).

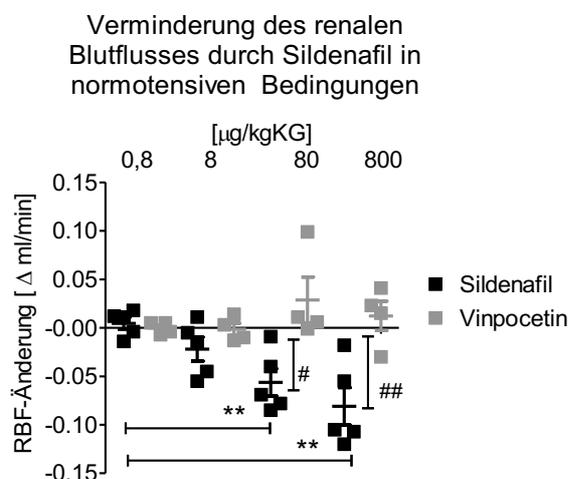


Abb. 3.16 Veränderungen des RBF durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) oder PDE1-Hemmung (Vinpocetin) in normotensiven Bedingungen

Sildenafil und Vinpocetin wurden in äquivalenter Dosis in aufsteigender Konzentration als Bolus appliziert. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der RBF-Veränderungen. ** $p < 0,01$ Sildenafil vs. Sildenafil 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ Sildenafil vs. Vinpocetin in äquivalenter Dosis. Student's unpaired t-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.2.7 Veränderung des Blutdrucks durch akute PDE5- oder PDE1-Hemmung in hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion

Neben der Wirkung der PDE5- und PDE1-Hemmung auf den Blutdruck und den RBF in normotensiven Bedingungen untersuchten wir die Effekte akuter PDE5- und PDE1-Hemmung in hypertensiven Bedingungen. Dafür wurde in Mäusen durch Ang II-Infusion (200 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$) ein stabiles Bluthochdruckniveau erzeugt. Anschließend wurde Sildenafil oder Vinpocetin in aufsteigender Konzentration als Bolus verabreicht.

In hypertensiven Bedingungen führte die Gabe von Sildenafil zu einer signifikanten Verminderung des Blutdrucks ab der zweitniedrigsten Konzentration. Die Gabe von Vinpocetin zeigte nur in der höchsten Vinpocetin-Konzentration einen geringen blutdrucksenkenden Effekt, der jedoch der Sildenafil-induzierten Blutdrucksenkung signifikant unterlegen war (Abb. 3.17).

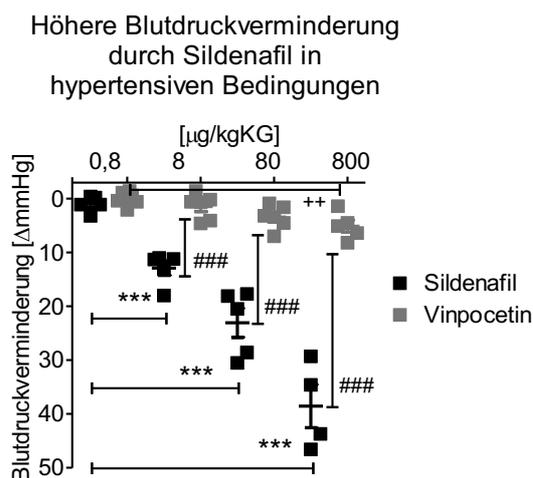


Abb. 3.17 Blutdruckveränderung durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) oder PDE1-Hemmung (Vinpocetin) in hypertensiven Bedingungen

Während akuter Ang II-Infusion (200 ng/kg/min) wurden Sildenafil und Vinpocetin in äquivalenter Dosis in aufsteigender Konzentration als Bolus appliziert. Vor jeder weiteren Gabe wurde die Rückkehr des Blutdrucks auf ein Baseline-Niveau abgewartet. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Blutdruckveränderungen. *** $p < 0,001$ Sildenafil vs. Sildenafil 0,8 µg/kgKG; ++ $p < 0,01$ Vinpocetin 800 µg/kgKG vs. Vinpocetin 0,8 µg/kgKG; ### $p < 0,001$ Sildenafil vs. Vinpocetin in äquivalenter Dosis. Student's unpaired t-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.2.8 Veränderung des RBF durch akute PDE5- oder PDE1-Hemmung in hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion

Die Wirkung von Ang II auf die renalen Widerstandsgefäße und somit den RBF ist ein wichtiger Regulator des Blutdrucks. Der Ang II-abhängigen renalen Vasokonstriktion wirkt die NO/cGMP-vermittelte renale Vasorelaxation entgegen. Wir untersuchten, ob akute PDE5- oder PDE1-Hemmung den renalen Blutfluss während akuter Ang II-Infusion verbessert.

Es zeigte sich eine signifikante Steigerung des renalen Blutflusses nach Gabe von Sildenafil. Vinpocetin zeigte auch in hypertensiven Bedingungen keinen Effekt auf den renalen Blutfluss (Abb. 3.18).

Verminderung des renalen
Blutflusses durch Sildenafil in
hypertensiven Bedingungen

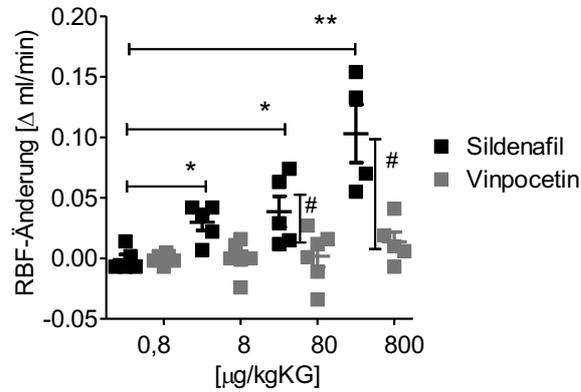


Abb. 3.18 Veränderung des RBF durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) oder PDE1-Hemmung (Vinpocetin) in hypertensiven Bedingungen

Während akuter Ang II-Infusion (200 ng/kg/min) wurden Sildenafil und Vinpocetin in äquivalenter Dosis in aufsteigender Konzentration als Bolus appliziert. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Veränderungen des renalen Blutflusses. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ Sildenafil vs. Sildenafil 0,8 $\mu\text{g/kgKG}$; # $p < 0,05$ Sildenafil vs. Vinpocetin in äquivalenter Dosis. Student's unpaired t-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.2.9 Vergleich der PDE5-Wirkung auf den Blutdruck in normotensiven und hypertensiven Bedingungen in der akuten Perfusion

Vergleich man die Wirkung von Sildenafil in normotensiven (ohne Ang II-Infusion) und hypertensiven (mit Ang II-Infusion) Bedingungen, zeigte sich eine signifikant stärkere Wirkung der PDE5-Hemmung auf den Blutdruck während akuter Ang II-Infusion (Abb. 3.19).

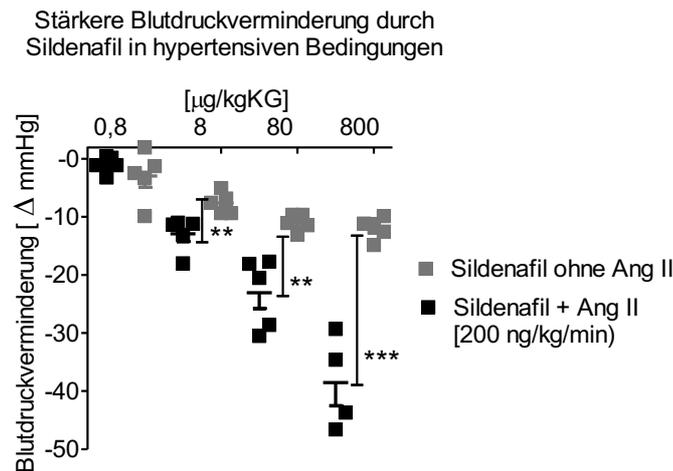


Abb. 3.19 Vergleich der Blutdruckveränderungen durch PDE5-Hemmung (Sildenafil) in normotensiven Bedingungen und hypertensiven Bedingungen mit Ang II (200 ng/kg/min)

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der Blutdruckverminderung. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ Sildenafil ohne Ang II vs. äquivalente Dosis von Sildenafil + Ang II. Student's unpaired t-test.

Quelle: eigene Darstellung

3.2.10 Relaxation der renalen Widerstandsgefäße durch GSNO mit und ohne Sildenafil oder Vinpocetin in der isoliert perfundierten Niere

In vivo hatte sich eine signifikante Verbesserung des renalen Blutflusses durch die PDE5-Hemmung in hypertensiven Bedingungen gezeigt. Wir griffen zusätzlich auf das Modell der isoliert perfundierten Niere zurück, um den Einfluss der PDE5 und PDE1 auf die Funktion der renalen Widerstandsgefäße *in vitro* unabhängig vom systemischen Blutdruck zu überprüfen.

In isoliert perfundierten Nieren von normotensiven unbehandelten und hypertensiven mit Ang II behandelten Mäusen wurde in der Anwesenheit von Sildenafil oder Vinpocetin eine Endothel-unabhängige Vasorelaxation mit GSNO in aufsteigender Konzentration hervorgerufen. Es zeigte sich keine Veränderung der renalen Vasorelaxation durch die Gabe von Sildenafil oder Vinpocetin in Nieren unbehandelter Mäuse (Abb. 3.20 A). Im Gegensatz dazu zeigte sich die renale Vasorelaxation in den Nieren hypertensiver Mäuse durch Sildenafil, nicht jedoch durch Vinpocetin verbessert (Abb. 3.20 B).

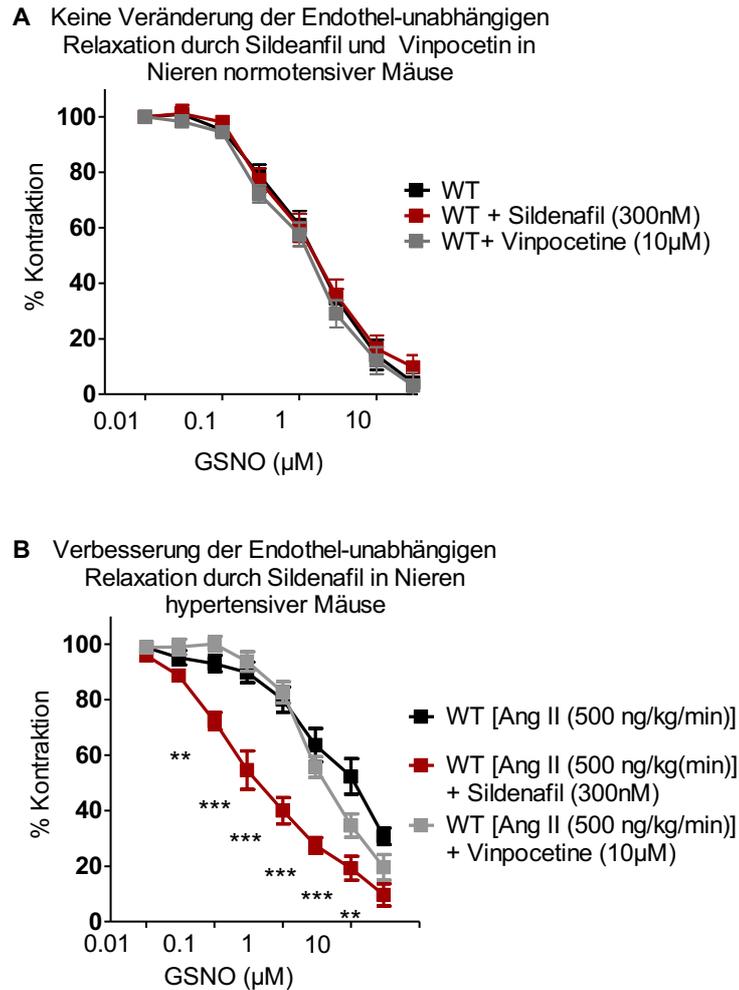


Abb. 3.20 Renale Vasorelaxation in der isoliert perfundierten Niere

Renale Vasorelaxation durch GSNO in Nieren normotensiver Mäuse (A) und hypertensiver Mäuse (B). Für (B) wurde in Mäusen durch kontinuierliche Infusion von Ang II (500 ng/kg/min) über 14 Tage ein Bluthochdruck erzeugt. Anschließend wurden die renalen Widerstandsgefäße mit Noradrenalin (10^{-6} M) vorkontrahiert. Die renale Vasorelaxation wurde durch Gabe von GSNO in aufsteigender Konzentration in Anwesenheit von Sildenafil (300nM) oder Vinpocetin (10 µM) hervorgerufen. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardfehler der gemessenen Druckverminderungen durch GSNO als relativer Anteil des Noradrenalin-induzierten Druckanstieges. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ WT [Ang II (500 ng/kg/min)] + Sildenafil vs. WT [Ang II (500 ng/kg/min)]. 2way ANOVA und Bonferroni post-hoc-test.

Quelle: eigene Darstellung

4 Diskussion

4.1 Die Rolle der löslichen Guanylatcyclase für die Nierendurchblutung und den Blutdruck

4.1.1 GC1-KO und GC-2-KO Mäuse präsentieren einen erhöhten Ruheblutdruck

Die lösliche Guanylatcyclase ist das Schlüsselenzym der NO/cGMP-Signalkaskade und damit einer der wichtigsten Regulatoren der Gefäßfunktion und des Blutdrucks (15, 24, 53). Sie existiert in zwei Isoformen, deren Funktion und Verteilung abhängig vom Gewebetyp sind (32, 34).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass sowohl die GC1 als auch die GC2 für die Regulation des Blutdrucks in Mäusen verantwortlich sind. GC1-KO Mäuse zeigten gegenüber WT einen um 13 mmHg (WT vs. GC1-KO = $93,0 \pm 1,6$ mmHg vs. $106,9 \pm 4,1$ mmHg), GC2-KO gegenüber WT einen um 9 mmHg (WT vs. GC2-KO = $93,0 \pm 1,6$ mmHg vs. $103,9 \pm 3,1$ mmHg) erhöhten Blutdruck auf. Bisherige Studien lieferten widersprüchliche Aussagen zum Einfluss der GC-Isoformen auf den Ruheblutdruck. In GC1-KO Mäusen konnte sowohl vor dem 129S6-Hintergrund (35) als auch vor dem C57BL/6-Hintergrund (34) ein erhöhter Ruheblutdruck nachgewiesen werden, während GC2-KO Mäuse keinen erhöhten Blutdruck zeigten. Die Messungen in GC1-KO Mäusen vor dem C57BL/6-Hintergrund erfolgten dabei per tail-cuff Methode in wachen Mäusen (34), während unsere Messungen invasiv in narkotisierten Mäusen erfolgten. Die Vergleichbarkeit der beiden unterschiedlichen Messmethoden konnte dabei zwar in Studien gezeigt werden (54), eine Blutdrucksuppression durch die in unserem Versuchsmodell verwendeten Narkotika ist jedoch zu erwarten. Dennoch, nach gewichtsadaptierter Dosierung der applizierten Narkotika und Messung des Blutdrucks an standardisierten Messzeitpunkten zeigte sich bei uns erstmals auch in der GC2-KO Maus ein erhöhter Ruheblutdruck gegenüber WT und deutet auf einen Beitrag beider sGC-Isoformen zur Regulation des Blutdrucks hin.

Die Beeinflussung des Blutdrucks durch die NO/cGMP-Signalkaskade kann dabei vielfältiger Natur sein. Neben der Regulation der Gefäßfunktion (15, 24, 53) nimmt die NO/cGMP-Signalkaskade Einfluss auf den renalen Blutfluss (55) und die renale Salzausscheidung (56-59), über die jeweils eine Blutdruckregulation zu erwarten ist. Auch ein Zusammenhang der sGC-Isoformen mit der Aktivität des sympathischen Nervensystems (60) konnte festgestellt werden. Wir widmeten uns in dieser Arbeit als nächstes der Betrachtung der renalen Gefäßfunktion in Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO Mäusen.

4.1.2 Der renale Blutfluss ist maßgeblich von GC1, die Regulation des Blutdrucks hingegen von beiden sGC-Isoformen abhängig

Bisherige Studien hatten sich hinsichtlich der Funktion von GC1 und GC2 im Gefäßsystem überwiegend *in vitro* auf große Gefäße beschränkt. So zeigte sich in einer Arbeit von Mergia et al., dass in der glatten Muskulatur großer Gefäße wie Aorten eine überwiegende Expression von GC1 stattfindet (34). Allerdings tragen nicht die bei Mergia et al. untersuchten großen Gefäße, sondern kleinere Gefäße wie distale Arterien oder Arteriolen und die Widerstandsgefäße der Niere maßgeblich zum totalen peripheren Widerstand und somit zur Blutdruckregulation bei (61-63). Die renale Vasokonstriktion nimmt darüber hinaus durch ihre Steuerung des glomerulären Blutflusses und der glomerulären Filtration direkten Einfluss auf den Blutdruck und ist dabei wie alle Gefäße maßgeblich von der Wirkung der NO/cGMP-Signalkaskade abhängig (55, 57, 64).

Wir untersuchten daher als nächstes gezielt die Rolle der sGC für die renale Durchblutung, indem wir Mäusen *in vivo* zunächst L-NAME, einen unspezifischen NO-Synthase-Blocker, applizierten. Dieser führte in GC1-KO zu einer geringeren relativen Verminderung des renalen Blutflusses als in WT, nicht jedoch in GC2-KO. Betrachtet man die Veränderung des renalen Blutflusses vor dem Hintergrund des Ohmschen Gesetz, nach dem eine Erhöhung des Widerstandes z.B. durch eine Vasokonstriktion, mit einer Verringerung des Blutflusses einhergeht, zeigte sich somit die geringste renale Vasokonstriktion durch L-NAME in der GC1-KO Maus.

Diese verminderte renale Vasokonstriktion durch L-NAME in der GC1-KO-Maus gibt einen ersten Hinweis auf ein vorherrschendes Vorliegen der GC1 in den Gefäßen der Niere, interpretiert man unsere Beobachtung vor dem Hintergrund der Studie von Mergia et al. (34). Hier konnte in Aorten von GC1-KO Mäusen gezeigt werden, dass dort die GC-Gesamtaktivität zu 94 % reduziert ist und mit einer deutlich verminderten cGMP-Aktivität einhergeht, während die cGMP-Level in Aorten von GC2-KO Mäusen normwertig waren. Die erniedrigten cGMP-Spiegel in Aorten von GC1-KO Tieren waren dabei weder durch die exogene Gabe von NO stimulierbar, noch durch Gabe von 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), einem GC-Hemmer, supprimierbar. Die normalen cGMP-Spiegel in Aorten von GC2-KO Mäusen waren dahingegen durch ODQ supprimierbar. Für unser Modell könnte das bedeuten, dass durch eine vorherrschende Rolle von GC1 auch in den renalen Gefäßen die cGMP-Aktivität in der GC1-KO Maus derartig erniedrigt ist, dass eine weitere L-NAME induzierte Erniedrigung der cGMP-Spiegel durch die Restfunktion der GC2 für die renale Vasokonstriktion kaum noch ins Gewicht fällt. Entsprechend führte die Gabe von L-NAME in der GC2-KO Maus sogar zu einer stärkeren relativen Verminderung des RBF als in WT und unterstreicht dadurch zusätzlich den bedeutenden Beitrag der GC1 zur Aufrechterhaltung der cGMP-Produktion in diesem Mausmodell.

Die Ergebnisse stehen zudem im Einklang mit unseren *in vitro* Ergebnissen im Western Blot. Dort zeigte sich die Expression der sGC in den Aa. renales von GC1-KO Mäusen im Vergleich zu WT deutlich vermindert und deutet somit ebenso auf ein vorherrschendes Vorliegen von GC1 in den renalen Gefäßen hin.

Welchen individuellen Beitrag die Unterschiede des renalen Blutflusses zwischen den Mausgruppen zu deren jeweiligen Blutdruckunterschieden leisten, kann anhand der vorliegenden Daten zunächst nicht geklärt werden, da der GC1- bzw. GC2-Verlust in den KO-Mäusen nicht nierenspezifisch ist und neben den Gefäßen der Niere auch die Funktion der restlichen Widerstandsgefäße beeinflusst (15, 24, 53). Außerdem ist die GC in eine Vielzahl weiterer Funktionen wie z.B. die renale Salzausscheidung (56-59) involviert. Schon der Verlust der sGC für die Regulation des Gefäßtonus durch einen Knockout in der glatten Muskulatur führt dabei zu einem Bluthochdruck in Mäusen, wie Groneberg et al. zeigen konnte (15). Jedoch zeigte sich in unserem Versuchsmodell nach der Gabe von L-NAME auch die Regulation des Blutdrucks maßgeblich von GC1 beeinflusst. L-NAME erzeugte in GC1-KO einen geringeren absoluten Blutdruckanstieg als in WT, nicht jedoch GC2-KO. Um auszuschließen, dass der geringere Blutdruckanstieg in GC1-KO ausschließlich dem höheren Ruheblutdruck in GC1-KO geschuldet war (WT: $75,8 \pm 2,6$ mmHg; GC1-KO: $86,4 \pm 3,5$ mmHg, $p < 0,05$), bestimmten wir zusätzlich den relativen Blutdruckanstieg. Dieser zeigte sich nach L-NAME Gabe nun sowohl in GC1-KO als auch in GC2-KO gegenüber WT vermindert, während er jedoch in GC1-KO signifikant am geringsten war.

Zusammenfassend zeigte sich bis hierhin ein vorherrschender Beitrag der GC1 zur Regulation der renalen Relaxation. Für die Blutdruckregulation in Ruhe erwiesen sich hingegen beide sGC-Isoformen von Bedeutung, wenngleich GC1 jedoch auch hier einen dominanten Beitrag leistete. Als nächstes widmeten wir uns der Funktion der sGC in Bedingungen erhöhter Ang II Wirkung.

4.1.3 Die GC1 ist hauptverantwortlich für die Regulation der renalen Durchblutung und des Blutdrucks unter Einfluss von Ang II

Die Wirkung von Ang II ist eng mit der Entstehung von Hypertonie verknüpft (65, 66). Es wirkt unter anderem als potenter Vasokonstriktor direkt blutdrucksteigernd (10, 12). Die NO/cGMP-Signalkaskade kann als potenter Vasodilatator als Gegenspieler des Ang II-induzierten Blutdruckanstiegs betrachtet werden (67). Gerade in der Niere als ein zentraler Ort der Ang II-Wirkung ist das Zusammenspiel von Ang II und der NO/cGMP-Signalkaskade für die Entstehung von Bluthochdruck von Bedeutung (68, 69).

Wir untersuchten im Folgenden gezielt den Einfluss der sGC-Isoformen auf die renale Durchblutung und den Blutdruck in Bedingungen erhöhter Vasokonstriktion durch Ang II.

Die Verbesserung des renalen Blutflusses durch GSNO war dabei in GC1-KO gegenüber WT vermindert, während sich die Veränderung des renalen Blutflusses in GC2-KO auf WT-Niveau befand. Als ursächlich dafür kommt, wie bereits in normotensiven Bedingungen diskutiert, eine deutliche Verminderung der cGMP-Produktion in den renalen Gefäßen der GC1-KO Tiere in Betracht, die nicht mehr auf exogene NO-Gabe reagieren. Entsprechend konnten auch die cGMP-Spiegel in Aorten von GC1-KO Mäusen in der Arbeit von Mergia et al. nicht durch exogene Gabe von NO stimuliert werden (34). Dagegen sprechen zwar Messungen aus unserer Arbeitsgruppe, die im renalen Cortex eine Steigerung der cGMP-Produktion durch NO in GC1-KO Mäusen hervorrufen konnten (36), jedoch wird die sGC auch im tubulären Apparat der Niere exprimiert (56, 70) und könnte dadurch teilweise für den cGMP-Anstieg im Nierencortex verantwortlich sein.

Auch unter Einfluss von Ang II scheint also GC1 hauptverantwortlich für die renale Vasorelaxation und den renalen Blutfluss zu sein. Um die Verminderung der renalen Vasorelaxation in Bedingungen erhöhter Ang II Wirkung in den KO-Mäusen zu objektivieren und einen Einfluss systemischer Blutdruckeffekte auf den renalen Blutfluss *in vivo* auszuschließen, untersuchten wir die renalen Widerstandsgefäße zusätzlich im Modell der isoliert perfundierten Niere. Auch hier zeigte sich die Ang-II induzierte renale Vasokonstriktion nur in GC1-KO, nicht jedoch in GC2-KO verstärkt

Auf der Grundlage der Erkenntnis, dass gerade die Wirkung des Ang II auf den renalen Blutfluss bzw. die renale Gefäßfunktion einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung einer Hypertonie leistet (11) und dabei in der NO/cGMP-Signalkaskade einen wichtigen Gegenspieler findet (68), lässt sich vermuten, dass die hier beobachtete Einschränkung des renalen Blutflusses in der GC1-KO Maus auch einen wichtigen Beitrag zur Verschlechterung der Blutdrucks in hypertensiven Bedingungen leistet. Entsprechend zeigte sich die GSNO-induzierte Blutdruckverminderung unter dem Einfluss von Ang II nur in GC1-KO, nicht jedoch in GC2-KO gegenüber WT vermindert. Die akute Vasokonstriktion durch Gabe von Ang II in aufsteigender Konzentration führte nur in GC1-KO zu höheren Blutdruckanstiegen als in WT. Zusammenfassend zeigte sich also in hypertensiven Bedingungen ein vorherrschender Beitrag nur von GC1-KO zur Blutdruckregulation.

Die Tatsache, dass GC1-KO und GC2-KO in Ruhe einen erhöhten Blutdruck ohne nennenswerte Verminderung des renalen Blutflusses präsentieren, spricht gegen einen Einfluss der renalen Durchblutung für den Blutdruck in Ruhebedingungen in den KO-Tieren. Unter Einfluss von Ang II hingegen zeigte nur die GC1-KO Maus neben einer eingeschränkten renalen Vasorelaxation eine Blutdruckverschlechterung, was in Anbetracht der gänzlich unveränderten renalen Gefäßfunktion in der GC2-KO Maus einen Einfluss der

renalen Hämodynamik auf den erhöhten Ruheblutdruck in der GC2-KO Maus unwahrscheinlich macht.

Der erhöhte Ruheblutdruck in der GC2-KO Maus erfordert daher, weitere Mechanismen der sGC-abhängigen Blutdruckregulierung in die Diskussion mit einzubeziehen. Ein Grund für die erhöhten Ruheblutdrücke in der GC2-KO Maus könnte eine veränderte tubuläre Salzausscheidung sein. Neben der Regulation der renalen Widerstandsgefäße steht die NO/cGMP-Signalkaskade auch mit der Steuerung der renalen tubulären Salzausscheidung in Zusammenhang und nimmt darüber Einfluss auf den Blutdruck (56, 70, 71). In unserer Arbeitsgruppe konnten wir durch die Messung der sGC-Aktivität in Nierenhomogenaten feststellen, dass die GC2 sich mit ca. 20% an der gesamten GC-Aktivität in der Niere beteiligt (36). Zwar konnten wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich ein Verlust von GC2 nicht in einer Veränderung der renalen Hämodynamik niederschlägt, denkbar ist jedoch, dass sich durch den 20 prozentigen Verlust der GC-Aktivität in der GC2-KO Maus eine verminderte Salzausscheidung einstellt, die für den erhöhten Ruheblutdruck verantwortlich ist. Hierfür wären Messungen der Salzausscheidung im Sammelurin von Wildtyp, GC1-KO und GC2-KO Mäusen notwendig.

Einen weiteren Erklärungsansatz könnte der Beitrag der sGC zur Regulation des sympathischen Nervensystems bieten. In diesem Zusammenhang konnte in Studien gezeigt werden, dass GC1 an der Regulation des präsynaptischen und GC2 an der Regulation des postsynaptischen glutamergen und gabanergen Signals beteiligt sind (72-74). In einer Arbeit von Broekmans et al. konnte nun beobachtet werden, dass GC1-KO Mäusen eine verminderte Aktivität des sympathischen Nervensystems vorwies, das sie vor einer Verschlechterung des Blutdrucks schützte (60). Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass die postsynaptisch fungierende GC2 einen hemmenden Einfluss auf die Sympathikus-Aktivität ausübt und somit der höhere Blutdruck in GC2-KO einer Aktivierung des Sympathikus geschuldet ist. Hierfür sollten Noradrenalin-Messungen in beiden GC-KO Gruppen erfolgen, entsprechende Daten liegen aber noch nicht vor.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die GC1 eine vorherrschende Rolle für die Regulation der renalen Vasorelaxation und des renalen Blutflusses einnimmt und auch für die Blutdruckeinstellung von größerer Bedeutung ist als die GC2, insbesondere unter dem Einfluss von Ang II. Dennoch, beide Isoformen sind an der Regulation des Blutdrucks beteiligt, so zeigte auch die GC2-KO Maus einen erhöhten Ruheblutdruck als WT, die Mechanismen hierfür müssen weiter untersucht werden.

4.2 Die Rolle der PDE 5 und 1 für die Nierendurchblutung und den Blutdruck

Die Phosphodiesterasen sind wichtige Regulatoren der cGMP-induzierten Vasorelaxation und sind Angriffspunkt der pharmakologischen Therapie unterschiedlicher Erkrankungen (52, 75, 76). Der PDE5-Hemmer Sildenafil wird erfolgreich in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie eingesetzt (77). In verschiedenen Studien konnte zudem ein blutdrucksenkender Effekt von Sildenafil gezeigt werden (78, 79). Trotzdem hat Sildenafil bisher keinen Einzug in die antihypertensive Therapie erhalten. Dies liegt vor allem an seiner kurzen Wirkdauer, die eine dreimalige tägliche Einnahme erfordern würde und somit den meisten anderen Antihypertensiva unterlegen ist (78). Die Hemmung der PDE1 durch Vinpocetin spielte insbesondere in der Behandlung des organischen Psychosyndroms eine Rolle und zeigte in Studien eine Verbesserung der kognitiven Funktion bei Patienten mit primärer Demenz (80) oder Schizophrenie (81). Seit 2006 ist Vinpocetin als Arzneimittel allerdings nicht mehr zugelassen, ist aber Gegenstand zahlreicher experimenteller Studien, die sich z.B. mit seiner antiinflammatorischen Wirkung (82) und seiner Rolle für die Gefäßfunktion (44, 51) und das kardiale Remodelling beschäftigen (83).

Ang II spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie, indem es als starker Vasokonstriktor den peripheren Widerstand erhöht (84) und die renale Salz- und Wasserretention fördert (5, 6). Zusätzlich ist die Wirkung von Ang II eng mit der Entstehung von vaskulärer Dysfunktion und somit Atherosklerose verknüpft, die zur Aufrechterhaltung und Verschlechterung der arteriellen Hypertonie beitragen (85-87). Mögliche Interaktionspunkte zwischen Ang II und den PDEs werden als Teil des Pathomechanismus der Entstehung von arterieller Hypertonie diskutiert.

So konnte gezeigt werden, dass selektive Inhibition von PDE5 und PDE1 die vaskuläre Funktion in experimenteller Hypertonie durch Ang II verbessert (36, 44, 49, 51). Kim et al. berichtete, dass Ang II in Aorten von Ratten die Expression der PDE5 verstärkt und die Inhibition der PDE5 z.B. durch Sildenafil, die Ang II-induzierte vaskuläre Dysfunktion verbessert (49). Giachini et al. dagegen postulierte in seiner Arbeit, dass die Aktivierung der PDE1 durch Ang II ein wichtiger Pathomechanismus der vaskulären Dysfunktion in Ang II-induzierter Hypertonie ist (51). Anhand unterschiedlicher Versuchsmodelle fokussierten sich somit beide Studien auf den Stellenwert der PDE5 und PDE1 für die Funktion großer Gefäße in Ang II-induzierter Hypertonie *in vitro*.

Die Bedeutung der PDEs für die Gefäßfunktion *in vivo*, sowie deren Einflussnahme auf den Blutdruck, der maßgeblich durch den Tonus der kleineren Widerstandsgefäße reguliert wird, lässt sich aus den genannten Studien nicht ableiten. Wir führten daher *in vivo* während akuter Ang II-induzierter Hypertonie Messungen des renalen Blutflusses durch,

der uns als direkter Indikator der Kontraktilität der renalen Gefäße diene. Durch eine Betrachtung der gleichzeitig stattfindenden Blutdruckveränderungen konnten wir den Stellenwert der PDE5 und PDE1 für die Blutdruckregulation in Ang II-induzierter Hypertonie abschätzen.

Es zeigte sich, dass die PDE5-Hemmung durch Sildenafil den renalen Blutfluss durch Relaxation der A. renalis während Ang II-induzierter Hypertonie verbessern konnte. Die PDE1-Hemmung durch Vinpocetin zeigte im Gegensatz dazu keinen Effekt auf den renalen Blutfluss. Der Blutdruck konnte durch PDE5-Hemmung sowohl während Ang II induzierter Hypertonie als auch in normotensiven Bedingungen bereits ab der zweitniedrigsten Konzentration gesenkt werden, der blutdrucksenkende Effekt der PDE5-Hemmung war dabei während der Ang II-Infusion verstärkt. Auch die orale Behandlung mit Sildenafil führte zu einem niedrigeren Ruheblutdruck in den Versuchstieren. Im Gegensatz dazu führte akute PDE1-Hemmung in hypertensiven nur in der höchsten Konzentration zu einer geringen Blutdrucksenkung, die jedoch der Blutdrucksenkung durch Sildenafil signifikant unterlegen war. In normotensiven Bedingungen ließ sich kein Effekt von Vinpocetin auf den Blutdruck ableiten.

Unsere Ergebnisse der Betrachtung des renalen Blutflusses stehen somit zunächst im Widerspruch zu der Arbeit von Giachini et al. (51). Dort wurde eine verbesserte Relaxation durch Vinpocetin in Aorten von Ang II-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet und daraus die Hypothese abgeleitet, dass eine Aktivierung der PDE1 durch Ang II die Ang II-induzierte Kontraktion verstärkt. Unsere Ergebnisse hingegen zeigen keinen Effekt der PDE1-Hemmung während Ang II-induzierter Hypertonie auf die Vasorelaxation, in diesem Falle gemessen anhand der renalen Vasorelaxation. Teilweise bestätigt durch die Arbeit von Giachini et al. werden jedoch unsere Beobachtungen der PDE5-Hemmung durch Sildenafil, die während Ang II Infusion die renale Vasorelaxation verbessert. Auch bei Giachini et al. konnte Sildenafil eine Vasorelaxation der Aorta hervorrufen und deren Vasokonstriktion abmildern, allerdings ohne Unterschied zwischen den mit Ang II -behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Ein Vergleich zwischen der Wirkung des Sildenafil und des Vinpocetin werden durch Giachini et al. nicht vorgenommen, ob die Sildenafil-induzierte Vasorelaxation der Vinpocetin-induzierten Vasorelaxation überlegen ist, lässt sich somit nicht sagen.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang zu einer weiteren Studie in großen Gefäßen von Dias et al. (88). Dort wurden auch *in vitro* die Vasorelaxation von Mesenterialgefäßen durch Sildenafil in Mäusen mit einem chronisch aktivierten RAS (sog. Goldblatt Modell) verbessert. Die Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit den Ergebnissen von Giachini et al. und Dias et al. ist insofern eingeschränkt, als dass andere Versuchstiere und verschiedene Gefäße benutzt wurden. Relaxationsversuche durch Sildenafil und

Vinpocetin in Aorten von Mäusen sollten durchgeführt werden, um eine Einflussnahme der Größe der untersuchten Gefäße und der Spezies auszuschließen.

Die bis hierhin vorgenommene Betrachtung der renalen Gefäßfunktion allein, lässt noch keine Rückschlüsse auf den Einfluss der PDE5 oder PDE1 auf den Blutdruck zu. Die Blutdruckveränderungen nach Sildenafil- und Vinpocetin-Gabe deuten in der vorliegenden Arbeit jedoch auch auf eine vorherrschende Rolle der PDE5 für die Blutdruckregulation, insbesondere während der Ang II-induzierten Hypertonie hin, entsprechend zeigte sich der Sildenafil-induzierte Blutdruckabfall in hypertensiven Bedingungen verstärkt. Diese Daten stehen im Einklang mit vorherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und einer Studie von Dias et al., die in Mäusen mit experimentell erzeugter Hypertonie eine Verbesserung des Blutdrucks durch Sildenafil zeigen konnten (36, 88). Zwar entstammen die Daten der zitierten Studien aus Tieren, in denen im sog. Goldblatt-Modell durch eine künstliche Stenosierung einer Nierenarterie ein renovaskulärer Bluthochdruck erzeugt wurde (Two Kidney One Clip), doch zeichnen sich auch diese Tiere aufgrund eines aktivierten Renin-Angiotensin-System (RAS) durch eine vermehrte Ang II-Wirkung aus (89).

Die möglichen Gründe für die Verbesserung des Blutdrucks durch die PDE5-Hemmung sind dabei vielfältig. Die durch uns beobachtete Sildenafil-induzierte Verbesserung des renalen Blutflusses während Ang II-Infusion dürfte z.B. durch eine Erhöhung der glomerulären Perfusion und somit der Salzausscheidung einen wichtigen Beitrag zu beobachteten Blutdrucksenkung durch PDE5-Hemmung beitragen (57, 64). In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Sparks et al. konnte diesbezüglich ein direkter Zusammenhang des renalen Blutflusses, in diesem Falle reguliert durch Ang II, mit der renalen Salzausscheidung und somit des Blutdrucks gezeigt werden (11). Zwar wurde in dieser Studie nicht mit PDE-Hemmern gearbeitet, zeigt aber im Umkehrschluss, dass eine Verbesserung des renalen Blutflusses, z.B. durch PDE5-Hemmung, eine verbesserte Salzsekretion und somit Erniedrigung des Blutdrucks bewirken könnte. Auch eine direkte Interaktion der PDE5 mit den tubulären Transportern der renalen Salzausscheidung ist möglich. Z.b. konnte Ramseyer et al. eine direkte Interaktion der PDE5 mit dem Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransporter (NKCC2) aufzeigen, die PDE5-Hemmung konnte in dieser Studie die Salzausscheidung und somit den Blutdruck verbessern (90). Auch eine Beteiligung der PDE5 an der zentralen Blutdruckeinstellung wird diskutiert. Diesbezüglich wurde in einer Studie von Cavalcanti et al. gezeigt, dass PDE5-Hemmung die gestörte Barorezeptor-Sensibilität in experimenteller Hypertonie (Goldblatt-Modell) wieder verbessert und dadurch den Blutdruck senkt (91).

Neben den genannten Effekten, ist ein wesentlicher Beitrag der PDE5 zum Blutdruck außerdem durch seine Regulation der NO-Wirkung im Gefäßsystem und somit Steuerung des Tonus aller Widerstandsgefäße auch außerhalb der Niere zu erwarten. Der Einfluss der

NO/cGMP Signalkaskade in den Gefäßen für den Blutdruck wurde dabei bereits in zahlreichen Studien gezeigt (15, 17). Da die Messung des Blutdrucks nach PDE-Hemmung uns bisher nur einen indirekten Hinweis auf die Funktion der Widerstandsgefäße lieferte, führten wir Versuche in der isoliert perfundierten Niere zurück. Die isoliert perfundierte Niere ist ein anerkanntes Modell zur Beobachtung der Widerstandsgefäße in der Niere. Es zeigte sich, dass die renale Vasorelaxation hypertensiver Mäuse in Anwesenheit von Sildenafil verbessert war, während die Vasorelaxation normotensiver unbehandelter Mäuse von Sildenafil unbeeinflusst blieb. Die PDE1-Hemmung durch Vinpocetin zeigte keinen verbessernden Effekt auf die renale Vasorelaxation in normotensiven und Ang II-behandelten Mäusen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu einer kürzlich erschienen Studie unserer Arbeitsgruppe, die zeigen konnte, dass die renale Relaxation in Mäusen mit renovaskulärer Hypertonie (Goldblatt-Modell) durch Sildenafil, nicht aber durch Vinpocetin, verbessert werden konnte (36). Die verbesserte renale Vasorelaxation könnte den verstärkten blutdrucksenkenden Effekt von Sildenafil in hypertensiven Bedingungen schon dadurch teilweise erklären, geht man davon aus, dass die Mikrozirkulation der Niere ca. zu 25 % zum totalen peripheren Widerstand beiträgt. Darüber hinaus konnten Studien unter Verwendung des Goldblatt-Modells oder nach direkter Ang II-Infusion zeigen, dass gerade die Wirkung von Ang II in der Niere zur Entstehung von Bluthochdruck beiträgt und dabei durch die PDE5-Hemmung antagonisiert werden kann (88, 92). So konnte Dias et al. eine Normalisierung der Ang II-Spiegel durch Sildenafil in Nieren von Ratten mit renovaskulärer Hypertonie messen (88). Für die Verbesserung des Blutdrucks spielt dabei sicherlich die Regulation der renalen Salzausscheidung durch Ang II und PDE5 eine Rolle, die wiederum eng mit der renalen Gefäßfunktion und renalen Durchblutung verknüpft ist (11). Unsere Ergebnisse konnten einen wichtigen Stellenwert der PDE5 für die renalen Widerstandsgefäße und somit die Blutdruckregulation aufzeigen.

Zu diskutieren bleibt die genaue molekulare Wechselwirkung zwischen Ang II und den Phosphodiesterasen. Die Funktion der PDE1 ist Ca^{2+} /Calmodulin abhängig. Dadurch steht sie als ein vielversprechender Kandidat zur Verstärkung der Ang II-induzierten Vasokonstriktion, die ebenfalls Ca^{2+} /Calmodulin abhängig ist, zur Diskussion (43-45, 51). Dennoch, die vorliegende Arbeit konnte keinen nennenswerten Effekt der PDE1-Hemmung auf den Blutdruck, die Vasorelaxation der A. renalis oder den Tonus der renalen Widerstandsgefäße feststellen. Im Gegenteil, wesentliche Effekt auf die Gefäßfunktion, insbesondere unter Bedingungen erhöhter Ang II-Wirkung, waren nur nach PDE5-Hemmung zu sehen. Einer möglichen Aktivierung von PDE5 durch Ang II als wichtiger Mechanismus der Ang II-induzierten Vasokonstriktion und vaskulären Dysfunktion wurden bereits verschiedene Arbeiten gewidmet (36, 49). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die PDE5 zwar über die Proteinkinase G, jedoch auch im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus direkt über cGMP aktiviert wird (21, 22, 37-42) und dass die

Behandlung mit Ang II die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (NOS III) in der Niere als auch in der Aorta (93-95) steigert und dadurch mit einer vermehrten NO-Produktion einhergeht (94). Für eine vermehrte NO-Produktion durch Ang II spricht auch eine Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe, in der wir erhöhte cGMP-Spiegel im Nierencortex von hypertensiven Mäusen mit einem aktivierten RAS (Goldblatt-Modell) messen konnten (36). Während die NOS-Aktivierung als vasodilatatorische Gegenregulation zur Ang II-induzierten Vasokonstriktion verstanden werden kann, könnte sie jedoch ebenso in einer langfristigen Aktivierung der PDE5 und somit Verstärkung der Ang II Wirkung durch vermehrte cGMP-Deaktivierung resultieren. Ein erhöhtes Aktivitätslevel der PDE5 in der Ang II-induzierten Hypertonie könnte somit den durch uns und andere (36, 49) beobachteten günstigen Effekt der PDE5-Hemmung auf den Blutdruck und die Gefäßfunktion erklären.

Zusammenfassend konnten wir in der vorliegenden Arbeit einen dominanten Beitrag der PDE5 und nicht der PDE1 zur Regulation des Blutdrucks in der Ang II-induzierten Hypertonie zeigen. In der Niere kann die Hemmung der PDE5 durch Sildenafil den renalen Blutfluss verbessern und den erhöhten vaskulären Widerstand in der Ang II-induzierten Hypertonie abmildern, wodurch wir uns einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung des Blutdrucks erklären. Der PDE5-Hemmung kommt in der aktuellen antihypertensiven Therapie noch keine Bedeutung zu, sollte jedoch gerade unter der Berücksichtigung der sich verbessernden renalen Hämodynamik als mögliches primäres Antihypertensivum nicht aus den Augen verloren werden.

Literaturverzeichnis

1. Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI, et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2001;16(6):1189-97.
2. Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC, Townend JN. Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart (British Cardiac Society)*. 2000;83(2):205-9.
3. Yildiz A, Oflaz H, Pusuroglu H, Mercanoglu F, Genchallac H, Akkaya V, et al. Left ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction in chronic hemodialysis patients. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2003;41(3):616-23.
4. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002;106(24):3073-8.
5. Guyton AC. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science*. 1991;252(5014):1813-6.
6. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001;104(4):545-56.
7. Arendshorst WJ, Brannstrom K, Ruan X. Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1999;10 Suppl 11:S149-61.
8. Faubert PF, Chou SY, Porush JG. Regulation of papillary plasma flow by angiotensin II. *Kidney international*. 1987;32(4):472-8.
9. Hall JE, Granger JP. *The American journal of physiology*. 1986;250(5 Pt 2):F917-23.
10. Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, et al. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(8):3521-5.
11. Sparks MA, Stegbauer J, Chen D, Gomez JA, Griffiths RC, Azad HA, et al. Vascular Type 1A Angiotensin II Receptors Control BP by Regulating Renal Blood Flow and Urinary Sodium Excretion. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015.
12. Oliverio MI, Best CF, Kim HS, Arendshorst WJ, Smithies O, Coffman TM. Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *The American journal of physiology*. 1997;272(4 Pt 2):F515-20.
13. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(47):17985-90.
14. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*. 2002;39(2 Pt 2):316-22.
15. Groneberg D, Konig P, Wirth A, Offermanns S, Koesling D, Friebe A. Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation*. 2010;121(3):401-9.
16. Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A, Koesling D. Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(18):7699-704.
17. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;377(6546):239-42.

18. Chen J, Kuhlencordt PJ, Astern J, Gyurko R, Huang PL. Hypertension does not account for the accelerated atherosclerosis and development of aneurysms in male apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double knockout mice. *Circulation*. 2001;104(20):2391-4.
19. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II27-33.
20. Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 1999;135:151-71.
21. Corbin JD, Turko IV, Beasley A, Francis SH. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2000;267(9):2760-7.
22. Juilfs DM, Soderling S, Burns F, Beavo JA. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 1999;135:67-104.
23. Lincoln TM. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacology & therapeutics*. 1989;41(3):479-502.
24. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of cell science*. 2000;113 (Pt 10):1671-6.
25. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(8):307-12.
26. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(23):13176-81.
27. Godecke A, Decking UK, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Godecke S, et al. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circulation research*. 1998;82(2):186-94.
28. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation research*. 2003;93(2):96-105.
29. Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G. Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS letters*. 1991;292(1-2):217-22.
30. Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G, Bohme E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS letters*. 1990;272(1-2):221-3.
31. Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, Schultz G. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS letters*. 1981;132(1):71-4.
32. Russwurm M, Koesling D. Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Molecular and cellular biochemistry*. 2002;230(1-2):159-64.
33. Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH, Valtschanoff JG. Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(20):8961-70.
34. Mergia E, Friebe A, Dangel O, Russwurm M, Koesling D. Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(6):1731-7.
35. Buys ES, Raheer MJ, Kirby A, Shahid M, Baron DM, Hayton SR, et al. Genetic modifiers of hypertension in soluble guanylate cyclase alpha1-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(6):2316-25.
36. Stegbauer J, Friedrich S, Potthoff SA, Broekmans K, Cortese-Krott MM, Quack I, et al. Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. *PloS one*. 2013;8(11):e80674.

37. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circulation research*. 2003;93(4):280-91.
38. Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F, Koesling D. Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *The Journal of cell biology*. 2003;160(5):719-27.
39. Mullershausen F, Lange A, Mergia E, Friebe A, Koesling D. Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. *Molecular pharmacology*. 2006;69(6):1969-74.
40. Rybalkin SD, Rybalkina IG, Shimizu-Albergine M, Tang XB, Beavo JA. PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *The EMBO journal*. 2003;22(3):469-78.
41. Koesling D, Mullershausen F, Lange A, Friebe A, Mergia E, Wagner C, et al. Negative feedback in NO/cGMP signalling. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 5):1119-22.
42. Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Hofmann F, Beavo JA. Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(5):3310-7.
43. Kass DA, Takimoto E, Nagayama T, Champion HC. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovascular research*. 2007;75(2):303-14.
44. Kim D, Rybalkin SD, Pi X, Wang Y, Zhang C, Munzel T, et al. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. *Circulation*. 2001;104(19):2338-43.
45. Huang CY, Chau V, Chock PB, Wang JH, Sharma RK. Mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: requirement of the binding of four Ca²⁺ to calmodulin for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(2):871-4.
46. Sonnenburg WK, Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Kwak KS, Rybalkina IG, Beavo JA. Identification, quantitation, and cellular localization of PDE1 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Methods*. 1998;14(1):3-19.
47. Knight S, Snellen H, Humphreys M, Baylis C. Increased renal phosphodiesterase-5 activity mediates the blunted natriuretic response to ANP in the pregnant rat. *American journal of physiology Renal physiology*. 2007;292(2):F655-9.
48. Sasser JM, Moningka NC, Cunningham MW, Jr., Croker B, Baylis C. Asymmetric dimethylarginine in angiotensin II-induced hypertension. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2010;298(3):R740-6.
49. Kim D, Aizawa T, Wei H, Pi X, Rybalkin SD, Berk BC, et al. Angiotensin II increases phosphodiesterase 5A expression in vascular smooth muscle cells: a mechanism by which angiotensin II antagonizes cGMP signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2005;38(1):175-84.
50. Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(1):26-36.
51. Giachini FR, Lima VV, Carneiro FS, Tostes RC, Webb RC. Decreased cGMP level contributes to increased contraction in arteries from hypertensive rats: role of phosphodiesterase 1. *Hypertension*. 2011;57(3):655-63.
52. Adamo CM, Dai DF, Percival JM, Minami E, Willis MS, Patrucco E, et al. Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(44):19079-83.
53. Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circulation research*. 2003;93(10):907-16.

54. Zhao X, Ho D, Gao S, Hong C, Vatner DE, Vatner SF. Arterial Pressure Monitoring in Mice. *Current protocols in mouse biology*. 2011;1:105-22.
55. Kakoki M, Zou AP, Mattson DL. The influence of nitric oxide synthase 1 on blood flow and interstitial nitric oxide in the kidney. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2001;281(1):R91-7.
56. Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *American journal of physiology Renal physiology*. 2002;282(5):F777-84.
57. Baer PG, Navar LG, Guyton AC. Renal autoregulation, filtration rate, and electrolyte excretion during vasodilatation. *The American journal of physiology*. 1970;219(3):619-25.
58. Mattson DL, Wu F. Control of arterial blood pressure and renal sodium excretion by nitric oxide synthase in the renal medulla. *Acta physiologica Scandinavica*. 2000;168(1):149-54.
59. Majid DS, Omoro SA, Chin SY, Navar LG. Intrarenal nitric oxide activity and pressure natriuresis in anesthetized dogs. *Hypertension*. 1998;32(2):266-72.
60. Broekmans K, Stegbauer J, Potthoff SA, Russwurm M, Koesling D, Mergia E. Angiotensin II-Induced Hypertension Is Attenuated by Reduction of Sympathetic Output in NO-Sensitive Guanylyl Cyclase 1 Knockout Mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2016;356(1):191-9.
61. Bohlen HG, Gore RW, Hutchins PM. Comparison of microvascular pressures in normal and spontaneously hypertensive rats. *Microvascular research*. 1977;13(1):125-30.
62. Borders JL, Granger HJ. Power dissipation as a measure of peripheral resistance in vascular networks. *Hypertension*. 1986;8(3):184-91.
63. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000;36(3):312-8.
64. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1994;24(1):112-29.
65. Brunner HR. Experimental and clinical evidence that angiotensin II is an independent risk factor for cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*. 2001;87(8a):3c-9c.
66. Brunner HR, Laragh JH, Baer L, Newton MA, Goodwin FT, Krakoff LR, et al. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. *The New England journal of medicine*. 1972;286(9):441-9.
67. Cervenka L, Horacek V, Vaneckova I, Hubacek JA, Oliverio MI, Coffman TM, et al. Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension*. 2002;40(5):735-41.
68. Ichihara A, Imig JD, Inscho EW, Navar LG. Interactive nitric oxide-angiotensin II influences on renal microcirculation in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 1998;31(6):1255-60.
69. Patzak A, Lai EY, Mrowka R, Steege A, Persson PB, Persson AE. AT1 receptors mediate angiotensin II-induced release of nitric oxide in afferent arterioles. *Kidney international*. 2004;66(5):1949-58.
70. Stoos BA, Garvin JL. Actions of nitric oxide on renal epithelial transport. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 1997;24(8):591-4.
71. Herrera M, Ortiz PA, Garvin JL. Regulation of thick ascending limb transport: role of nitric oxide. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006;290(6):F1279-84.
72. Neitz A, Mergia E, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T. Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. *The European journal of neuroscience*. 2011;33(9):1611-21.

73. Neitz A, Mergia E, Imbrosci B, Petrasch-Parwez E, Eysel UT, Koesling D, et al. Postsynaptic NO/cGMP increases NMDA receptor currents via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)*. 2014;24(7):1923-36.
74. Neitz A, Mergia E, Neubacher U, Koesling D, Mittmann T. NO regulates the strength of synaptic inputs onto hippocampal CA1 neurons via NO-GC1/cGMP signalling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2015;467(6):1383-94.
75. Kukreja RC, Salloum FN, Das A, Koka S, Ockaili RA, Xi L. Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases. *Experimental and clinical cardiology*. 2011;16(4):e30-5.
76. Mostafa T. Oral phosphodiesterase type 5 inhibitors: nonrectogenic beneficial uses. *The journal of sexual medicine*. 2008;5(11):2502-18.
77. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2005;353(20):2148-57.
78. Oliver JJ, Melville VP, Webb DJ. Effect of regular phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension. *Hypertension*. 2006;48(4):622-7.
79. Oliver JJ, Hughes VE, Dear JW, Webb DJ. Clinical potential of combined organic nitrate and phosphodiesterase type 5 inhibitor in treatment-resistant hypertension. *Hypertension*. 2010;56(1):62-7.
80. Hindmarch I, Fuchs HH, Erzigkeit H. Efficacy and tolerance of vinpocetine in ambulant patients suffering from mild to moderate organic psychosyndromes. *International clinical psychopharmacology*. 1991;6(1):31-43.
81. Duinen MV, Reneerkens OA, Lambrecht L, Sambeth A, Rutten BP, Os JV, et al. Treatment of Cognitive Impairment in Schizophrenia: Potential Value of Phosphodiesterase Inhibitors in Prefrontal Dysfunction. *Current pharmaceutical design*. 2015;21(26):3813-28.
82. Jeon KI, Xu X, Aizawa T, Lim JH, Jono H, Kwon DS, et al. Vinpocetine inhibits NF-kappaB-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(21):9795-800.
83. Wu MP, Zhang YS, Xu X, Zhou Q, Li JD, Yan C. Vinpocetine Attenuates Pathological Cardiac Remodeling by Inhibiting Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. 2017.
84. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological reviews*. 2000;52(1):11-34.
85. Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, et al. PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension*. 2002;40(6):866-71.
86. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(8):1916-23.
87. Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circulation research*. 2002;90(11):1205-13.
88. Dias AT, Cintra AS, Frossard JC, Palomino Z, Casarini DE, Gomes IB, et al. Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. *Journal of translational medicine*. 2014;12:250.
89. Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarng Wang C, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 1998;13:170-6.

90. Ramseyer VD, Ortiz PA, Carretero OA, Garvin JL. Angiotensin II-mediated hypertension impairs nitric oxide-induced NKCC2 inhibition in thick ascending limbs. *American journal of physiology Renal physiology*. 2016;ajprenal.00473.2015.
91. Cavalcanti CO, Alves RR, de Oliveira AL, Cruz JC, de Franca-Silva MS, Braga VA, et al. Inhibition of PDE5 Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. *Frontiers in physiology*. 2016;7:15.
92. Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*. 1992;20(6):763-7.
93. Hennington BS, Zhang H, Miller MT, Granger JP, Reckelhoff JF. Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*. 1998;31(1 Pt 2):283-8.
94. Chin SY, Wang CT, Majid DS, Navar LG. Renoprotective effects of nitric oxide in angiotensin II-induced hypertension in the rat. *The American journal of physiology*. 1998;274(5 Pt 2):F876-82.
95. Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1998;274(1 Pt 1):C214-20.

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Betreuern Herr PD. Dr. med. Johannes Stegbauer und Prof. Dr. med. Lars Christian Rump, die mich in meinem Forschungsvorhaben unterstützt und mir stets die notwendige Freiheit gelassen haben, eigene Ideen zu verwirklichen und neue Methoden zu etablieren.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der experimentellen Nephrologie, Blanka Duvnjak, Christina Schwandt und Nicola Kuhr, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen und mir das Laborhandwerk beibrachten.

Dr. rer. nat. Evanthia Mergia danke ich für ihre große Hilfe bei der Durchführung der Western Blots in Bochum. Mein besonderer Dank gilt auch Dr. med. Henning Hoch dafür, dass er mich in die Geheimnisse der HPLC eingeführt hat, Dr. med. Sebastian Potthoff danke ich herzlichst für die Demonstrierung der Operationen an der Maus.

Für die unendlich vielen Tipps, die einem den Laboralltag wesentlich erleichtern bzw. erst möglich machen, standen mir immer Dr. rer. nat. Lydia Hering, Dr. rer. nat. Raphael Haase, Dr. med. Eva Königshausen, Dr. med. Susanne Mende und Dr. med. Asena Uyani zur Verfügung.

Mein bisheriger Weg wäre jedoch nicht möglich gewesen, hätte ich nicht von meinen Eltern immer die notwendige Unterstützung zur Umsetzung meiner privaten und beruflichen Ziele bekommen. Ich danke Euch zutiefst für Euer Vertrauen und Eure Fürsorge, die Ihr mir immer entgegengebracht habt.

Freudenberg, 23.04.2017