

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr.med. Malte Kelm

Effekte des oxidativen Stresses auf die kardiale und vaskuloendotheliale  
Funktion in genetisch veränderten Mäusen: Fokussierung auf den  
eNOS/sGC-Signalweg

Dissertation

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

vorgelegt von

Lisann Christine Krause

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Bodo Levkau

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Erkens, R., Kramer, CM., Lückstädt, W., Panknin, C., Krause, L., Weidenbach, M., Dirzka, J., Krenz, T., Mergia, E., Suvorava, T., Kelm, M., Cortese-Krott, MM.(2015,Dec), Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function. *Free Radic Biol Med.* 89:906-17

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen auch heute noch zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Auf pathophysiologischer Ebene stellt die Arteriosklerose einen wesentlichen Faktor in der Entstehung dieser Erkrankungen dar. Zu der kardiovaskulären Gesundheit maßgeblich beitragend sind eine intakte Endothelfunktion sowie die Reduktion von Risikofaktoren. Das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion als auch gesteigerter oxidativer Stress zählen daher zu den grundlegenden Mechanismen in der Pathogenese der Arteriosklerose. Für eine adäquate endotheliale Homöostase sind die Funktionalität der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) mit ihrem Produkt Stickstoffmonoxid (NO) und die Downstreammechanismen des löslichen Guanylatcyclase (sGC) Rezeptorsignalweges hauptverantwortlich. Die Untereinheiten (UE) alpha 1 und 2 der sGC sind Teil dieses Rezeptorsignalweges, dessen physiologische Funktion bisher nur unzureichend bekannt ist.

**Ziel der Arbeit:** Charakterisierung und Analyse der endothelialen und kardialen Funktion *in vivo* bei arterieller Hypertonie sowie bei gesteigertem oxidativem Stress mit Fokus auf den eNOS/sGC Signalweg in sGC alpha1/2 Knock Out (KO) Mausmodellen.

**Methode:** Einflüsse des arteriellen Hypertonus sowie Wirkungen des oxidativen Stresses auf Signalkaskaden des eNOS/sGC Signalweges werden mittels Angiotensin-II-vermittelter Induktion in C57BL/6J (WT) Mäusen untersucht. Weiterhin wird die endotheliale Funktion in 12 Monate alten eNOS KO Mäusen analysiert. Mittels Untersuchung der Nrf2 KO Maus, werden die Effekte von erhöhtem oxidativem Stress auf die kardiale Funktion analysiert. Durch kontinuierliche Infusion von Angiotensin II mittels implantierter Pumpen wird in WT, sGC alpha 1 – als auch sGC alpha 2- KO Mäusen die physiologische Funktion der sGC UE auf das kardiovaskuläre System charakterisiert. Dies wird mittels hochauflösender Ultraschalltechnologie echokardiographisch sowie via Messung der Flussvermittelten Vasodilatation (FMD) bestimmt.

**Ergebnisse:** Der Einfluss von Angiotensin II auf das kardiovaskuläre System zeigt sich in den unterschiedlichen KO Modellen wie folgt: Nach einem Zeitraum von 13 Tagen zeigen WT eine diastolische Dysfunktion ohne das Vorliegen einer linksventrikulären Hypertrophie sowie eine endotheliale Dysfunktion, validiert mittels FMD-Messung. In alpha1 KO Mäusen kann ein kardiales Remodeling mit linksventrikulärer Hypertrophie und diastolischer Dysfunktion beobachtet werden, wohingegen sich die endotheliale Funktion erhalten zeigt. Alpha2 KO Tiere zeigen eine linksventrikuläre (LV) Hypertrophie mit erhaltener LV systolischer und diastolischer Funktion als auch intakter endothelialer Funktion. In eNOS KO Mäusen kann keine intakte endotheliale Antwort dokumentiert werden, wohingegen Nrf2 KO Mäuse eine manifeste diastolische Dysfunktion aufweisen.

**Schlussfolgerung:** Erstmals konnten den UE der sGC assoziierte Funktionen zugeordnet werden, die einen wesentlichen Einfluss auf das kardiovaskuläre System unter gesteigertem oxidativem Stress und arterieller Hypertonie nehmen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die molekularbiologischen und biochemischen Kompensationsmechanismen näher zu klassifizieren.

## Abstract

**Background:** Cardiovascular diseases are still one of the main reasons for death in the western world. On a pathophysiological level, arteriosclerosis is supposed to be one of the main factors concerning the development of these diseases. Thus, an intact endothelial function and the reduction of risk factors are needed to maintain cardiovascular health. The presence of endothelial dysfunction and increased oxidative stress are part of the fundamental mechanisms concerning the pathogenesis of arteriosclerosis. To get adequate endothelial homeostasis, the functionality of eNOS and its products nitrogen monoxide (NO) and the downstream mechanisms of the signal pathway of the sGC are essential. The subunits alpha1 and alpha2 of the sGC are part of this signal pathway, which physiological function is not sufficiently clear so far.

This study aims at the characterization and analysis of the endothelial and cardiac function in vivo during arterial hypertension and increased oxidative stress focusing on the eNOS/sGC signal pathway in sGC alpha1 and sGC alpha2 knock out (KO) mice.

**Methods:** Influences of arterial hypertension as well as the effect of oxidative stress on the signal pathway of the eNOS/sGC are examined using the induction of angiotensin II. Furthermore, 12-month-old eNOS KO mice are examined due to endothelial function. Besides, the influence of increased oxidative stress on the cardiac function is analyzed in Nrf2 KO mice. The physiological function of the sGC on the cardiovascular system is characterized by using a continuous infusion of Angiotensin II by implanted pumps in WT, sGC alpha1 and sGC alpha2 KO mice. For this, high-resolution ultrasound using echocardiography and measurement of flow-mediated dilation (FMD) is performed.

**Results:** The influence of Angiotensin II on the cardiovascular system of the different KO mice is depicted as follows: After 13 days, WT show a diastolic dysfunction without the existence of hypertrophy of the left ventricle. Endothelial dysfunction is presented, validated using FMD. In alpha1 KO mice, a cardiac remodeling with hypertrophy of the left ventricle and diastolic dysfunction is observed, whereas endothelial function is preserved. Alpha2 KO mice show hypertrophy of the left ventricle with a preserved systolic and diastolic function as well as an intact endothelial function. In eNOS KO, an entire endothelial function couldn't be demonstrated, whereas Nrf2 KO mice show a manifest diastolic dysfunction.

**Conclusion:** For the first time, it is possible to assign protective functions to the different subunits of the sGC, which have an essential impact on the cardiovascular system during oxidative stress and arterial hypertension. Further tests are necessary to classify molecular biological and biochemical compensatory mechanisms.

## Abkürzungsverzeichnis

### A

*ACE* Angiotensin-Converting-Enzyme  
*ADH* Antidiuretisches Hormon  
*AKT* Proteinkinase B  
*ANP* atriales natriuretisches Peptid  
*ARE* antioxidant response element  
*AT* Angiotensin

### B

*BH<sub>4</sub>* (6R-) 5,6,7,8 Tetrahydrobiopterin  
*BNP* B-Typ natriuretisches Peptid  
*bZip* basic leucine zipper

### C

*CaM* Calmodulin  
*cAMP* cyclisches Adenosinmonophosphat  
*CFTR* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
*cGMP* cyclisches Guanosinmonophosphat  
*CNC* cap 'n' collar  
*CNP* C-Typ natriuretisches Peptid  
*CO* Kohlenmonoxid, Cardiac output

### D

*DME* drug-metabolizing enzyme  
*DT* Dezelerationszeit

### E

*EDHF* endothelium-derived hyperpolarizing factor  
*EDRF* Endothelium Derived Relaxing Factor  
*EDV* enddiastolisches Volumen  
*EF* Ejektionsfraktion  
*EKG* Elektrokardiogramm  
*ESV* endsystolisches Volumen

### F

*FAD* Flavinadeninindinukleotid  
*FMD* Fluss vermittelte Vasodilatation, Flavinmononukleotid  
*FS* Fractional Shortening

### G

*GPx* Glutathionperoxidase  
*GSH* Glutathion  
*GSSG* Glutathiondisulfid  
*GST* Glutathion-S-Transferase  
*GTP* Guanosintriphosphat

## H

*H<sub>2</sub>O* Wasser  
*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* Wasserstoffperoxid  
*HCl* Chlorwasserstoff  
*HR* Heart Rate

## I

*iNOS* induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase  
*IRAG* Inositoltriphosphat Rezeptor assoziiertes cG-Kinase-Substrat  
*IVCT* Isovolumetrische Kontraktionszeit  
*IVRT* Isovolumetrische Relaxationszeit  
*IVS,d* interventrikuläres Septum in Diastole  
*IVS,s* interventrikuläres Septum in Systole

## K

*Keap1* Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology-associated protein  
*KLF* Krüppel-like factor

## L

*L-FMC* low-flow-mediated vasoconstriction  
*LV* linker Ventrikel, linksventrikulär  
*LVH* linksventrikuläre Hypertrophie  
*LVPW* Left Ventricular Posterior Wall

## M

*MAP* mitogen-activated protein  
*MLCP* Myosin-leichte-Kette-Phosphatase  
*MPI* Myokardialer Performance Index  
*mTOR* mechanistic Target of Rapamycin  
*MVET* Mitralklappen-Ejektionszeit  
*Mw* Mittelwert

## N

*NaCl* Natrium-Chlorid  
*NADPH* Nikotinamidadenindinukleotidphosphat  
*nNOS* neuronale Stickstoffmonoxidsynthase  
*NOX* NADPH-Oxidase  
*NP* Natriuretische Peptide  
*NQO1* NAD(P)H:quinone Oxidoreduktase 1  
*Nrf2* nuclear factor (erythroid-derived 2)- like 2

## O

*O<sub>2</sub>* Sauerstoff  
*O<sub>2</sub><sup>-</sup>* Superoxidanion  
*oxLDL* endothelial oxidized low-density lipoprotein

## P

*PAS* Per/Arnt/Sim  
*PDE* Phosphodiesterasen  
*pGC* particulate GC  
*PKA* Proteinkinase A

*PKG* Proteinkinase, Proteinkinase G  
*PLB* Phospholamban  
*Prx* Peroxiredoxin  
*PSD-95-Protein* postsynaptic density protein -95  
*PWV* Puls-Wellen-Geschwindigkeit

## **R**

*RAAS* Renin-Angiotensin-Aldosteron-System  
*RNS* Reaktive Stickstoffspezies

## **S**

*SD* Standardabweichung  
*sGC* soluble guanylate cyclase , lösliche Guanylatcyclase  
*SK* Schallkopf  
*SOD* Superoxiddismutase  
*SV* stroke volume, Schalgvolumen

## **T**

*tpA* tissue plasminogen activator  
*Trx* Thioredoxin  
*TXNIP* Thioredoxin-interacting protein

## **U**

*uPA* Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator

## **V**

*VASP* Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein  
*VEGF* Vascular Endothelial Growth Factor

## **W**

*WT* Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis .....	VI
1.   Einleitung.....	1
1.1   Einführung.....	1
1.2   Molekulare Mechanismen .....	3
1.2.1   Expression, Signalweg und Regulation der endothelialen NO-Synthase .....	3
1.2.2   Aufbau, Signalweg und Regulation der <i>soluble Guanylate Cyclase</i> .....	7
1.2.3   Einfluss von Angiotensin II auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und Wechselwirkungen mit NO und sGC.....	10
1.2.4   Rolle der NADPH-, Xanthin-Oxidasen, Mitochondrien und eNOS-Entkopplung im Rahmen der Produktion von oxidativem Stress .....	12
1.2.5   Regulation und Aufgaben des Nuclear factor(erythroid-derived)-2-like 2-Transkriptionsfaktor.....	14
1.2.6   Übersicht der Mausmodelle.....	16
1.3   Ziele der Arbeit.....	18
2.   Material und Methoden .....	19
2.1   Material.....	19
2.2   Methodik.....	20
2.3   Statistik.....	28
3.   Ergebnisse .....	29
3.1  Einfluss von Angiotensin II auf die vaskuläre und kardiale Funktion .....	29
3.2   Echokardiographische Beurteilung der vaskulären und kardialen Funktion von eNOS KO im Alter.....	46
3.3   Echokardiographische Beurteilung der kardialen Funktion von Nrf2 KO.....	49
4.   Diskussion .....	52
4.1   Einfluss von Angiotensin II auf die kardiale Funktion .....	54
4.2   Einfluss von Angiotensin II auf die vaskuläre Funktion .....	57
4.3   Einfluss von Angiotensin II auf die PWV .....	60
4.4   Untersuchung der kardialen und vaskulären Funktion in eNOS-KO-Mäusen.....	61
4.5   Untersuchung der kardialen Funktion in Nrf2 KO Mäusen .....	63
4.6   Stellenwert der Echokardiographie und der FMD-Messung.....	64
4.7   Methodenkritik .....	65
4.8   Ausblick.....	67

5.   Literaturverzeichnis.....	68
6.   Danksagung	

# 1. | Einleitung

## 1.1 | Einführung

Bedingt durch den demographischen Wandel steigt die Lebenserwartung der Bevölkerung stetig an. Eine Verbesserung diagnostischer Maßnahmen sowie neue therapeutische Strategien in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen tragen maßgeblich dazu bei (Jensen, 2016). Als Risikofaktoren für die Entstehung und Progredienz kardiovaskulärer Erkrankungen gelten eine fehlerhafte Ernährung, ein arterieller Bluthochdruck, Rauchen, Übergewicht sowie Bewegungsmangel (Mamudu et al., 2016, Garcia et al., 2016). Aus diesem Grund befasst sich die Forschung weiterhin intensiv mit der Prävention von kardiovaskulären Ereignissen und in diesem Zusammenhang mit den hiermit verbundenen biologischen und biochemischen Prozessen.

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind zumeist multifaktoriell bedingt (Mamudu et al., 2016). So führt ein arterieller Hypertonus beispielsweise zu strukturellen Veränderungen der peripheren Gefäße und Koronararterien und somit nachfolgend zu einer Druckbelastung des Herzens (siehe Abbildung 1) (Griendling and FitzGerald, 2003, Landmesser and Harrison, 2001).

Eine Vielzahl von Faktoren, insbesondere der *soluble guanylate cyclase* bzw. lösliche Guanylatcyclase- (sGC) Rezeptor, die Entstehung von oxidativem Stress und die eNOS-Entkopplung nehmen auf biochemischer Ebene Einfluss auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.

Um die Komplexität dieser Erkrankungen in der translationalen Forschung untersuchen zu können, bedarf es unterschiedlicher Methoden und Modelle. Auf diese Weise ist es möglich, die Effekte des arteriellen Hypertonus mittels Dauerinfusion von Angiotensin II zu simulieren und damit die kardiovaskulären Auswirkungen zu evaluieren (Prasad et al., 2016, Mergia et al., 2006). Angiotensin II gilt als stärkster endogener Vasokonstriktor (Unger, 2008) und beeinflusst somit maßgeblich die vaskuläre Funktion. Gleichzeitig beeinflusst Angiotensin II kardiale Remodelingprozesse (Dang et al., 2015).

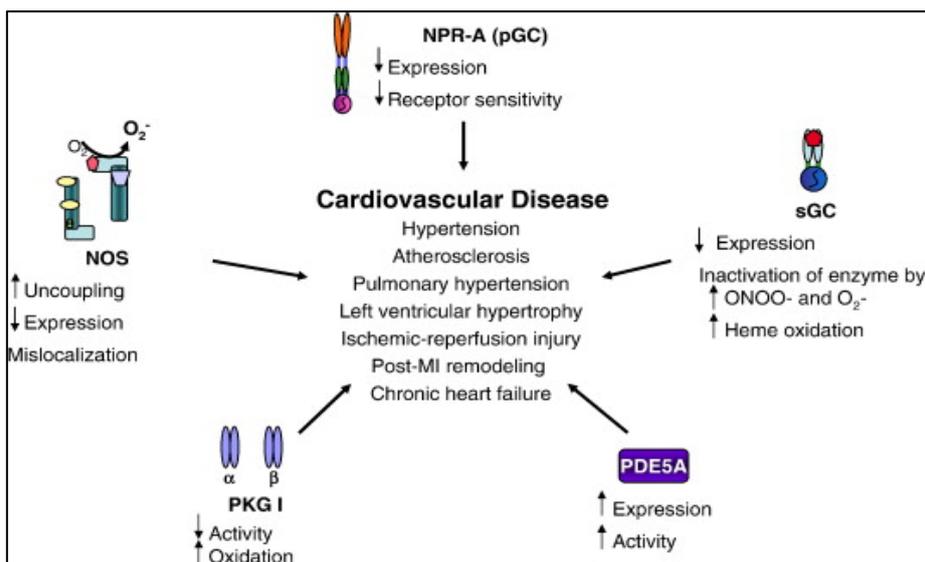
In der vorliegenden Arbeit soll ein besonderes Augenmerk auf die *In-vivo*-Beurteilung verschiedener knock out (KO)-Mäuse im Hinblick auf ihre kardiale und endotheliale Funktion unter kardiovaskulären Risikofaktoren gelegt werden (siehe Abbildung 9). Wenngleich für die einzelnen Entitäten unterschiedliche Modelle zur Verfügung stehen, macht dies jedoch auch deutlich, dass *In-vivo*-Versuche unabdingbar sind, um eine Evaluation dieser komplexen Mechanismen zu erhalten. Die Vielzahl dieser Modelle weist gleichwohl auch daraufhin, dass die Regulation des Gefäßtonus und ebenso die kardiovaskulären Erkrankungen multifaktoriell beeinflusst werden.

Zur Evaluation der endothelialen Funktion und damit zur Funktionalität der eNOS sowie des NO/sGC-Signalweges stehen unterschiedliche Modelle zur Verfügung (Versari et al., 2009).

Die Regulation des Gefäßtonus erfolgt durch das Zusammenspiel von Angiotensin II, NO, dem löslichen Guanylatcyclase (sGC)-Signalweg und dem Sympathikus.

Alterungsprozesse gehen mit einer erhöhten Produktion oder Akkumulation von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) einher, die bedingt durch toxische Prozesse, Auswirkungen auf die Funktionalität der Gefäße und das Herz haben können (Rochette et al., 2013). Die vermehrte Produktion von ROS ist insbesondere mit der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion assoziiert. Eine Reduktion der Funktionalität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und damit eine reduzierte Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese kann zu einer Funktionsstörung des Gefäßendothels führen mit einer folgenden verminderten Regulation der Gefäßweitenregulierung und Gefäßpermeabilität (Griendling and FitzGerald, 2003).

Des Weiteren sollen die Auswirkungen des oxidativen Stresses bei Nrf2 KO Mäusen auf das kardiale System eruiert werden. Als Vergleichsgruppe dienen Analysen bzw. Ergebnisse der C57BL/6J, welche im weiteren Verlauf als Wildtypen (WT) bezeichnet werden und der eNOS-KO-Maus.



**Abb. 1: Ursachen kardiovaskulärer Erkrankungen (Tsai and Kass, 2009)**

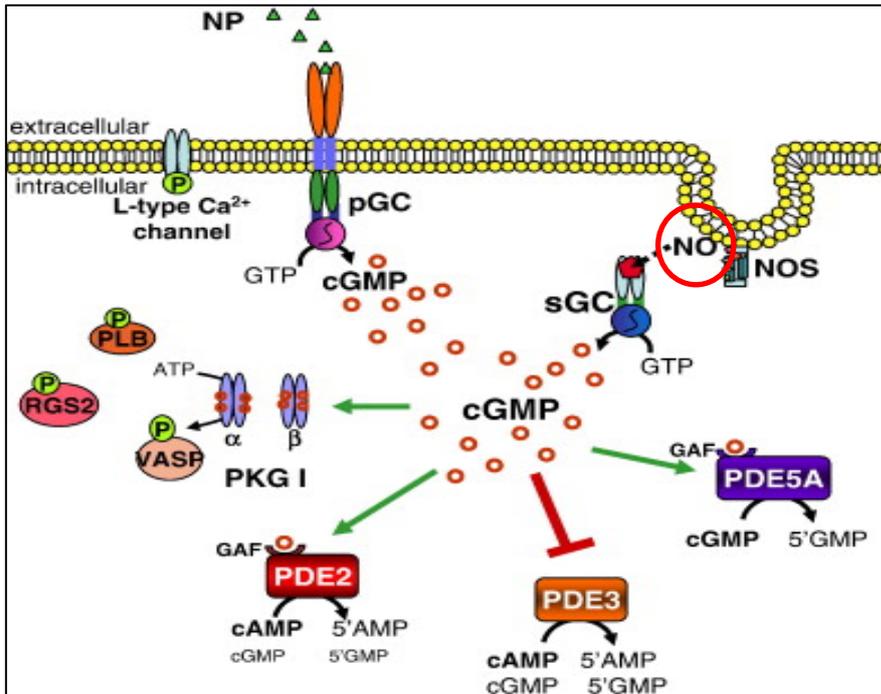
*Darstellung möglicher Einflussfaktoren (Rezeptoren, Enzyme) auf die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen.*

## 1.2 | Molekulare Mechanismen

### 1.2.1 | Expression, Signalweg und Regulation der endothelialen NO-Synthase

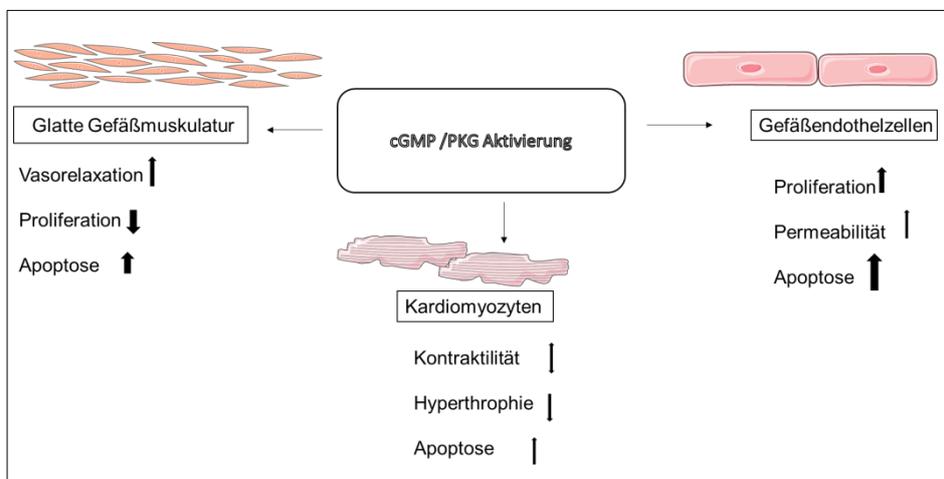
Im Jahr 1998 wurde Ferid Murad, Louis J. Ignarro und Robert F. Furchgott für die Entdeckung des Signalmoleküls NO der Nobelpreis verliehen (Derentowicz et al., 2000, Furchgott and Zawadzki, 1980). Bevor NO als Signalmolekül bei der Gefäßrelaxation identifiziert wurde, war die Annahme vorherrschend, dass ein vom Endothel freigesetzter Faktor, der sogenannte *Endothelium-Derived RelaxingFactor* (EDRF), existiere, der für die Regulation des Gefäßtonus mitverantwortlich sei (Ignarro et al., 1987).

NO wird eine zentrale Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen zugesprochen. Das Molekül nimmt Einfluss auf die Vasodilatation, die neuronale Transmission, die Immunmodulation sowie auf die kardiale Kontraktionsfähigkeit und die Hemmung der Plättchenaggregation (siehe Abbildung 3) (Lei et al., 2013). Die Synthese von NO findet durch NO-Synthasen statt. Das gebildete NO diffundiert anschließend von einer Zelle zur Nachbarzelle, beispielsweise von einer Endothelzelle zur glatten Muskelzelle. Dort bindet es an die lösliche Guanylatcyclase (sGC). In der Folge kommt es zu einer Zunahme des intrazellulären cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Spiegels und schließlich zu einer Aktivierung unterschiedlicher Faktoren wie cGMP-abhängigen Proteinkinasen, cGMP-abhängigen Phosphodiesterasen oder cGMP-regulierten Ionenkanäle (Mergia et al., 2006), die letztendlich eine Vasodilatation des Gefäßes bewirken (siehe Abbildung 2).



**Abb. 2: cGMP-Signalweg**

Die Bildung von cGMP wird durch die pGC oder die sGC ermöglicht, aktiviert durch natriuretische Peptide (NP) oder NO. cGMP führt anschließend zu einer Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) und aktiviert (grüner Pfeil) oder hemmt (roter Pfeil) weitere Phosphodiesterasen (PDE). PDE2 und PDE3 katabolisieren sowohl cGMP als auch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), die PDE5 ist hingegen spezifisch für cGMP. Die PKG1 phosphoryliert verschiedene Proteine wie Phospholamban (PLB), das vasodilatatorisch-stimulierte Phosphoprotein (VASP) sowie RGS2 und den L-Typ-Calcium-Kanal (Tsai and Kass, 2009).



**Abb. 3: Effekte der Aktivierung von cGMP-PKG auf verschiedene Zelltypen**

In glatten Muskelzellen führt die Produktion von cGMP zur Vasorelaxation, einer Abnahme der Proliferation und einer vermehrten Apoptose, in Endothelzellen zu einer Zunahme der Proliferation und in Kardiomyozyten zu einem antihypertrophen Effekt (modifiziert nach Tsai and Kass, 2009).

Dysfunktionen innerhalb des cGMP-Signalweges sind mit der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert. Der cGMP-Signalweg spielt in folgenden Geweben eine zentrale Rolle:

- im Endothel;
- in vaskulären glatten Muskelzellen;
- in Kardiomyozyten.

Eine Aktivierung der cGMP-PKG-Kaskade ruft im Gefäßendothel eine Zellproliferation und eine erhöhte Gefäßpermeabilität hervor. In vaskulären glatten Muskelzellen kommt es zu einer Hemmung der Zellproliferation und zu einer Vasorelaxation. In Kardiomyozyten wird bei der Aktivierung des cGMP-PKG-Signalweges die kardiale Hypertrophie gehemmt und die Kontraktilität des Herzens gefördert. In allen drei oben genannten Geweben vermittelt der cGMP-PKG Signalweg die Zelloptose (siehe Abbildung 3) (Tsai and Kass, 2009).

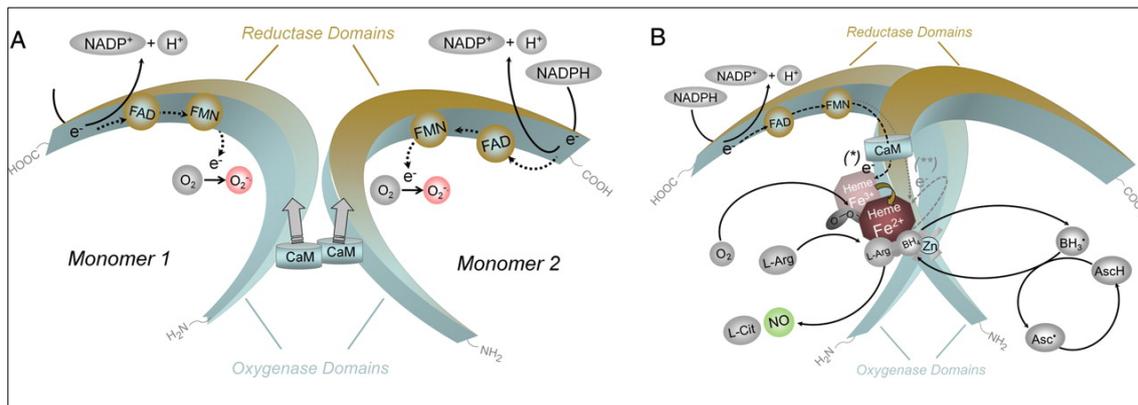
### **Isoformen der NO-Synthase, Vorkommen und Regulation**

Das Signalmolekül NO wird enzymatisch aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert (Bredt and Snyder, 1994). Neben der Aminosäure L-Arginin werden molekularer Sauerstoff sowie die Kofaktoren Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMD) und (6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) benötigt (Forstermann and Sessa, 2012). Für die enzymatische Reaktion stehen drei verschiedene Isoformen zur Verfügung, die als Homodimere vorliegen:

- die endotheliale NO-Synthase (eNOS);
- die induzierbare NOS (iNOS);
- die neuronale NOS (nNOS) (Forstermann et al., 1991).

Diese Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Vorkommens, ihrer Charakteristika und ihrer NO-Syntheserate. Ihre Namen gehen auf die Gewebe zurück, in denen sie hauptsächlich exprimiert und isoliert werden konnten: die eNOS ist vor allem in Endothelzellen und in Thrombozyten sowie in glatten Muskelzellen und in Kardiomyozyten präsent (Lei et al., 2013), die nNOS in Nervenzellen und die iNOS in Makrophagen sowie in neutrophilen Granulozyten (Forstermann et al., 1991). Die eNOS und nNOS werden konstitutiv exprimiert, des Weiteren werden sie calciumabhängig reguliert (Hanafy et al., 2001, Klein, 2002). Alle drei Isoformen binden Calmodulin (CaM) wie auch Häm (Forstermann and Sessa, 2012). Liegt in der Zelle eine geringe Konzentration an Calcium vor, zeigen eNOS und nNOS eine geringe Affinität zu CaM und sind katalytisch inaktiv (Bredt and Snyder, 1990, Fulton et al., 1999). Eine calciumunabhängige Aktivierung der eNOS ist dennoch durch die Proteinkinase AKT, die zu einer Phosphorylierung der eNOS und somit zur Aktivierung der Synthase führt, möglich (Fulton et al., 1999). Die iNOS wird hingegen calciumunabhängig aktiviert. Im Vergleich zu den anderen beiden NOS-Formen verfügt die iNOS über eine konstante Syntheserate (Klein, 2002).

Die eNOS setzt sich aus zwei Monomeren bestehend aus jeweils einer Reduktase- und Oxygenase-Domäne zusammen (siehe Abbildung 4) (Chen et al., 2014). Für die Synthese von NO ist ein Elektronentransfer von NADPH über FAD und FMD in der reduzierenden Domäne notwendig. Dabei kann bis zu einem bestimmten Grad molekularer Sauerstoff zu Superoxiden (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) reduziert werden. Die Synthese von NO findet bei ausreichender Anwesenheit des Substrates L-Arginin und des Kofaktors BH<sub>4</sub> unter Bildung des Nebenproduktes L-Citrullin statt (Stuehr et al., 2001).



**Abb. 4: Darstellung des Aufbaus der eNOS**

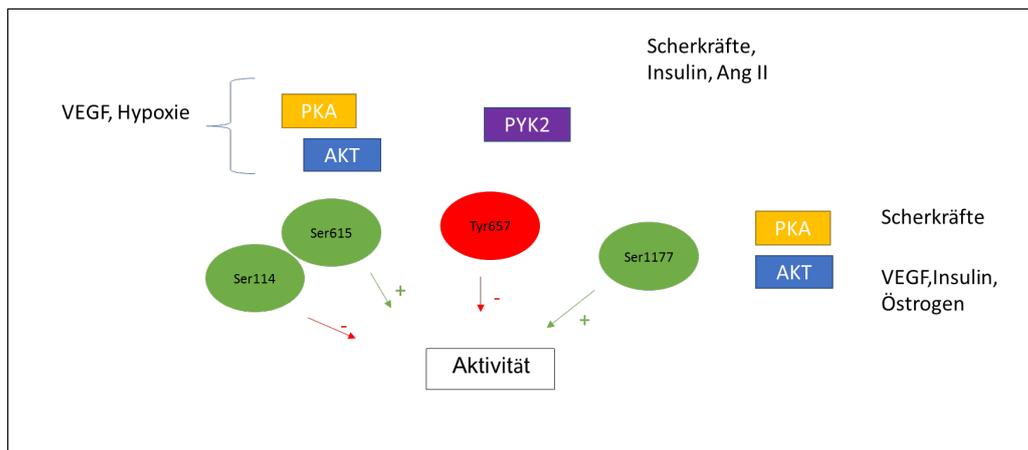
Die eNOS besteht aus zwei Monomeren mit jeweils einer Reduktase- und Oxygenase-Domäne. Es findet ein Elektronentransfer über NADPH, FAD und FMN statt. Eine Dimerisierung des Enzyms erfolgt durch CaM sowie weitere Kofaktoren; nur so kann die Produktion von NO gewährleistet werden (aus Forstermann and Sessa, 2012).

### Endotheliale NO-Synthase-Vorkommen und Signalweg

Neben der Expression endothelialer NOS in Endothelzellen findet sich auch eine Expression in Kardiomyozyten (Forstermann et al., 1994, Umar and van der Laarse, 2010). Den bedeutendsten physiologisch bedingten Faktor im Hinblick auf eine NOS-Aktivierung stellen Scherkräfte (*shear stress*) dar, die auf das Gefäß einwirken (Fleming and Busse, 2003). Diese bewirken eine Phosphorylierung des Enzyms. Durch Scherkräfte kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase B (AKT) und somit zu einer Phosphorylierung (siehe Abbildung 5) (Fleming, 2010).

Die eNOS besitzt verschiedene Serin-, Threonin- und Tyrosinreste, die mögliche Phosphorylierungsstellen mit entsprechenden Stimuli bieten.

Zu den Stimuli der Phosphorylierungsstellen zählen Scherkräfte und Östrogen sowie der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), Insulin oder Bradykinin (Fleming and Busse, 2003).



**Abb. 5: Einflussfaktoren auf die eNOS-Signalkaskade**

Aktivierung der eNOS durch unterschiedliche Faktoren über eine Vielzahl an Signalwegen (orientiert an Fleming, 2010).

### 1.2.2 | Aufbau, Signalweg und Regulation der *soluble Guanylate Cyclase*

Der NO/sGC-Signalweg spielt eine zentrale Rolle im kardiovaskulären System. Hier führt er in erster Linie zu einer Vasodilatation (Axelsson et al., 1979). Die *soluble Guanylate Cyclase* (sGC) ist ein Schlüsselenzym in der Signaltransduktion von NO. Ihre Aufgabe besteht in der Konversion von Guanosintriphosphat (GTP) in den *second messenger* cGMP (cGMP). Die sGC befindet sich im Zytosol. Neben der sGC existiert zudem die membranständige GC (*particulate* GC, pGC). Die pGC dient als Rezeptor für atriales, B-Typ- und C-Typ-natriuretisches Peptid (ANP, BNP, CNP). Die sGC hingegen bezeichnet einen Rezeptor für gasförmige Liganden (NO und Kohlenmonoxid (CO)).

Bei der sGC handelt es sich um ein heterodimeres Enzym, das sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt, die beide für die katalytische Funktion essentiell sind. Sie setzt sich aus einer größeren  $\alpha$ - und einer kleineren  $\beta$ -Untereinheit zusammen (Harteneck et al., 1990). Grundsätzlich lassen sich zwei aktive Isoformen der sGC unterscheiden:

- sGC $_{\alpha1\beta1}$
- sGC $_{\alpha2\beta1}$

Die sGC $_{\alpha1\beta1}$  kommt vor allem in Gefäßen vor und übersteigt in ihrem Vorkommen die sGC $_{\alpha2\beta1}$ . Sie befindet sich im Zytosol (Russwurm et al., 2001) und ist für ca. 90 % der cGMP-Bildung verantwortlich (Broekmans et al., 2015). Die  $\alpha_1$ -Untereinheit kommt als einzige Untereinheit in Blutplättchen vor und ruft eine NO-induzierte Plättchenaggregation hervor. Auch im aortalen Gewebe überwiegt die  $\alpha_1$ -Untereinheit, dennoch findet sich hier mit einem Anteil von ca. 6 % auch die  $\alpha_2$ -Untereinheit. Sie bewirkt ebenfalls eine Vasorelaxation, wenngleich höhere NO-Konzentrationen bei der Abwesenheit der  $\alpha_1$ -Untereinheit erforderlich sind (Mergia et al., 2006). Die sGC $_{\alpha2\beta1}$  befindet sich vor allem im Gehirn und scheint eine Rolle bei der synaptischen Transmission zu spielen. Sie ist über die C-terminale Aminosäure der  $\alpha_2$ -Untereinheit mit dem *postsynaptic density protein-95* (PSD-95-Protein) assoziiert und an der Membran lokalisiert (Russwurm et al., 2001). Unter anderem kommt sie auch im Lungen- und Herzgewebe vor (Mergia et al., 2003).

Die Struktur der sGC lässt sich in verschiedene Domäne unterteilen: Die  $\beta_1$ -Untereinheit besteht aus einer N-terminalen Häm-bindenden Domäne mit Histidin105 als Häm-Ligand, einer Per/Arnt/Sim (PAS)-Domäne, einer Coiled-Coil-Domäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne (Derbyshire and Marletta, 2012). Über die Häm-Domäne können NO und CO gebunden werden. Es handelt sich hierbei um ein fünffach koordiniertes Häm mit einem zweiwertigen Eisen und einem Histidin an der fünften Koordinierungsstelle (Stone and Marletta, 1994). Es finden sich Homologien des N-Terminus der  $\alpha_1$ -Untereinheit zur  $\beta_1$ -Untereinheit; hier fehlt allerdings der Histidin-Ligand (Zhong et al., 2011). Die katalytische Domäne der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit ist für die Bildung des Heterodimers und somit für die Synthese von cGMP entscheidend. NO bindet an die sechste Koordinierungsstelle des Hämeisens, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Häms und zur Bildung eines Nitrosyl-Häm-Komplexes, einer Transduktion der Änderung an die katalytische Domäne und einer bis zu 200-fach gesteigerten Aktivierung des Enzyms kommt (Ignarro et al., 1982, Koesling et al., 2004). Die sGC kann sich in zwei verschiedenen Zuständen befinden:

- in der NO-sensitiven reduzierten Form sowie
- in der NO-nicht sensitiven oxidierten/Häm-freien Form, in der es NO nicht mehr möglich ist, eine Aktivierung der sGC zu bewirken.

Ein Übergang von der NO-sensitiven in die NO-nicht sensitive Form trägt zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei. Das Redox-Gleichgewicht ist entscheidend mit der NO-Bioverfügbarkeit verbunden und nimmt Einfluss auf die kardiovaskuläre Homöostase (Tawa and Okamura, 2016). Oxidativer Stress kann eine Störung des Redox-Gleichgewichtes verursachen. Es folgt eine Veränderung des Häms der sGC mit nachfolgender Abschwächung der Bindung beider Komponenten (Stasch et al., 2011).

Die Effekte von cGMP werden durch drei intrazelluläre Effektoren herbeigeführt:

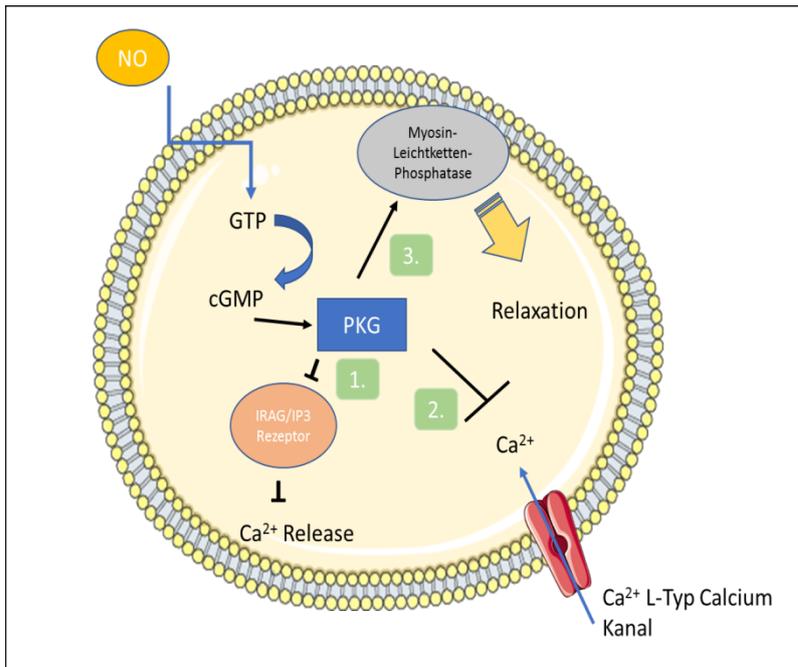
- cGMP-abhängige Protein Kinase I und II
- Ionenkanäle
- cGMP regulierte Phosphodiesterasen (PDE)

### **Aufgaben der cGMP-abhängigen Proteinkinasen im NO/sGC-Signalweg**

Bei den cGMP-abhängigen Proteinkinasen werden zwei Isoformen differenziert, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden: die lösliche Proteinkinase G I (PKG) (Wernet et al., 1989) und die membrangebundene PKG II (Jarchau et al., 1994). Sie stellen den wichtigsten Effektor für cGMP im kardiovaskulären NO/sGC-Signalweg dar. Darüber hinaus gehören sie zur Familie der Serin-/Threonin-Kinasen und liegen in der Zelle als Homodimere vor (Pfeifer et al., 1999). Die PKG ist vor allem in glatter Gefäßmuskulatur zu finden (Keilbach et al., 1992). Substrate der PKG I umfassen den IP<sub>3</sub>-Rezeptor, Calcium-abhängige Ionenkanäle sowie die Myosin-leichte-Kette-Phosphatase (MLCP) und das Inositoltriphosphat-Rezeptor-assoziierte cG-Kinase-Substrat (IRAG) (Surks et al., 1999, Schlossmann et al., 2000). (1.) Der NO/cGMP/PKG-I-Signalweg führt zu einer verminderten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch die Phosphorylierung von IRAG. IRAG inhibiert den IP<sub>3</sub>-Rezeptor und verhindert die Freisetzung von Calcium. (2.) PKG I phosphoryliert und inhibiert L-Typ-Calcium-Kanäle. (3.) PKG I aktiviert die Myosin-Leichtketten-Phosphatase, was in einer Relaxation der glatten Muskulatur resultiert (siehe Abbildung 6) (Francis et al., 2010).

Die PKG II reguliert insbesondere die intestinale Sekretion, das Knochenwachstum, die Reninsekretion und die zirkadiane Rhythmik. Sie phosphoryliert Substrate wie *Src homology 2*

*domain-containing tyrosine phosphatases* und *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) (Campbell et al., 2016).



**Abb. 6: Darstellung des Signalweges der PKG I zur Relaxation glatter Muskulatur**

*NO führt zur Produktion von cGMP, das PKG I aktiviert. PKG I phosphoryliert so verschiedene zelluläre Proteine und erniedrigt den zellulären Calciumspiegel. Die Pfeile beschreiben eine Aktivierung des Proteins durch PKG I (orientiert an Francis et al., 2010).*

### **Funktionen unterschiedlicher Phosphodiesterasen**

Phosphodiesterasen (PDE) regulieren den Abbau des Signalmoleküls cGMP und nehmen dadurch Einfluss auf die Intensität und die Dauer des durch cGMP vermittelten Effektes (Mullershausen et al., 2004). Bisher lassen sich elf PDEs unterscheiden, die wiederum cGMP-, cAMP- oder gemischt-spezifisch sind.

Zu den PDEs mit einer cGMP-Spezifität zählen die PDE5, PDE6 und PDE9. Neben der PDE5 befindet sich auch die PDE1 in vaskulären glatten Muskelzellen. PDE1 baut cGMP und cAMP ab, während PDE5 spezifisch für den Abbau von cGMP ist. Kommt es zu einer intrazellulären Zunahme von  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin, wird die PDE1 aktiviert und ermöglicht durch den cGMP-Abbau eine Kontraktion der Muskelzellen (Broekmans et al., 2015).

### 1.2.3 | Einfluss von Angiotensin II auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und Wechselwirkungen mit NO und sGC

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung des Blutdruckes über die Regulierung des systemischen Flüssigkeitsvolumens. Eine Dauer- und somit Überfunktion begünstigt die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen. Die Aktivierung des RAAS verläuft im Sinne einer Kaskade:

1. Bei einer renalen Perfusionsstörung wird das Enzym Renin freigesetzt (gebildet von den Polzellen der juxtaglomerulären Zellen der Niere (Nairn et al., 1959)).
2. Renin produziert proteolytisch aus Angiotensinogen (aus der Leber kommend) Angiotensin I.
3. *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) (von vaskulären Endothelzellen der Lunge gebildet, membrangebunden) wandelt Angiotensin I in Angiotensin II um (Leung and Carlsson, 2001, Unger et al., 2008).

Des Weiteren kann Angiotensin II lokal in anderen Geweben durch beispielsweise Chymasen gebildet werden.

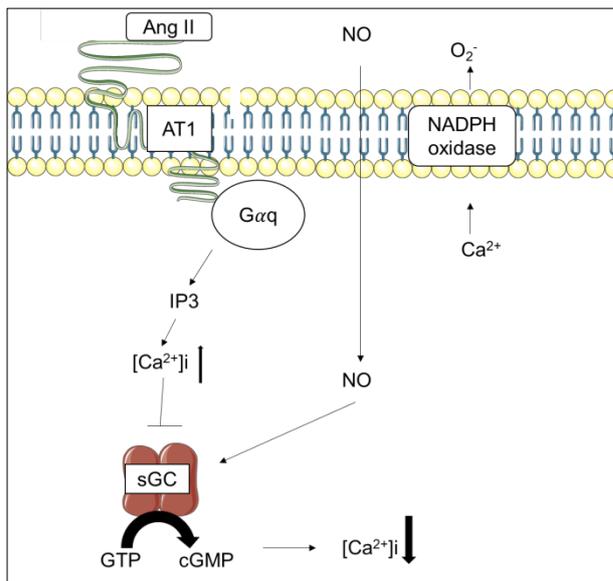
Angiotensin II wirkt über zwei Rezeptoren: den Angiotensin (AT) 1- und 2-Rezeptor. Eine Aktivierung des AT1-Rezeptors bewirkt eine gesteigerte Aldosteronausschüttung aus der Nebennierenrinde (folglich kommt es zu einer vermehrten Rückresorption von Natrium- und Chloridionen, zu einer vermehrten Ausscheidung von Kalium in die Nierentubuli sowie zu einer vermehrten Wasserrückresorption) und eine vermehrte Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (ADH) aus dem Hypophysenhinterlappen (es erfolgen eine vermehrte Rückresorption von Wasser und eine Vasokonstriktion). Neben diesen Effekten, die der Stabilisierung des Blutdruckes dienen, kann die vermehrte Produktion von Angiotensin II auch zu erhöhtem Blutdruck sowie kardialen und vaskulärem Remodeling führen (Unger et al., 2008).

Der AT2-Rezeptor ist im adulten Gewebe reduziert und in seiner Funktion noch nicht ausreichend untersucht. Er scheint allerdings eine dem AT1-Rezeptor entgegen gerichtete Funktion zu vermitteln. So kommt es zu antiproliferativen und antiinflammatorischen Effekten sowie zur Vermittlung von Gewebedifferenzierung, Regeneration und Apoptose (Unger et al., 2008). Profibrotische Effekte, die durch Angiotensin II über den AT1-Rezeptor entstehen können, werden durch die Aktivierung des AT2-Rezeptors verhindert. Ebenso kann eine Vasodilatation durch den AT2-Rezeptor vermittelt werden und steht einer Vasokonstriktion, vermittelt durch den AT1-Rezeptor, entgegen (Steckelings et al., 2005).

Angiotensin II stellt einen starken Vasokonstriktor dar und ist die Haupteffektorsubstanz im RAAS (Skeggs et al., 1956).

Angiotensin II spielt eine zentrale Rolle in kardialen Remodelingprozessen, die zur Entstehung einer Herzinsuffizienz führen können (Dang et al., 2015). Hierbei handelt es sich insbesondere um ein Remodeling des linken Ventrikels (Sriramula and Francis, 2015). Des Weiteren erhöht Angiotensin II den peripheren arteriellen Widerstand und verursacht einen arterielle Hypertonus (Fransen et al., 2015). Das Remodeling zeichnet sich dabei durch Hypertrophie, Apoptose und Fibrose aus. Angiotensin II stößt hier eine Reihe intrazellulärer Signaltransduktionen an. So kommt es zu einer Produktion von ROS, zur Aktivierung von rezeptor- und nicht-rezeptorabhängigen Tyrosinkinasen und Serin-/Threoninkinasen, wie *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinasen, Akt/mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*)/p70S6K und verschiedenen

PKC-Isoformen. Des Weiteren zeigen sich bei dem Remodelingprozess des Herzens Veränderungen in der Genexpression (Dang et al., 2015).



**Abb. 7: Einfluss von Calcium auf den sGC-Signalweg**

Die Aktivierung des AT1-Rezeptors durch Angiotensin II führt zu einer Zunahme von intrazellulärem Calcium, wodurch die sGC gehemmt und die NOX5 stimuliert wird. Die NO-Stimulation der sGC ruft eine Abnahme des intrazellulären Calciums hervor (modifiziert nach Ramanathan et al., 2011).

### Zusammenhang zwischen Angiotensin II und NO

NO und Angiotensin II beeinflussen sich gegenseitig durch verschiedene Signalwege. NO führt zu einer Herunterregulierung des AT1-Rezeptors, während Angiotensin II Einfluss auf die Expression der NO-Synthase und auf die NO-Produktion nimmt (siehe Abbildung 7). Zur Aufrechterhaltung der vaskulären Funktion und Struktur ist ein Feedbackmechanismus zwischen Angiotensin II und NO essentiell. Ein Ungleichgewicht zwischen beiden Faktoren ist mit der Entstehung vaskulärer Erkrankungen assoziiert. Angiotensin II und NO finden sich sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen. NO scheint ein direkter Modulator der ACE-Aktivität zu sein. So zeigt sich eine verringerte Angiotensin-II-Produktion bei einer Zunahme von NO.

Angiotensin II verhindert eine Akkumulation von cGMP in glatten Muskelzellen und Gefäßen. Vermutlich kommt es dabei zu einer Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-/Calmodulin-stimulierten PDE.

Angiotensin II führt zu einer Aktivierung der PDE1A1 in glatten Muskelzellen und kann so die vasodilatatorischen Effekte des NO antagonisieren.

Die PKG scheint ebenfalls ein Zielprotein für Angiotensin II zu sein, das die Aktivität der Proteinkinase G (PKG) reduziert. Darüber hinaus reduziert Angiotensin II die Phosphorylierung von Vasodilatator-stimuliertem Phosphoprotein (VASP), ein Substrat der PKG (Yan et al., 2003). Daneben ruft Angiotensin II eine Abnahme der Expression von sGC insbesondere der Untereinheiten  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  hervor (Mollnau et al., 2002).

### **Zusammenhang zwischen der sGC und ROS bzw. Angiotensin II**

Angiotensin II scheint neben den bisher genannten Signalwegen auch eine Rolle in der Produktion von Superoxidanionen zu spielen. In vaskulären glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass im Vergleich mit neutrophilen Granulozyten eine Produktion von Superoxidanionen erst nach einigen Stunden einsetzt. Angiotensin II aktiviert dafür die NADH- und NADPH-Oxidase. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt durch eine Stimulation von Phospholipase A2 und die Freisetzung von Arachidonsäure ausgelöst wird (Rajagopalan et al., 1996, Griendling et al., 1994). In verschiedenen Studien konnte herausgefunden werden, dass eine vermehrte Aktivität des RAAS zu einer endothelialen Dysfunktion mit verminderter NO-Bioverfügbarkeit führt. Daneben zeigte sich eine verminderte Reaktion auf NO. Als Ursache hierfür wird eine Herunterregulierung der sGC diskutiert. Hierbei kommt es bedingt durch Angiotensin II-ausgelöstem nitrosativem und oxidativem Stress zur S-Nitrosation der sGC und folglich zu einer Abnahme der Sensitivität des Enzyms gegenüber NO. Des Weiteren ist die Wirkung des Angiotensin II-induzierten nitrosativen Stresses abhängig von der Thiolgruppe der sGC. So zeigten Crassous et al., dass Cys 516 der sGC $\alpha$ -Untereinheit ein spezifisches Angriffsziel von Angiotensin II-induziertem oxidativem/nitrosativem Stress darstellt (Crassous et al., 2012). In Anwesenheit einer großen Menge an ROS kann durch verschiedene Prozesse eine sGC-Funktionseinschränkung hervorgerufen werden:

- durch Peroxinitrit;
- durch Oxidation der  $\beta_1$ -assoziierten prosthetischen Häm-Gruppe und Konversion von sGC in den NO-insensitiven Status;
- durch Oxidation-induzierte Disulfid-Bildung der  $\beta$ -Thiolgruppe sowie
- durch NO abhängige posttranslationale Modifikation des  $\beta_1$ -Thiols (S-Nitrosation) (Tsai and Kass, 2009).

### **1.2.4 | Rolle der NADPH-, Xanthin-Oxidasen, Mitochondrien und eNOS-Entkopplung im Rahmen der Produktion von oxidativem Stress**

Oxidativer Stress bezeichnet das Ungleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien. Unter physiologischen Bedingungen herrscht eine Balance zwischen beiden Komponenten: Ein Anstieg in der Produktion und/oder eine Abnahme in der Elimination der reaktiven Sauerstoffspezies lässt oxidativen Stress entstehen. Bei reaktiven Sauerstoffspezies handelt es sich um Zwischenprodukte in Reduktions-Oxidations-Reaktionen (Redox-Reaktion), die sich bei der Reaktion von Sauerstoff ( $O_2$ ) zu Wasser ( $H_2O$ ) herausbilden (Rochette et al., 2013). Am häufigsten kommen dabei aus Sauerstoff entstehende und aus NO hervorgehende Radikale vor (Vergely et al., 2003). Hierbei handelt es sich um instabile Radikale mit einem ungepaarten Elektron ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Montezano and Touyz, 2012). In Endothelzellen

lösen hauptsächlich vier Enzymsysteme eine Produktion von ROS aus: die NADPH-Oxidase, die Xanthin-Oxidase, die Mitochondrien und die entkoppelte eNOS (Mueller et al., 2005). Oxidativer Stress führt zu einer Erhöhung der Lipidperoxidation (Smith et al., 1992) sowie zur Schädigung der Zellmembran und der DNA. Auch der Alterungsprozess scheint durch oxidativen Stress reguliert zu werden (Rochette et al., 2013).

ROS können eine physiologische und eine pathophysiologische Funktion besitzen. Physiologisch betrachtet kontrollieren sie die endotheliale Funktion und den Gefäßtonus, pathophysiologisch betrachtet sind sie bei Inflammation, Hypertrophie, Proliferation, Apoptose, arteriellem Remodeling bei kardiovaskulären Erkrankungen sowie weiteren Ereignissen präsent (Montezano and Touyz, 2012).

NADPH-Oxidasen (NOX) spielen eine Rolle bei der durch Angiotensin II verursachten Hypertension (Matsuno et al., 2005), bei Diabetes (Hink et al., 2001), Hypercholesterinämie (Warnholtz et al., 1999) und Arteriosklerose (Sorescu et al., 2002). Angiotensin II kann eine erhöhte Expression des NADPH-Oxidase-Homologes NOX-1 verursachen (Matsuno et al., 2005).

Die mitochondriale Atmungskette stellt eine Hauptquelle für die Entstehung von ROS dar. Im Wesentlichen finden sich dabei zwei Hauptorte für die Produktion: NADPH-Dehydrogenase (Komplex I) und Ubichinon-Cytochrom b-c<sub>1</sub>(Komplex III) (Forstermann, 2008, Turrens et al., 1985). Die mitochondriale Produktion von ROS beeinflusst die Entstehung von Arteriosklerose (Ballinger et al., 2002).

Die eNOS dient dem Transfer von Elektronen, um letztendlich die Synthese von NO aus L-Arginin zu gewährleisten. Bei einer Transferstörung werden die NO-Produktion und die Sauerstoffreduktion entkoppelt und es entstehen Superoxide. Eine solche Störung kann durch ein Fehlen von für die eNOS-Aktivität wichtigen Kofaktoren (wie beispielsweise BH<sub>4</sub>) sowie durch das Nichtvorhandensein von Substrat entstehen, sodass letztendlich Sauerstoff zur Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> verwendet wird (Mueller et al., 2005). Kommt es zu einer Reduktion des BH<sub>4</sub>-Levels, so verändert sich die Dimerstruktur der eNOS und es entsteht eine funktionelle Entkopplung der katalytischen Aktivität und somit eine Reduktion der Produktion von NO. Stattdessen überwiegt die Produktion von O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Montezano and Touyz, 2012).

Liegt oxidativer Stress vor, nimmt die Reaktion von NO mit den Superoxiden zu. Es entstehen Peroxynitritanionen, die BH<sub>4</sub>- zu BH<sub>3</sub>- Radikalen oxidieren. BH<sub>3</sub> kann zu quinonoid 6,7-[8H]-H<sub>2</sub>-biopterin konvertiert werden (Forstermann and Sessa, 2012). NADPH erweist sich als eine relevante Quelle für die Entstehung von ROS, woraus die Bildung von Peroxynitrit und dadurch eine eNOS-Entkopplung resultieren (Landmesser et al., 2003). Peroxynitrit wirkt in hohen Konzentrationen zytotoxisch und kann eine Schädigung von Proteinen, DNA und Lipiden hervorrufen (Munzel et al., 2005). Eine eNOS-Entkopplung führt zu einer kontinuierlichen Produktion von ROS und insbesondere zu einer Reduktion von NO (Landmesser et al., 2003).

### **Einfluss von ROS auf das Gefäßremodeling**

ROS tragen zum Gefäßremodeling und der Aufrechterhaltung einer Hypertension bei. Das Ungleichgewicht zwischen ROS und NO in der Gefäßwand kann eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) bewirken. Die damit einhergehende Erhöhung von Angiotensin II führt wiederum zu einer Zunahme proinflammatorischer Effekte. Angiotensin II stimuliert die Expression des *endothelial oxidized low-density lipoprotein* (oxLDL)-Rezeptors (LOX-1), was folglich eine erhöhte Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen auslöst. Dies verstärkt die vaskuläre Inflammation und Hypertrophie von glatten Muskelzellen und ebnet den

Weg für arteriosklerotische Prozesse. Des Weiteren induziert Angiotensin II eine Apoptose der Endothelzellen und ROS-inhibierenden Antioxidantien wie Vitamin C. Diese Effekte bedingen eine Aufrechterhaltung der Hypertension und die Entstehung von Arteriosklerose sowie renaler und kardialer Endorganschäden (Landmesser and Harrison, 2001)

### 1.2.5 | Regulation und Aufgaben des Nuclear factor(erythroid-derived)-2-like 2-Transkriptionsfaktor

Nrf2 (nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2) ist ein Transkriptionsfaktor und ein Schlüsselenzym, das die Expression von Antioxidantien und protektiven Enzymen induziert. Durch die Aktivierung von Schutzgenen trägt Nrf2 zum Schutz des vaskulären und kardialen Systems bei. Es handelt sich dabei um ein eher instabiles Protein. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 gehört zur Familie der cap'n'collar (CNC), einer Untergruppe der *basic leucin zipper* (bZip)-Transkriptionsfaktoren (Ma, 2013).

Er befindet sich in verschiedenen Geweben wie beispielsweise in der Muskulatur, in der Niere, in der Leber, in der Lunge und im Darm (Enomoto et al., 2001). Ein Mangel an Nrf2 in Kardiomyozyten kann zu einer kardialen Dysfunktion, induziert durch eine zu starke Druckerhöhung, führen. Ebenso scheint Nrf2 die Umwandlung einer kompensierten in eine dekompenzierte Herzhypertrophie zu verhindern. Dies lässt auf einen erhöhten kardioprotektiven Effekt von Nrf2 schließen (Li et al., 2009).

Im Nukleolus ist Nrf2 ein wichtiger Regulator der durch *antioxidant response element* (ARE) vermittelten Genexpression. Nrf2 bindet an die ARE-Sequenz durch die Entkopplung von Keap1 und Cullin3 und führt zu einer Induktion der Expression von *drug-metabolizing enzymes* (DME). Dazu zählen Glutathion-S-Transferase (GST) und NAD(P)H:quinone Oxidoreduktase 1 (NQO1), die eine Detoxifikation und Elimination verschiedener exogener und endogener Chemikalien verursachen. Es wird angenommen, dass Nrf2 unter basalen Bedingungen in seiner Funktion durch die Bindung an *Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology-associated protein* (Keap1) unterdrückt und erst durch Oxidantien und Elektrophile wieder aktiviert wird (Ma, 2013).

Nrf2 liegt im Zytosol gebunden an Keap1 vor, das als ein aktinbindendes zytosolisches Protein vorliegt (siehe Abbildung 8). Kommt es zu einer Aktivierung von Nrf2, transloziert es ohne Keap1 in den Nukleolus, heterodimerisiert mit dem *small Maf*-Protein und bindet an ARE. Dies führt sowohl zur Aktivierung der Transkription von Genen von Phase-II-Enzymen als auch von Genen von antioxidativ wirksamen Proteinen (Motohashi and Yamamoto, 2004).

Unter basalen Bedingungen kommt es zu einem raschen Abbau von Nrf2 durch Proteasomen. Die Halbwertszeit von Nrf2 beträgt etwa 20 Minuten, sodass die zelluläre Konzentration an Nrf2 relativ gering ist. Die Degradation von Nrf2 wird durch die Keap1/Cul3/Ubiquitin-Ligase-durchgeführte Polyubiquitination getriggert (Ma, 2013).

Die durch Nrf2 transkribierten Gene regulieren den antioxidativen Schutz und oxidativen Signalweg. Des Weiteren reguliert Nrf2 den proteasomalen Abbau von Proteinen, die Zellproliferation und die metabolische Reprogrammierung. Nrf2 nimmt direkten Einfluss auf die Homöostase von ROS und die reaktive Stickstoffspezies (RNS): Es kommt zu einer Induktion des Katabolismus von Superoxiden und Peroxiden durch die Superoxiddismutase (SOD),

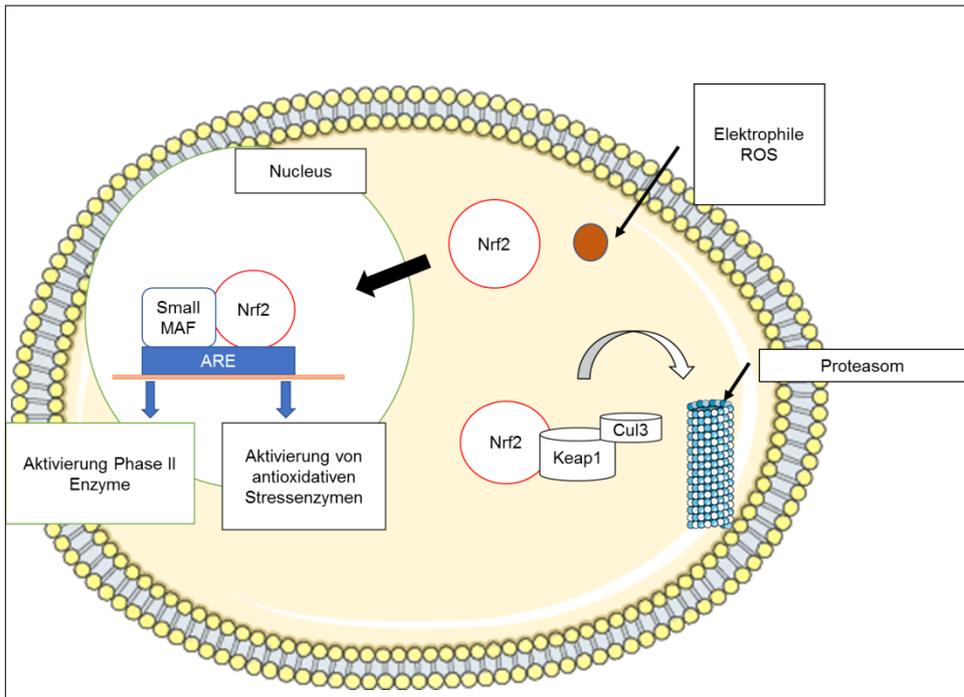
Peroxiredoxine (Prx) und Glutathionperoxidasen (GPx), zur Regeneration von oxidierten Cofaktoren und Proteinen (Reduktion von Glutathiondisulfid (GSSG)), zur Synthese von Reduktionsmitteln wie Glutathion (GSH) und NADPH, zur Expression von Antioxidantien wie Thioredoxin (Trx) und zur Hemmung der Expression von *Thioredoxin-interacting protein* (TXNIP) als Inhibitor von Trx, zur Erhöhung von Redoxtransportern sowie von Metallchelatoren (Ma, 2013).

Liegt in der Zelle ein Mangel an Nrf2 vor, kann eine Vielzahl pathologischer Ereignisse wie beispielsweise eine akute Hepatotoxizität hervorgerufen werden. Des Weiteren scheint ein Mangel an Nrf2 eine Prädisposition zu einer chronisch entzündlichen Erkrankung zu sein. Nrf2 ist ein bedeutsamer Effektor für die Aufrechterhaltung der vaskulären und kardialen Gesundheit, da es Einfluss auf den NO-Signalweg zu nehmen scheint (Motohashi and Yamamoto, 2004).

### **Zusammenhang zwischen Nrf2, eNOS-Expression und NO-Level**

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Nrf2 zu einer Reduktion von ROS, einem erhöhten Spiegel an NO und einer transienten Reduktion der Spiegel der eNOS-Proteine in humanen Endothelzellen führt. Die Aktivierung von Nrf2 scheint ebenso eine Risikoreduktion der eNOS-Entkopplung zur Folge zu haben. Dabei ermöglicht eine Nrf2-bedingte Reduktion der eNOS-Aktivität eine Regeneration der BH<sub>4</sub>-Speicher.

Des Weiteren wird von einer kombinierten Wirkung von Nrf2 und einem weiteren Transkriptionsfaktor, dem *Krüppel-like factor* (KLF)-2, ausgegangen. Dieser wird durch atheroprotektiven Blutfluss aktiviert und hat einen positiven Einfluss auf die eNOS-Expression. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Nrf2, KLF-2 und den Spiegeln an ROS, die für die Aufrechterhaltung der endothelialen Homöostase entscheidend sind. Nähere Untersuchungen dahingehend müssen folgen (Heiss et al., 2009).



**Abb. 8: Darstellung der Regulation von Nrf2**

*Unter basalen Bedingungen liegt Nrf2 gebunden an Keap1 vor und wird durch Proteasomen abgebaut. In der Anwesenheit von Elektrophilen oder ROS wandert Nrf2 in den Nucleus, heterodimerisiert mit dem small Maf-Protein und bindet an ARE. Es kommt zur Transkription von Phase-II-Genen und von Genen für Proteine des antioxidativen Stresses. Keap1 interagiert mit Cullin3 (orientiert an Motohashi and Yamamoto, 2004).*

## 1.2.6 | Übersicht der Mausmodelle

### Wildtypen (WT)

Bei den hier untersuchten Wildtypen handelt es sich um männliche C57BL/6J-Mäuse als Kontrollgruppe (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). C57BL/6J-Mäuse gehören zu den am häufigsten in der murinen Forschung verwendeten Züchtungen. Das Genom der C57BL/6J-Maus konnte als erstes sequenziert werden. Sie findet insbesondere Verwendung in der metabolischen Forschung (Fontaine and Davis, 2016).

### alpha1-/alpha2-KO

Hierbei handelt es sich um männliche NO-GC1- und GC2-KO-Mäuse, denen entweder die alpha1- oder die alpha2-Untereinheit fehlt. Zur Generierung wurden Cre/loxP-vermittelte Rekombinationen zur Deletion von Exon 4 entweder der Alpha1- oder Alpha2-Untereinheit verwendet (Mergia et al., 2006).

### Nuclear factor/erythroid-derived-2-like-2-KO

Die Nrf2 KO/C57BL6J (BRC No.01390)-Mäuse stammen von Rincken (Koyadal, Tsukuba, Ibaraki, Japan) und wurden seit mehr als zehn Generationen mit C57BL/6J gekreuzt (Erkens et al., 2015).

### **Endotheliale NO-Synthase-KO**

Die eNOS-KO-Mäuse sind auf einem C57BL/6J-Hintergrund gezüchtet worden und stammen von Dr. Axel Gödecke (Godecke et al., 1998).

### 1.3 | Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit sind die Charakterisierung und Analyse der endothelialen und kardialen Funktion *in vivo* bei arterieller Hypertonie sowie bei gesteigertem oxidativem Stress mit Fokus auf den eNOS/sGC Signalweg in sGC alpha1/2 KO Mausmodellen. Insbesondere die Funktionen der sGC alpha1- und der sGC alpha2-Untereinheiten werfen trotz intensivierter Forschung in den letzten Jahren noch viele Fragen auf.

Hierzu gilt es, die folgenden zentralen Fragen zu beantworten:

(A) Angiotensin-II-induzierte arterielle Hypertonie/ vaskulärer oxidativer Stress.

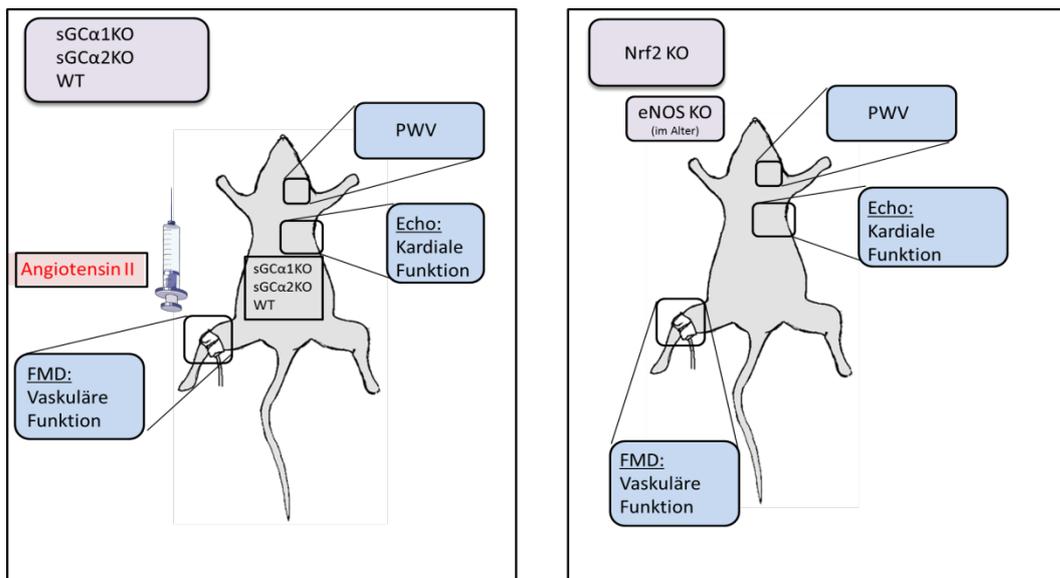
1. Welche Unterschiede der kardialen und vaskuloendothelialen Funktion zeigen sich in WT, alpha1- und alpha2-KO?
2. Welchen Einfluss hat die kontinuierliche Infusion von Angiotensin II auf die kardiale und vaskuläre Funktion in WT?
3. Welche Relevanz haben die Untereinheiten des sGC-Rezeptors für die Angiotensin-II-vermittelten Effekte?

(B) Welchen Einfluss hat eine chronische Endotheldysfunktion durch eine fehlende eNOS auf die kardiale Funktion und auf Parameter der systemischen Hämodynamik?

(C) Oxidativer Stress durch eine fehlende antioxidative Antwort in Nrf2 KO Mäusen.

1. Wie beeinflusst die Deletion von Nrf2 die kardiale Funktion?

Die Ziele der Arbeit werden nachfolgend graphisch dargestellt:



**Abb. 9: Graphische Darstellung der *in vivo* Untersuchungen**

Bestimmung der kardialen und vaskuloendothelialen Funktion bei WT, alpha1-KO und alpha2-KO vor und nach Angiotensin II Gabe sowie Bestimmung der kardialen und vaskuloendothelialen Funktion bei Nrf2 KO und eNOS KO Mäusen.

## 2. | Material und Methoden

### 2.1 | Material

- Ultraschallgerät mit zwei Schallköpfen (18-38MHz,30-70MHz ) (Vevo 2100,Visual Sonics Inc.,Toronto,Canada)
- Auswertungsprogramm Vevo
- Narkosebox mit Sauerstoff-und Isofluranzulauf
- Vergaser mit Regler
- Bewegliche Wärmetischplatte mit Elektroden zur Ableitung des Echokardiogramm (EKG) und der Atemfrequenz
- Befestigungsstreifen, Klebeband
- Elektroden-Creme von Gello GmbH
- Rasierer
- Haarentfernungs-Creme von Veet
- Ultraschallgel von Aquasonic
- Beatmungsmaske
- Kosmetiktücher von tapira plus
- Temperatursonde

#### **Zusätzliche Materialien für Flussvermittelte Vasodilatation (FMD)- Messung**

- Cuff, Occluder (8mm Durchmesser, Harvard Apparatus,Harvard,Boston,MA,USA)
- Unterlagen/Polsterungen
- Druckkalibriergerät (KAL 84,Halstrup Walcher)

#### **Chemikalien**

- Isofluran, Forene® 100%(V/V) von AbbVie
- GTN (Nitrolingual® infus.,Pohl Boskamp)
- Natrium-Chlorid (NaCl) (Depot zur Flüssigkeitsaufrechterhaltung)
- Ketamin
- Xylacin
- Angiotensin II
- Temgesic

#### **Implantation der Minipumpen**

- Osmotische Minipumpen (Alzet Modell 1002)
- Präparierbesteck
- Nahtmaterial Ethicon, Perma Hand Seide 4-0, nicht resorbierbar
- Beheizte Tischplatte
- Spritze Braun, Omnifix®-F 0,01ml-1ml

#### **Versuchstiere**

WT

Es handelt sich um männliche C57BL/6J Mäuse als Kontrollgruppe (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA).

Nrf2 KO

Die Nrf2 KO/C57BL6J (BRC No.01390) Mäuse stammen von Rinken (Koyadal, Tsukuba, Ibaraki, Japan) und wurden mit mehr als 10 Generationen mit C57BL/6J gekreuzt.

eNOS KO

Die eNOS KO Mäuse sind auf einem C57BL/6J Hintergrund gezüchtet worden und stammen von Dr. Axel Gödecke.

Alpha1- und alpha2-KO

Es handelt sich um männliche NO-GC1 und GC2 KO Mäuse, denen entweder die  $\alpha_1$  oder die  $\alpha_2$  Untereinheit fehlt.

Es handelt sich, wenn nicht anders beschrieben, um 5-6 Monate alte männliche Versuchstiere mit einem Gewicht von etwa 30g.

## 2.2 | Methodik

Es erfolgte die Teilnahme am Tierversuchskurs der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf zur Durchführung der tierexperimentellen Versuche.

Die vergebenen Aktenzeichen vom Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz lauten 84-02.04.2012.A353 sowie 84-02.04.2014.A432.

### Ablauf der Ultraschalldiagnostik

Zur Bestimmung der Herzfunktion der Maus wird die Echokardiographie mittels Ultraschall durchgeführt, die Auswertung erfolgt mit der dafür vorgesehenen Software des Herstellers. Die Untersuchung erfolgt an der narkotisierten Maus, um Leiden, Schäden oder Schmerzen zu verhindern und somit eine schnelle Durchführung des Experiments zu ermöglichen. Die Ultraschalldiagnostik erfolgt wie bereits vorbeschrieben (Erkens et al., 2015). Für die echokardiographische Untersuchung wird der 18-38 MHz Schallkopf verwendet. Es erfolgen achsenspezifische Untersuchungen sowohl in der langen als auch in der kurzen Achse im B-mode sowie im M-mode (siehe Abbildung 10;11).

Aufnahmen in der langen Achse des Herzens ermöglichen die Berechnungen des linksventrikulären Volumens, des Schlagvolumens (*Stroke Volume*, SV), des Herzminutenvolumens (*Cardiac Output*, CO) und der Ejektionsfraktion (*Ejection fraction*, EF). Ebenfalls lässt sich in der langen Achse die links ventrikuläre systolische Funktion als systolische Verkürzungsfraktion (*Fractional Shortening*, FS) bestimmen.

Des Weiteren können die Parameter *Heart Rate* (HR), ESV und EDV gemessen und vom Programm berechnet werden.

Im M-Mode der langen Achse lassen sich das interventrikuläre Septum in Systole (IVS,s) und das interventrikuläre Septum in Diastole (IVS,d) bestimmen. Ebenfalls lassen sich die LV Mass corrected und die *Left Ventricular Posterior Wall* (LVPW), welche die Dicke der Herzhinterwand in der Diastole und Systole angibt, bestimmen.

Die Bestimmung der linksventrikulären diastolischen Funktion gelingt über die Darstellung des Mitralklappenflusses mittels PW-Doppler. Dazu wird der apikale Vierkammerblickwinkel eingestellt. In dieser Einstellung können Dezelerationszeit (*Deceleration Time*, DT), Mitralklappen-Ejektionszeit (*Mitral valve ejection time*, MVET), Isovolumetrische Kontraktions- und Relaxationszeit (*Isovolumetric Contraction Time*, IVCT, *Isovolumetric Relaxation Time*, IVRT), Acceleration sowie Myokardialer Performance Index (MPI) bestimmt werden. Mittels PW-Doppler Mode lässt sich die AV Geschwindigkeit bestimmen.

### Einstellung der parasternalen langen Achse

Der Tisch wird nach links gekippt und der Schallkopf wird links parasternal aufgesetzt.

Nach einer ersten Orientierung im Bild und Auffinden von *Aorta* und Apex wird der Schallkopf (SK) um ca. 35° gegen den Uhrzeigersinn gedreht, sodass beide Strukturen in einer Linie liegen.

Es wird ein Bild im B-Mode aufgenommen und ein Bild im M-Mode, welcher mitventrikulär auf Höhe der Papillarmuskel im rechten Winkel zum Ventrikel gelegt wird.

#### **Einstellung der parasternalen kurzen Achse**

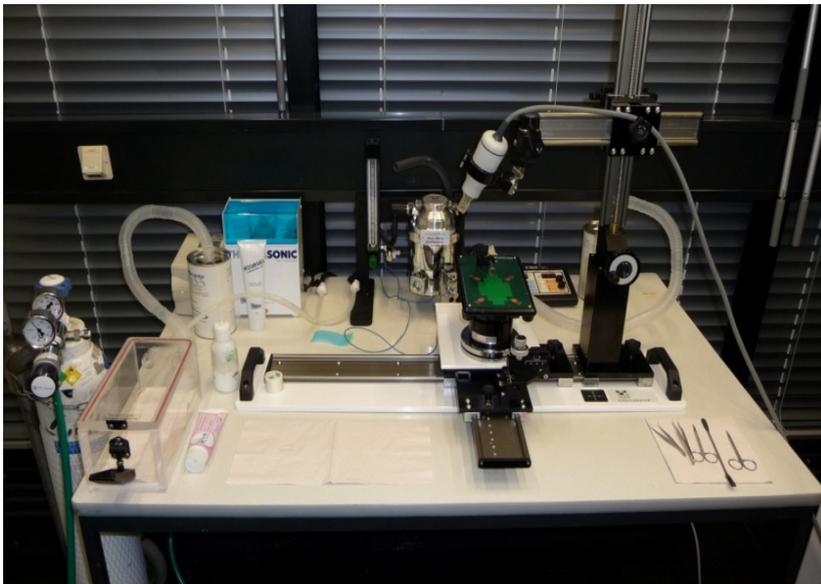
Zur Auffindung der parasternalen kurzen Achse wird die Position aus der langen Achse beibehalten und der SK um 90° im Uhrzeigersinn gedreht. Auch hier wird ein Bild im B- und M-Mode gespeichert.

#### **Apikaler Vier-Kammer-Blick**

Der Tisch wird nach links hinten gekippt. Der Schallkopf wird in der kurzen Achse unterhalb des Rippenbogens aufgesetzt und nach kranial geführt. Das PW-Doppler Signal wird parallel des Septums etwa in der Mitte des Ventrikels abgeleitet.

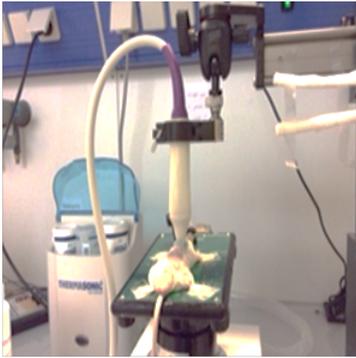
#### **Bestimmung des Aortenflusses**

Der Tisch wird nach oben gekippt, sodass der Kopf der Maus erhöht liegt. Der SK wird rechts parasternal aufgesetzt und die *Aorta ascendens* eingestellt. Parallel zur Wand des Gefäßes wird der PW-Doppler gelegt.

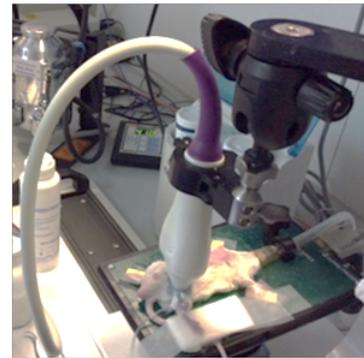


**Abb. 10: Versuchsaufbau der Ultraschalldiagnostik**

A



B

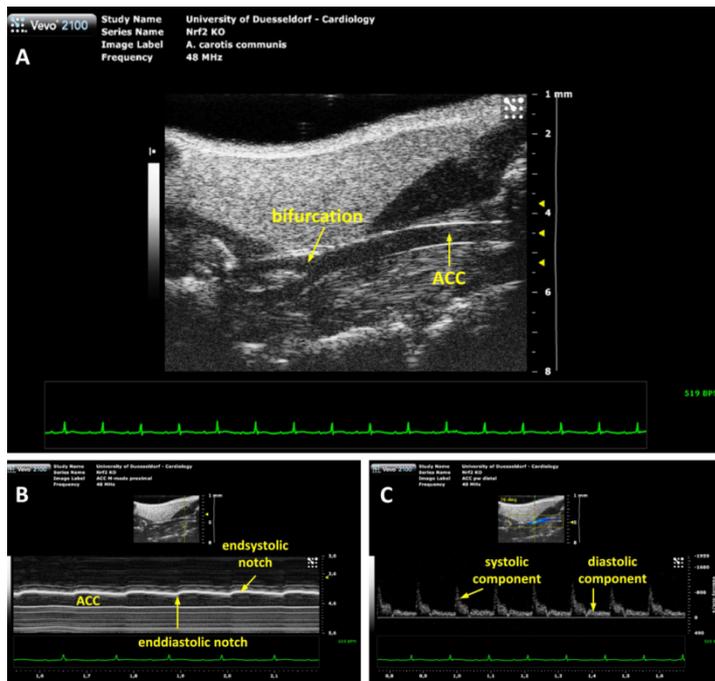


**Abb. 11: Darstellung der Schallkopfeinstellungen**

*Echokardiographische Untersuchung in der langen Achse (A). FMD-Messung der A.iliaca externa (B).*

### **Bestimmung der Pulswellengeschwindigkeit**

Es wird ein Linearschallkopf mit 30-70MHz verwendet. Der Tisch wird in eine horizontale Position gebracht und der SK paratracheal auf die *Arteria carotis communis* aufgesetzt um longitudinale Bilder zu generieren. Dabei sollte schnell gearbeitet werden um ein mögliches Abdrücken der Trachea zu vermeiden. Die *Arteria carotis communis* wird aufgesucht und das M-Mode Signal wird in einen Gefäßabschnitt vor der Bifurkation der *Arteria carotis communis* gelegt, einmal proximal und einmal distal der Bifurkation. Die Distanz zwischen beiden Punkten wird in einem B-Mode Bild berechnet. Die PWV wird als Verhältnis zwischen Distanz/Zeitintervall berechnet (siehe Abbildung 12) (Erkens et al., 2015).

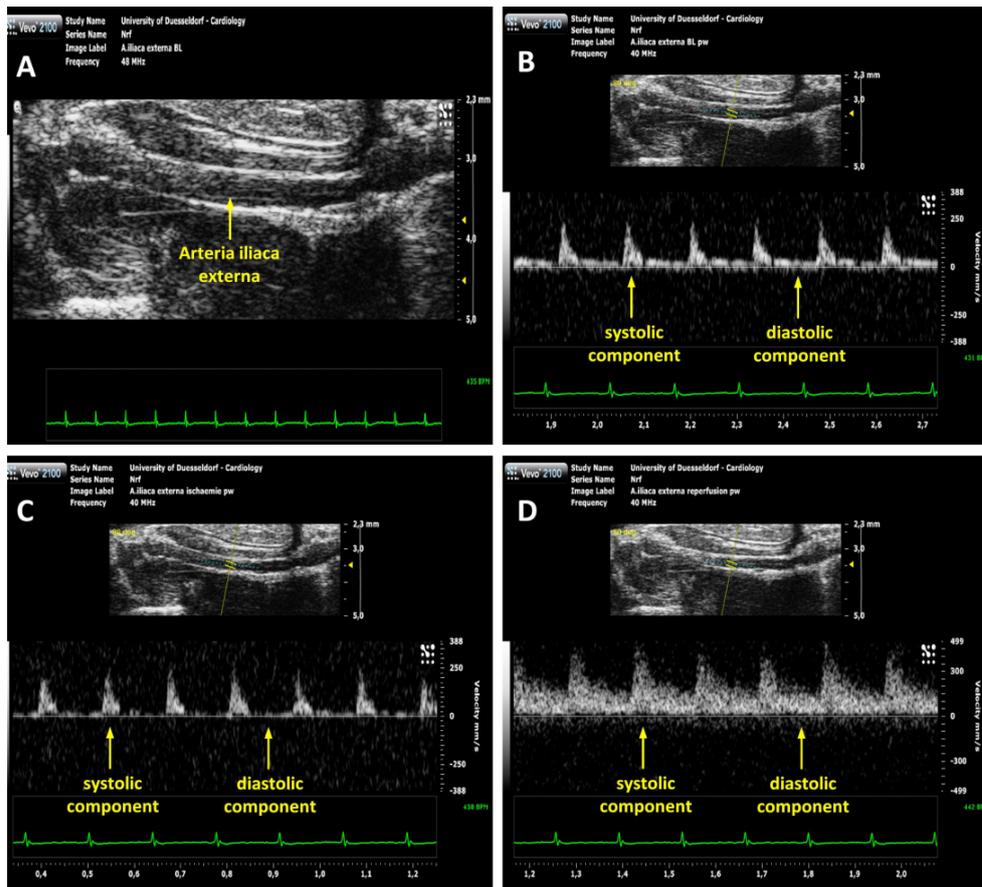


**Abb. 12: Bestimmung der PWV in der Arteria carotis communis**

*B-Mode, Darstellung der Bifurkation (A) M-Mode (B) Pulswellen-Dopplersignal (C) (Erkens et al, 2015).*

### Bestimmung der FMD

Es wird ein Linearschallkopf mit 30-70MHz verwendet. Ein Cuff wird um das linke Hinterbein gelegt und der SK proximal vom Cuff aufgesetzt. Die *Arteria iliaca externa* wird aufgesucht. Mittels Venenfahrt und einem charakteristischen pulsatilen PW-Doppler Signal kann die Arterie identifiziert werden und die Untersuchung kann beginnen (siehe Abbildung 13). Es wird ein Bild im B-Mode sowie ein PW-Doppler-Signal aufgenommen. Anschließend wird der Cuff als ischämischer Trigger auf 200mmHg aufgepumpt, sodass der directionale arterielle Blutfluss aufgeboben wird. Die Occlusion des Gefäßes dauert fünf Minuten an. Während dieser Zeit wird pro Minute ein Bild im B-Mode zur anschließenden Bestimmung des Gefäßdiameters aufgenommen. Nach fünf Minuten Occlusion wird der Cuff entblockt. Die Reaktion des Gefäßes auf den zugeführten Trigger wird mittels B-Mode alle 20sek und mittels PW-Doppler Signal Messung alle 30sek aufgezeichnet, um die Daten später mittels dem entsprechendem Computerprogramm auszuwerten. Nach der Untersuchung wird die Anästhesie beendet und die Maus im wachen Zustand zurück in den Käfig gesetzt (Erkens et al, 2015 ).



**Abb. 13: Darstellung der FMD-Messung in der Arteria iliaca externa**

*Darstellung der Arteria iliaca externa im B-Mode ohne Cuff-Occlusion(A). Charakteristisches Pulsdoppler-Signal des arteriellen Blutflusses (B). Arteria iliaca externa bei Cuff-Occlusion und fehlendem diastolischem Signal (C). Zunahme des PW-Dopplersignals durch erhöhten Blutfluss bei Reperfusion (D) (Erkens et al,2015).*

### **Implantation von Minipumpen bei *Littermates*, alpha1-KO und alpha2-KO Mäusen**

Osmotische Pumpen werden zur Behandlung von Mäusen eingesetzt, um eine konstante Abgabe von Agonisten über einen Zeitraum von 13 Tagen zu ermöglichen. Die Messungen erfolgten 6 und 13 Tage nach der Implantation der Pumpen.

Die Pumpen wurden unter sterilen Bedingungen nach Herstellerangaben befüllt (AlzetModell 1002). Die Konzentration an Angiotensin II (gelöst in 0,9 % (w/v) NaCl) wurde so gewählt, dass die Pumpe 1,44 mg/kg Körpergewicht pro Tag über einen Zeitraum von zwei Wochen abgibt. Noradrenalin (gelöst in 70 mM Chlorwasserstoff (HCl) und 0,9 % (w/v) NaCl) wurde in einer Konzentration von 2,88 mg/kg Körpergewicht pro Tag abgegeben. Nach dem Befüllen wurden die Pumpen über Nacht bei 37 °C in steriler 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gelagert.

Die Mäuse wurden zur subkutanen Implantation der osmotischen Minipumpen narkotisiert (100mg Ketamin und 2mg Xylacin pro kg Körpergewicht). Der Schnitt wurde anschließend mittels Hautnaht versorgt. Es erfolgte eine anschließende analgetische Therapie mit Temgesic

### **Echokardiographie, Pulse-Wave-Velocity- und Flow-Mediated-Dilation-Messung**

Bei der echokardiographischen Untersuchung handelt es sich um eine nicht-invasive Darstellungsweise der Herzfunktion. So kann eine Beurteilung der diastolischen, systolischen und allgemeinen Herzfunktion erfolgen. Die diastolische Funktion stellt sich im transmitralen Dopplerprofil dar, das durch Füllungsbedingungen, Alter und Herzfrequenz beeinflusst wird. Hierbei werden die frühdiastolische (E-Welle) und die spätdiastolische (A-Welle) Füllung unterschieden (siehe Abbildung 14). Die E-Welle wird durch den Druck im linken Vorhof beim Öffnen der Mitralklappe, die Compliance des linken Vorhofs und die Frequenz der ventrikulären Relaxation beeinflusst. Zur Bestimmung der diastolischen Funktion werden das MV-E/A-Verhältnis, die isovolumetrische Kontraktionszeit (IVCT), die isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT), die Dezelerationszeit (DT) und der Myokardiale-Performance-Index (MPI) bestimmt. Die DT folgt auf die E-Welle und gibt an, wie schnell die E-Wellen-Geschwindigkeit bis zur Basallinie abnimmt (Nishimura and Tajik, 1997). Quantitativ betrachtet weist die DT auf die Steifigkeit des LV hin, unabhängig von der Herzfrequenz, Kontraktilität und Nachlast. Zusammen mit der Bestimmung der E- und A-Wellen-Geschwindigkeit bzw. der Bestimmung des MV-E/A-Verhältnisses lassen sich Aussagen über Störungsmuster der diastolischen Funktion treffen. Eine Verkürzung der DT deutet auf ein restriktives Füllungsmuster hin (Cerisano et al., 1999). Liegen Veränderungen in der Relaxationsfähigkeit des Herzens vor, zeigt sich dies in einer niedrigen E-Wellen-Geschwindigkeit, einer hohen A-Wellen-Geschwindigkeit und einer verlängerten DT. Bei einer Progression der Erkrankung nehmen der atriale Füllungsdruck und die E-Wellen-Geschwindigkeit zu, die DT verkürzt sich und es entsteht ein pseudonormales Flussmuster. Von einer Pseudonormalisierung wird gesprochen, wenn Patienten eine veränderte Relaxationsfähigkeit, eine Verschlechterung der diastolischen Funktion, die in einem erhöhten Druck im linken Vorhof resultiert, und eine Abnahme in der Compliance des linken Ventrikels (eine Veränderung im Füllungsvolumen in Abhängigkeit von Veränderungen der Druckverhältnisse während der Diastole) aufweisen. Es zeigt sich eine Zunahme der E-Wellen-Geschwindigkeit, eine Verkürzung der DT und eine normal erscheinende Mitralflusskurve.

Eine Zunahme der Vorlast hat ebenfalls einen Einfluss auf das Mitralflussprofil. So kommt es zu einer Erhöhung der E-Wellen-Geschwindigkeit und einer Abnahme der DT. Umgekehrt verhalten sich diese Parameter bei einer Zunahme der Nachlast (Nishimura and Tajik, 1997).

Es gibt vier Formen der diastolischen Dysfunktion, die sich im Mitralflussprofil widerspiegeln:

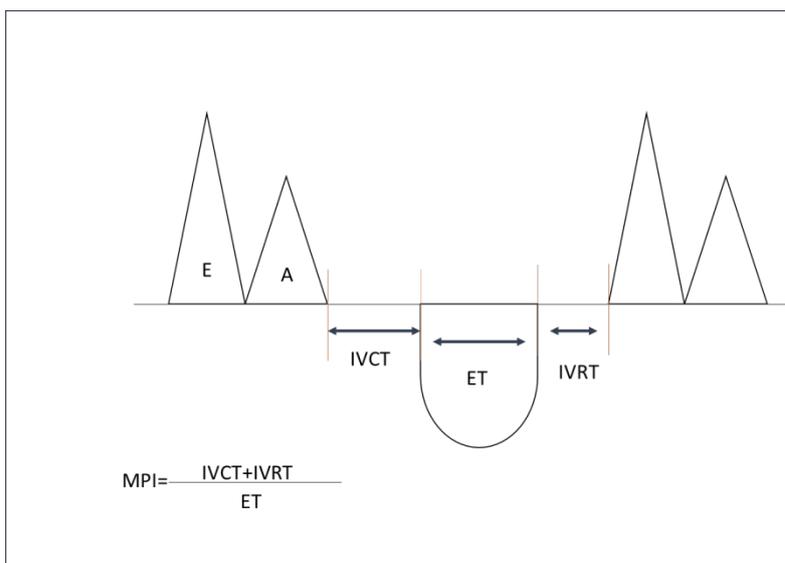
- eine normale LV-Füllung:  $E > A$ ;
- eine abnormale LV-Relaxation  $E < A$ ;
- eine pseudonormale Füllung  $E > A$  sowie
- eine restriktive Füllung  $E \gg A$ .

Eine Relaxationsstörung findet sich unter anderem bei Patienten mit einer ventrikulären Hypertrophie, systemischen Hypertrophie oder KHK. Als Ursache für eine restriktive Störung kommt eine LV-Steifigkeit oder eine verminderte Compliance in Frage. Häufig ist die restriktive Störung mit fortgeschrittenen kardialen Erkrankungen assoziiert. Liegt sowohl eine restriktive als auch eine Relaxationsstörung vor, wird von Pseudonormalisierung gesprochen (Giannuzzi et al., 1994).

Der Myokardiale-Performance-Index (MPI) wurde erstmals 1995 von Tei et al. beschrieben. Hierbei handelt es sich um einen unabhängigen Parameter zur Bestimmung der diastolischen und systolischen Funktion (siehe Abbildung 14) (Lobmaier et al., 2014). Eine Zunahme des MPI

spricht für eine diastolische Dysfunktion. Der MPI stellt einen universal einsetzbaren Parameter dar, der unabhängig von der Herzfrequenz und der LV-Form sowie von Blutdruck und Alter ist (Gao et al., 2011, Lakoumentas et al., 2005). Die IVRT beschreibt das Zeitintervall zwischen dem Aortenklappenschluss und der Mitralklappenöffnung bzw. die Zeit, in der die Aktinmyosin-Querbrücken auf einen niedrigen Aktivitätszustand zurückgestellt werden (Giannuzzi et al., 1994). Die IVRT bezeichnet den sensitivsten Doppler-Index, um eine verminderte kardiale Relaxation zu detektieren (Garcia et al., 1996). Die IVCT beschreibt das Intervall vom Schluss der Mitralklappe bis zur Öffnung der Aortenklappe. Während dieser Zeit verändert sich das Blutvolumen im Ventrikel nicht (Lauboeck, 1980).

Bei einer systolischen Dysfunktion kommt es zu einer Erhöhung des anaeroben Metabolismus im Skelettmuskel und der Akkumulation von Laktat (Nishimura and Tajik, 1997). Zur Bestimmung der systolischen Funktion dienen unter anderem die Ejektionsfraktion (EF) und das *Fractional Shortening* (FS) (Gao et al., 2011).



**Abb. 14: Darstellung des Mitralflusses und des LV-Auswurfes**

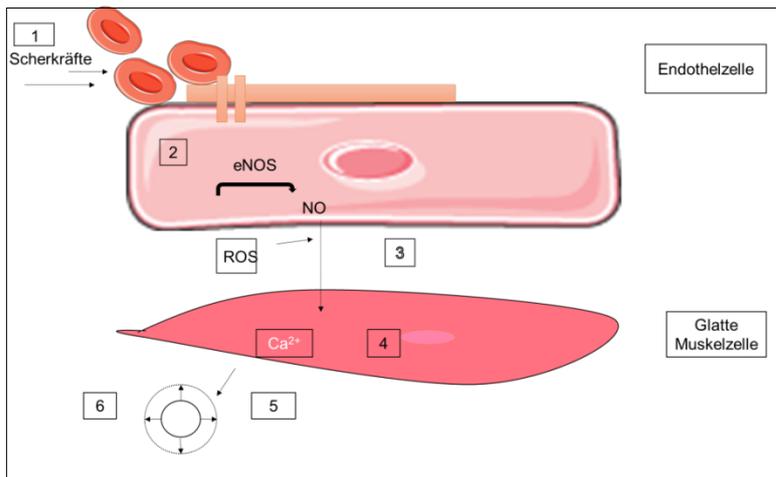
Darstellung von E- und A-Welle, IVRT und IVCT, Ejektionszeit (ET) sowie der Bestimmung des MPI (orientiert an Lakoumentas et al., 2005).

### Relevanz der Puls-Wellen-Geschwindigkeit

Die Bestimmung der Puls-Wellen-Geschwindigkeit (PWV) dient der Feststellung einer veränderten Gefäßelastizität im Sinne einer vermehrten oder verminderten Steifigkeit des Gefäßes. Die Dehnbarkeit des Gefäßes ist abhängig von der Dicke und Elastizität der Arterienwand sowie vom Radius der Arterie (Paine, 1948).

## Die Fluss-vermittelte Dilatation

Bei dieser nicht-invasiven Methode werden Veränderungen des Gefäßdiameters untersucht, nachdem mittels Okklusion des Gefäßes Scherkräfte auf dieses einwirken. Die hier angewandte Methode wurde modifiziert und ermöglicht eine Messung des Diameters während Okklusion und Reperfusion des Gefäßes. Liegt im Gefäß eine transiente Ischämie vor, wird diese mit einem erhöhten arteriellen Blutfluss im Gefäß beantwortet. Es zeigt sich eine Vasodilatation des Gefäßes als Antwort auf eine Zunahme der auf das Gefäß wirkenden Scherkräfte (siehe Abbildung 15) (Erkens et al, 2015; Schuler et al, 2014). Bei den Scherkräften handelt es sich um tangential auf die Endotheloberfläche wirkende Kräfte (Heiss et al., 2008). Die Scherkräfte werden von der Glykokalyx des Endothels registriert, woraufhin eine Freisetzung von NO stattfindet (van Bussel et al., 2015, Celermajer et al., 1992).



**Abb. 15: Schematische Darstellung der in der FMD involvierten Schritte**

Blutfluss-assoziierte Scherkräfte (1) führen zu einer mechanosensitiven Deformation der Zellmembran über die Glykokalyx oder über mechanosensitive Ionenkanäle. Es wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Produktion von Vasodilatoren führt (2). Diese diffundieren von den Endothelzellen zu den glatten Muskelzellen. Interaktionen von NO mit ROS sind auf diesem Weg möglich. In den glatten Muskelzellen kommt es durch die Aktivierung der Signalkaskade zu einer Reduktion der Calcium-Konzentration und zur Relaxation (4). Verschiedene Faktoren nehmen Einfluss auf den Durchmesser des Gefäßes (wie Elastin, Kollagen) (5,6) (orientiert an Thijssen et al, 2011).

Liegt eine endotheliale Dysfunktion vor, ist eine FMD-Antwort meist nicht möglich. Beeinträchtigungen der FMD finden sich beispielsweise bei Vorliegen einer Arteriosklerose. Veränderungen in der Dilatationsfähigkeit können einen Hinweis auf eine endotheliale Dysfunktion oder auf das Vorliegen einer kardiovaskulären Erkrankung geben. Veränderungen der FMD sind altersabhängig. In höherem Alter zeigt sich eine Abnahme der FMD-Antwort (Lind, 2014). Bei Patienten dient die nicht-invasive Messung der FMD in der *Arteria brachialis* als Standardmethode zur Bestimmung der endothelialen Funktion und kann einen Überblick über den vaskulären Status des Patienten geben. Im weiteren Verlauf können therapeutische Interventionen abgewogen werden. Veränderungen in der endothelialen Funktion können so visualisiert werden (Schuler et al., 2014). Messungen der FMD am Beispiel der *Arteria iliaca externa* im murinen Modell sollen ebenfalls einen Einblick über den vaskulären Status und die endotheliale Funktionalität geben (Erkens et al, 2015).

## 2.3 | Statistik

Die gezeigten Daten werden als Mittelwert (Mw)  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Die experimentellen Gruppen wurden mittels *student's t-Test* oder *one way ANOVA Test* bei Normalverteilung verglichen, bei nicht vorhandener Normalverteilung wurden die experimentellen Gruppen mittels Kruskal-Wallis Test oder Mann-Whitney-U-Test verglichen. Im Anschluss erfolgt eine Darstellung der gezeigten Daten als Mw $\pm$ SD oder *median with range*. Die Normalverteilung wurde mittels D'Agostino-Pearson Test getestet.  $p < 0,05$  wird als statistische Signifikanz definiert.

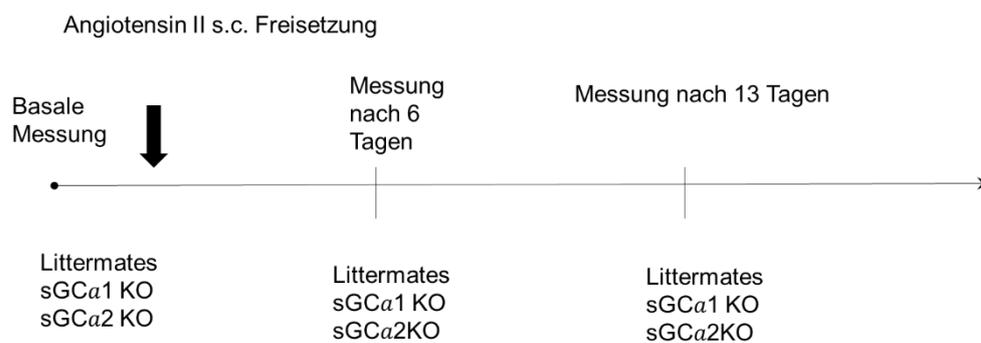
### 3. | Ergebnisse

#### 3.1| Einfluss von Angiotensin II auf die vaskuläre und kardiale Funktion

##### **Darstellung der echokardiographischen Ergebnisse. Einfluss von Angiotensin II auf WT.**

Untersucht wird der Einfluss von Angiotensin II auf die mittels Echokardiographie bestimmte Herzfunktion. Es erfolgt eine Einmessung der WT (Littermates) zum Zeitpunkt vor Angiotensin II Gabe. Nach Einsetzen der Minipumpe werden erneut echokardiographische Parameter an Tag 6 und an Tag 13 erhoben. Dementsprechend liegen drei Messpunkte zur Bestimmung der Herzfunktion vor (siehe Abbildung 16).

Als erstes soll die Auswirkung von Angiotensin II auf die Struktur der Herzmuskulatur untersucht werden (siehe Tabelle 1).



**Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Messungen nach Angiotensin II Gabe**

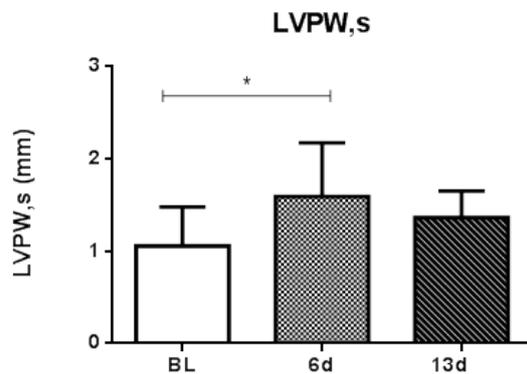
##### **Unter Angiotensin II bleibt die kardiale Struktur erhalten.**

Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den Basalwerten, den Werten nach 6 Tagen Behandlung mit Angiotensin II und nach 13 Tagen Behandlung bezogen auf die Parameter HR, ESV, EDV, LV Mass corrected, IVS,S und IVS,d.

Die Messung der HR weist basal einen Mittelwert von  $391,5 \pm 64,50$  bpm auf. An Tag 6 der Behandlung mit Angiotensin II liegt die HR im Mittel bei  $435,9 \pm 78,80$  bpm und an Tag 13 bei  $458,2 \pm 63,96$  bpm. Ein signifikanter Unterschied besteht nicht. Die Basalwerte des ESV liegen bei  $43,57 \pm 17,37 \mu\text{l}$ , nach 6 Tagen bei  $35,76 \pm 11,79 \mu\text{l}$  und nach 13 Tagen bei  $29,61 \pm 7,644 \mu\text{l}$ . Das EDV zeigt Basalwerte von  $81,61 \pm 20,46 \mu\text{l}$ , nach 6 Tagen Werte von  $78,79 \pm 22,91 \mu\text{l}$  und nach 13 Tagen  $64,50 \pm 12,12 \mu\text{l}$ . Der Basalwerte der LV Mass corrected liegt bei  $95,06 \pm 22,93 \text{mg}$ , nach 6 Tagen bei  $107,2 \pm 21,01 \text{mg}$  und nach 13 Tagen bei  $104,2 \pm 31,44 \text{mg}$ . Das IVS,s weist basal eine Breite von  $1,004 \pm 0,2271 \text{mm}$ , nach 6 Tagen eine Breite von  $1,013 \pm 0,1245 \text{mm}$  und nach 13 Tagen von  $1,034 \pm 0,06907 \text{mm}$  auf. Der Basalwert des IVS,d befindet sich bei  $0,8395 \pm 0,2452 \text{mm}$ , nach 6 Tagen bei einem Wert von  $0,7932 \pm 0,09731 \text{mm}$  und nach 13 Tagen bei  $0,8608 \pm 0,06807 \text{mm}$ . Die LVPW,d zeigt keine signifikanten Unterschiede im Verlauf (Basalwert:  $0,9176 \pm 0,2760 \text{mm}$ ; nach 6 Tagen:  $1,175 \pm 0,4311 \text{mm}$ ; nach 13 Tagen:  $0,9539 \pm 0,2303 \text{mm}$ ). Während der Systole zeigt sich eine signifikante Veränderung der LVPW,s (siehe Abbildung 17). Dargestellt wird eine signifikante Verbreiterung innerhalb von 6 Tagen (Basalwert:  $1,103 \pm 0,2788 \text{mm}$ ; nach 6 Tagen:  $1,615 \pm 0,4425 \text{mm}$ ;  $p < 0,05$ ). Zwischen dem

Basalwert und dem Wert gemessen an Tag 13 zeigt sich keine signifikante Veränderung (nach 13 Tagen:  $1,385 \pm 0,1672 \text{ mm}$ ).

Veränderungen der LVPW,s können auf eine Hypertrophie der Herzmuskulatur hinweisend sein. Die übrigen hypertrophierelevanten Parameter sind bei stabiler HR unauffällig.



**Abb. 17: Einfluss von Angiotensin II auf die LVPW,s**

*Signifikante Zunahme der LVPW,s nach 6 Tagen Behandlung mit Angiotensin II (WT: n=10; 6d: n=5; 13d: n=5, median with range, Kruskal-Wallis Test, \* p<0,05).*

Zur Bestimmung der kardialen Pumpfunktion unter Angiotensin II werden die Parameter EF, SV, CO, FS und AV Geschwindigkeit bestimmt.

#### **Angiotensin II führt zu einem Erhalt der kardialen Pumpleistung.**

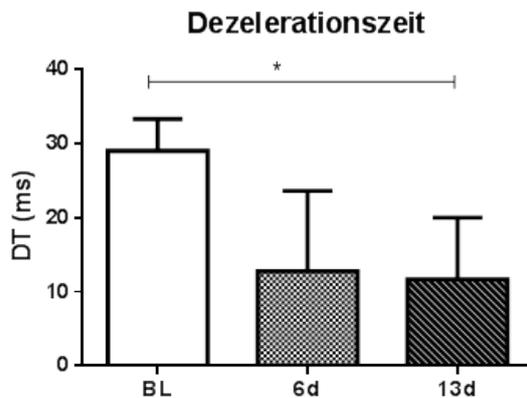
Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlung mit Angiotensin II von EF, SV, CO und AV Geschwindigkeit. Die basale Messung der EF liegt durchschnittlich bei  $48,42 \pm 12,57\%$ , nach 6 Tagen weist die EF einen Wert von  $54,41 \pm 10,50\%$  und nach 13 Tagen von  $54,28 \pm 7,280\%$  auf. Der Basalwert des FS liegt bei  $9,276 \pm 5,628\%$ , nach 6 Tagen liegt der Wert des FS bei  $15,82 \pm 6,960\%$  und nach 13 Tagen bei  $9,144 \pm 4,458\%$ . Das SV weist einen Basalwert von  $38,04 \pm 9,066 \mu\text{l}$  auf, nach 6 Tagen liegt das SV bei einem Wert von  $43,03 \pm 15,26 \mu\text{l}$  und nach 13 Tagen bei  $34,88 \pm 7,94 \mu\text{l}$ . Der Basalwert des CO von  $15,25 \pm 5,604 \text{ ml/min}$  liegt nach 6 Tagen bei einem Wert von  $19,02 \pm 7,525 \text{ ml/min}$  und nach 13 Tagen wiederum bei  $15,91 \pm 3,702 \text{ ml/min}$ . Die AV Geschwindigkeit weist basal einen durchschnittlichen Wert von  $1367 \pm 432,4 \text{ mm/s}$ , nach 6 Tagen Behandlung einen Wert von  $1159 \pm 345,2 \text{ mm/s}$  und nach 13 Tagen einen Wert von  $1223 \pm 416,3 \text{ mm/s}$  auf. Veränderungen in der kardialen Pumpleistung lassen sich echokardiographisch unter Angiotensin II nicht zeigen.

Zur Bestimmung des Mitralflusses und des Verhaltens während Diastole werden nachfolgende Parameter bestimmt.

#### **Angiotensin II führt zu einer Veränderung der diastolischen Parameter.**

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied des MV E/A-Verhältnisses zwischen den Werten nach 6 Tagen Behandlung und 13 Tagen Behandlung. Dabei liegt der Basalwert bei  $1,621 \pm 0,2993$ , nach 6 Tagen liegt das MV E/A-Verhältnis bei  $1,826 \pm 0,4573$  und nach 13 Tagen bei  $1,234 \pm 0,2738$ . Der MPI ist unverändert bei einem Basalwert von  $0,5034 \pm 0,2510$ , nach 6 Tagen durchschnittlich  $0,4936 \pm 0,1467$  und nach 13 Tagen  $0,6132 \pm 0,2103$ . Die DT zeigt eine signifikante Abnahme nach 13 Tagen ( $p < 0,05$ ) ausgehend vom Basalwert (siehe Abbildung 18).

Der Basalwert liegt bei  $26,58 \pm 5,914$ ms, nach 6 Tagen nimmt er auf  $16,11 \pm 6,807$ ms ab und nach 13 Tagen beträgt er durchschnittlich  $13,94 \pm 4,650$ ms. IVCT und IVRT zeigen keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Behandlung mit Angiotensin II. So liegt der Basalwert der IVCT bei  $10,21 \pm 5,564$ ms, nach 6 Tagen liegt der Wert durchschnittlich bei  $7,326 \pm 4,890$ ms und nach 13 Tagen bei  $7,278 \pm 3,166$ ms. Die IVRT zeigt basal gemessen einen Wert von  $17,86 \pm 6,871$ ms, nach 6 Tagen zeigt sich ein Wert von  $17,22 \pm 6,827$ ms und nach 13 Tagen von  $19,90 \pm 2,666$ ms. Die Acceleration bleibt konstant. Hier liegt der basal gemessene Wert bei  $15,03 \pm 2,093$ ms, nach 6 Tagen bei  $15,39 \pm 3,213$ ms und nach 13 Tagen bei  $14,44 \pm 0,8178$ ms.



**Abb. 18: Diastolische Dysfunktion bei WT unter Angiotensin II**

Angiotensin II führt zu einer Verkürzung der DT nach 13 Tagen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten WT und 13d behandelten WT (WT:  $n=10$ ; 6d:  $n=5$ ; 13d:  $n=5$ , median with range, Kruskal-Wallis Test, \*  $p < 0,05$ ).

Neben dem Effekt von Angiotensin II auf die Kardiomyozyten soll mittels FMD-Messung auch der Einfluss von Angiotensin II auf das Gefäßendothel bestimmt werden.

#### **Angiotensin II führt zu einer fehlenden FMD-Antwort.**

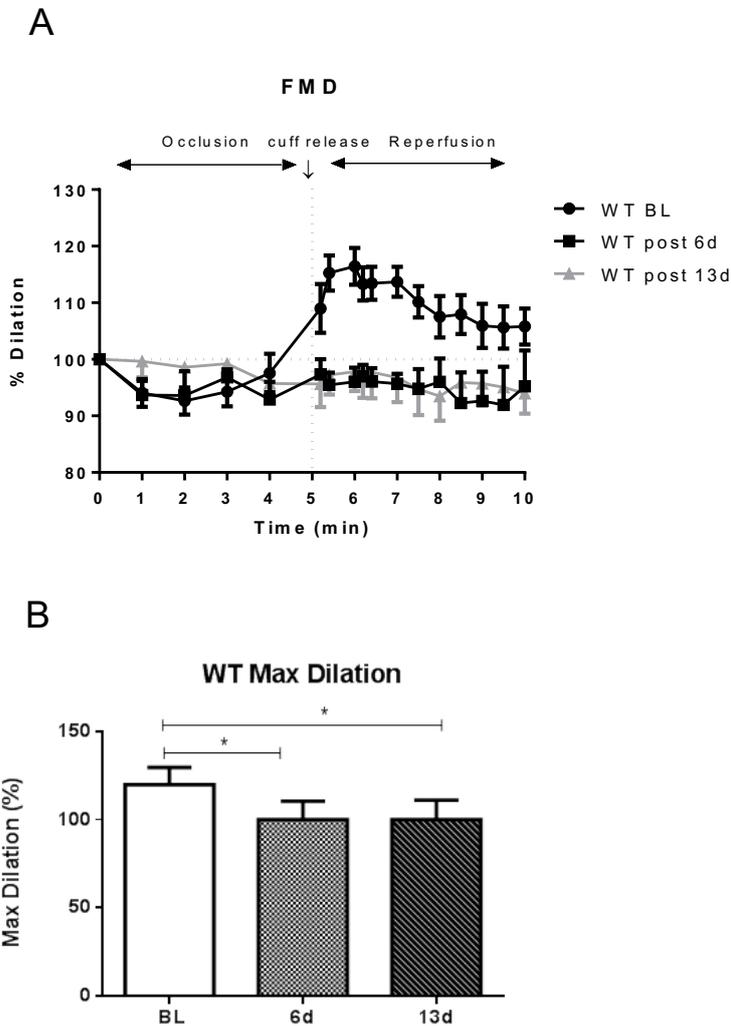
Unbehandelte WT zeigen eine normale FMD-Antwort. Während der Occlusion kontrahiert die *Arteria iliaca externa*. Der Gefäßdurchmesser verkleinert sich auf maximal  $90,8 \pm 6,527\%$ , nach Cuff-Öffnung dilatiert das Gefäß auf ein Maximum von  $119,2 \pm 8,798\%$ . Der Gefäßdurchmesser nähert sich im Verlauf der Reperfusion dem Basalwert wieder an.

Nach 6 Tagen Behandlung mit Angiotensin II ist die FMD-Antwort der WT deutlich reduziert. Während der Occlusionsphase kontrahiert das Gefäß, der Gefäßdurchmesser nimmt ab auf einen Wert von  $86,48 \pm 4,541\%$ . Nach Cuff-Öffnung vergrößert sich der Durchmesser, das Maximum der Dilatationsfähigkeit des Gefäßes liegt bei  $101,3 \pm 5,736\%$ . Es liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Maximalwerten der Dilatationsfähigkeit der basal gemessenen WT und der behandelten WT nach 6 Tagen vor ( $p < 0,05$ ).

Nach 13 Tagen Behandlung ist die Kontraktionsfähigkeit während der Occlusion schwächer ausgeprägt als bei den WT ohne Behandlung und bei den seit 6 Tagen behandelten WT ( $95,43 \pm 7,421\%$ ). Nach Cuff-Öffnung findet keine Dilatation über den Basalwert hinaus statt. Eine FMD-Antwort fehlt. Das Maximum der Dilatation erreicht einen Wert von  $99,19 \pm 8,926\%$ . Es liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Maximalwerten der Dilatationsfähigkeit der

basal gemessenen WT und der behandelten WT nach 13 Tagen vor ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 19).

Die Behandlung mit Angiotensin II über 6 bis 13 Tage führt bei den WT zu einer fehlenden FMD-Antwort, welche sich am 13. Tag durch eine fehlende Dilatationsfähigkeit während der Reperfusionphase sowie durch eine schwächer ausgeprägte Kontraktionsfähigkeit während der Occlusionsphase auszeichnet.



**Abb. 19: Fehlende FMD-Antwort bei WT unter Angiotensin II**

Angiotensin II führt zu einer fehlenden FMD-Antwort bei WT. Unbehandelte WT ( $n=8$ ) zeigen eine normale FMD-Antwort. Während der Occlusion kontrahiert die A.iliaca externa. Der Gefäßdurchmesser verkleinert sich auf maximal 90,8%, nach Cuff Öffnung dilatiert das Gefäß auf ein Maximum von 119,2%. Der Gefäßdurchmesser nähert sich dem Basalwert wieder an. Behandelte WT zeigen bereits nach 6 Tagen eine fehlende FMD-Antwort. Während der Occlusion kontrahiert das Gefäß, der Gefäßdurchmesser nimmt ab. Nach Cuff Öffnung vergrößert sich der Durchmesser, überschreitet aber nicht den Basalwert von 100%. Behandelte WT zeigen nach 13 Tagen eine fehlende FMD Antwort. Die Kontraktionsfähigkeit ist während der Occlusion schwächer ausgeprägt als bei den WT ohne Behandlung und bei den 6 Tage behandelten WT (WT: $n=8$ ; 6d: $n=4$ ; 13d: $n=5$ ) (A). Darstellung der maximalen Dilatation nach Cuff Öffnung bei WT (median with range, Kruskal-Wallis Test,  $* p < 0,05$ ) (B).

Die Pulswellengeschwindigkeit zeigt keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der Behandlung mit Angiotensin II ( $0,8889 \pm 0,3596 \text{ m/s} \rightarrow 0,8543 \pm 0,3614 \text{ m/s} \rightarrow 1,164 \pm 0,5109 \text{ m/s}$ ).

Angiotensin II scheint keinen wesentlichen Effekt auf die periphere Gefäßkonstitution im Sinne einer Gefäßsteifigkeit der *Arteria carotis communis* zu haben.

Parameter	Einheit	WT (A)	WT 6d (B)	WT 13d (C)	Signifikanz p
<b>Parameter der kardialen Funktion</b>					
Heart Rate	BPM	391,5±64,50	435,9±78,80	458,2±63,96	n.s.
AV Geschwindigkeit	mm/s	1367±432,4	1159±345,2	1223±416,3	n.s.
Endsystolisches Volumen	μl	43,57±17,37	35,76±11,79	29,61±7,644	n.s.
Enddiastolisches Volumen	μl	81,61±20,46	78,79±22,91	64,50±12,12	n.s.
LV Mass corrected	mg	95,06± 22,93	107,2± 21,01	104,2± 31,44	n.s.
IVS,s	mm	1,004±0,2271	1,013±0,1245	1,034±0,06907	n.s.
IVS,d	mm	0,8395±0,2452	0,7932±0,09731	0,8608±0,06807	n.s.
LVPW,d	mm	0,9176±0,2760	1,175±0,4311	0,9539±0,2303	n.s.
LVPW,s	mm	1,103±0,2788	1,615±0,4425	1,385±0,1672	A vs. B: <0,05
Ejection Fraction	%	48,42±12,57	54,41±10,50	54,28±7,280	n.s.
Fractional Shortening	%	9,276±5,628	15,82± 6,960	9,144±4,458	n.s.
Stroke Volume	μl	38,04±9,066	43,03±15,26	34,88±7,94	n.s.
Cardiac Output	ml/min	15,25±5,604	19,02±7,525	15,91±3,702	n.s.
<b>Parameter der diastolischen Funktion</b>					
MV E/A		1,621± 0,2993	1,826± 0,4573	1,234± 0,2738	n.s.
MPI		0,5034± 0,2510	0,4936±0,1467	0,6132± 0,2103	
Dezelerationszeit	ms	26,58±5,914	16,11±6,807	13,94±4,650	A vs. C: <0,05
Acceleration	ms	15,03±2,693	15,39±3,213	14,44±,8178	n.s.
IVCT	ms	10,21±5,56	7,326±4,890	7,278±3,166	n.s.
IVRT	ms	17,86 ±6,871	17,22±6,827	19,9±2,666	n.s.

**Tabelle 1: Echokardiographische Parameter der *in vivo* Basalmessung von WT und unter Angiotensin II**

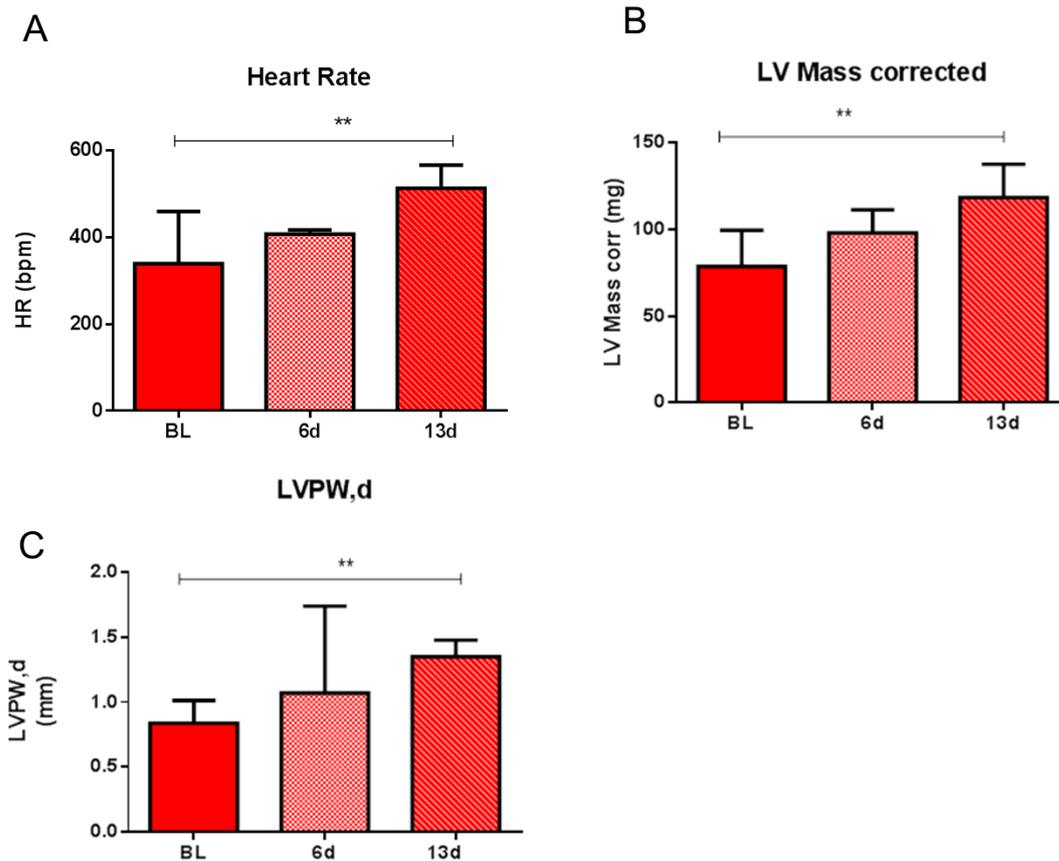
*Darstellung der Daten als  $Mw \pm SD$ . Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis Test bestimmt, das Signifikanzniveau liegt bei  $p < 0,05$ .*

### **Darstellung der echokardiographischen Ergebnisse. Einfluss von Angiotensin II auf alpha1-KO.**

Zur Bestimmung der unterschiedlichen Rolle der Untereinheiten des sGC Rezeptors (sGC alpha1 und alpha2) bezogen auf die Herzfunktion nativ sowie nach der kontinuierlichen subkutanen Abgabe von Angiotensin II, wird die linksventrikuläre Herzfunktion echokardiographisch bestimmt.

#### **Angiotensin II führt zu einem Anstieg der HR und zu einer LV Hypertrophie.**

Die HR zeigt signifikante Unterschiede im Sinne einer Erhöhung zwischen den basal gemessenen Mäusen und den 13 Tage lang behandelten Mäusen ( $p < 0,01$ ). Die HR liegt bei den basal gemessenen Mäusen durchschnittlich bei  $354,6 \pm 54,20$  bpm, bei den an Tag 6 gemessenen Mäusen liegt die HR bei  $406,4 \pm 12,76$  bpm und bei den an Tag 13 gemessenen Mäusen weist die HR einen Wert von durchschnittlich  $510,9 \pm 48,93$  bpm auf. Das ESV und EDV zeigen über den Behandlungsverlauf hin keinen signifikanten Unterschied. Das ESV weist durchschnittliche Werte von  $39,43 \pm 11,33$   $\mu$ l (Basalwert),  $27,66 \pm 9,546$   $\mu$ l (nach 6 Tagen) und  $38,88 \pm 12,06$   $\mu$ l (nach 13 Tagen) auf. Das EDV liegt durchschnittlich bei  $66,90 \pm 12,89$   $\mu$ l (Basalwert), bei  $55,73 \pm 14,27$   $\mu$ l nach 6 Tagen und bei  $69,32 \pm 16,39$   $\mu$ l nach 13 Tagen. Die LV Mass corrected zeigt signifikante Unterschiede. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der LV Mass corrected zwischen den Basalwerten und den Werten nach 13 Tagen Behandlung ( $p < 0,01$ ; Mittelwert Basalwert:  $81,14 \pm 14,05$  mg; Mittelwert nach 13 Tagen:  $121 \pm 11,97$  mg). Der Wert liegt durchschnittlich bei  $95,78 \pm 13,25$  mg nach 6 Tagen. Es finden sich keine signifikanten Veränderungen der Werte des IVS,s. Dabei liegen die Werte für die IVS,s im Mittel bei  $0,9654 \pm 0,2310$  mm (Basalwert),  $1,136 \pm 0,1393$  mm (nach 6 Tagen) und  $1,311 \pm 0,3802$  mm (nach 13 Tagen). Das IVS,d weist keine signifikante Verbreiterung nach 13 Tagen Behandlung auf. Der Basalwert liegt durchschnittlich bei  $0,7342 \pm 0,1289$  mm, nach 6 Tagen bei  $0,8684 \pm 0,1819$  mm und nach 13 Tagen bei  $1,109 \pm 0,3647$  mm. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der LVPW,d während der Behandlung mit Angiotensin II. Der p-Wert liegt ausgehend vom Basalwert nach 13 Tagen bei  $< 0,01$  (Basalwert:  $0,8071 \pm 0,1661$  mm; nach 6 Tagen:  $1,158 \pm 0,3419$  mm; nach 13 Tagen:  $1,326 \pm 0,1551$  mm). Die LVPW,s zeigt keine signifikanten Veränderungen (Basalwert:  $1,102 \pm 0,2065$  mm; nach 6 Tagen:  $1,438 \pm 0,5364$  mm; nach 13 Tagen:  $1,479 \pm 0,2148$  mm) (siehe Abbildung 20).



**Abb. 20: HR Anstieg und LV Hypertrophie unter Angiotensin II bei alpha1-KO**

Angiotensin II führt zu einer Zunahme der HR (A). Ausgehend vom Basalwert zeigt sich nach Behandlung mit Angiotensin II eine signifikante Zunahme der HR nach 13 Tagen. Mittelwerte: BL: 354,6bpm; 6d: 406,4bpm; 13d:510,9bpm (alpha1-KO: n=11; 6d: n=4; 13d: n=4). Angiotensin II verändert die LV Mass corrected (B). Es zeigt sich auch hier eine signifikante Zunahme der LV Mass corrected (alpha1-KO: n=11; 6d: n=5; 13d: n=4). Angiotensin II führt zu einer signifikanten Verbreiterung der LVPW,d (alpha1-KO: n=11; 6d: n=5; 13d: n=4) (C). median with range, Kruskal-Wallis Test, \*\* p<0,01.

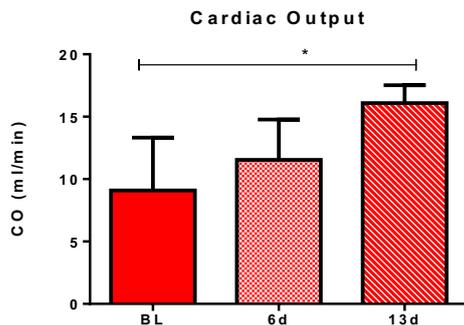
Neben strukturellen Herzmuskelveränderungen wird die Pumpleistung des Herzen anhand der Bestimmung von systolischen Parametern evaluiert.

**Angiotensin II führt zu einer Zunahme des CO.**

Hierbei zeigt sich, dass die Ejektionsfraktion keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Behandlung aufweist. Der Basalwert der EF liegt bei 41,74±8,192%, nach 6 Tagen liegt ein durchschnittlicher Wert von 48,20±1,779% und nach 13 Tagen von 44,46±5,749% vor.

Das Fractional Shortening zeigt keine signifikanten Veränderungen. Der Basalwert des FS liegt bei 9,877±4,435%, an Tag 6 bei einem durchschnittlichen Wert von 4,632±1,566% und an Tag 13 bei 9,562±2,557%. Das SV zeigt keine Unterschiede (Basalwert: 27,46±5,097µl; nach 6 Tagen: 28,06±5,312µl; nach 13 Tagen: 30,43±6,481µl). Es kommt zu einem Anstieg des CO im Verlauf der Behandlung über 13 Tage (Basalwert: 9,689±2,198ml/min; nach 6 Tagen: 11,86±2,165ml/min; nach 13 Tagen: 15,42±2,625ml/min). Hierbei liegt ein signifikanter Unterschied zwischen dem Basalwert und dem durchschnittlichen Wert an Tag 13 mit p<0,05 vor (siehe Abbildung 21). Die AV Geschwindigkeit weist keinen signifikanten Unterschied auf

(Basalwert:  $1222 \pm 281,9 \text{ mm/s}$ ; nach 6 Tagen:  $1470 \pm 859,0 \text{ mm/s}$ ; nach 13 Tagen  $1031 \pm 364,5 \text{ mm/s}$ ).



**Abb. 21: Anstieg des CO bei alpha1-KO**

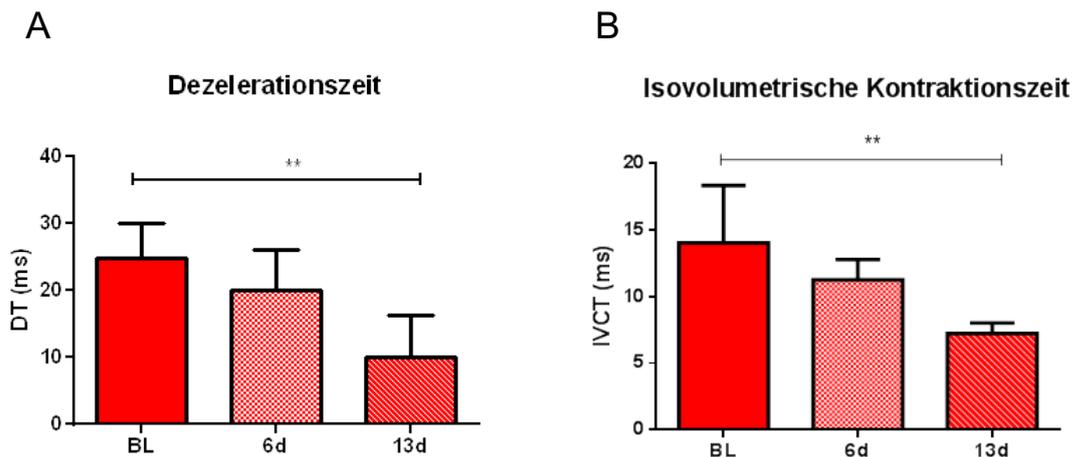
Angiotensin II führt zu einem erhöhten CO. Die Behandlung mit Angiotensin II zeigt nach 13 Tagen Behandlung eine signifikante Zunahme (alpha1-KO: n=10; 6d: n=5; 13d: n=4,) median with range, Kruskal-Wallis Test, \*p<0,05.

Um einen Hinweis auf eine vorliegende Relaxationsstörung des LV zu erhalten, werden echokardiographische Parameter zur Bestimmung der diastolischen Funktion ermittelt und verglichen.

#### **Angiotensin II führt zu einer diastolischen Dysfunktion.**

Das MV E/A-Verhältnis und der MPI zeigen keine Unterschiede. Die durchschnittlichen Werte des MV E/A-Verhältnisses liegen bei basaler Messung bei  $1,918 \pm 0,4045$ , nach 6 Tagen bei  $2,180 \pm 0,4262$  und nach 13 Tagen bei  $1,491 \pm 0,6848$ . Die durchschnittlichen Werte des MPI betragen  $0,7984 \pm 0,3406$  (basal),  $0,6713 \pm 0,2765$  (nach 6 Tagen),  $0,4643 \pm 0,09983$  (nach 13 Tagen).

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der DT. Es kommt zu einer Verkürzung während der 13-tägigen Behandlung (p<0,01). Der Mittelwert vor der Behandlung liegt bei  $23,65 \pm 3,998 \text{ ms}$ , nach 6 Tagen Behandlung bei  $18,82 \pm 6,310 \text{ ms}$  und nach 13 Tagen bei  $10,89 \pm 3,713 \text{ ms}$ . Ein signifikanter Unterschied der IVCT findet sich ebenfalls. Der Mittelwert liegt vor der Behandlung mit Angiotensin II bei  $16,22 \pm 5,29 \text{ ms}$ , nach 6 Tagen Behandlung bei  $11,53 \pm 0,8636 \text{ ms}$  und nach 13 Tagen Behandlung bei  $7 \pm 1,055 \text{ ms}$  (siehe Abbildung 22). Die IVRT zeigt keine Unterschiede durch die Behandlung mit Angiotensin II (Basalwert:  $19,71 \pm 3,249 \text{ ms}$ , nach 6 Tagen:  $19,77 \pm 5,608 \text{ ms}$ , nach 13 Tagen:  $15,455,802 \text{ ms}$ ). Der Basalwert der E-Wellen-Acceleration liegt durchschnittlich bei  $15,37 \pm 2,657 \text{ ms}$ , nach 6 Tagen liegt ein Durchschnittswert von  $15,89 \pm 1,868 \text{ ms}$  und nach 13 Tagen von  $13,13 \pm 0,9983 \text{ ms}$  vor. Die Veränderungen der DT geben einen Hinweis auf eine Reduktion der diastolischen Funktion des LV und sind Zeichen einer durch Angiotensin II verursachten pathologischen Auswirkung auf die diastolischen Abläufe des LV. Eine Übersicht der Daten ist in Tabelle 2 dargestellt.



**Abb. 22: Diastolische Dysfunktion der alpha1-KO unter Angiotensin II**

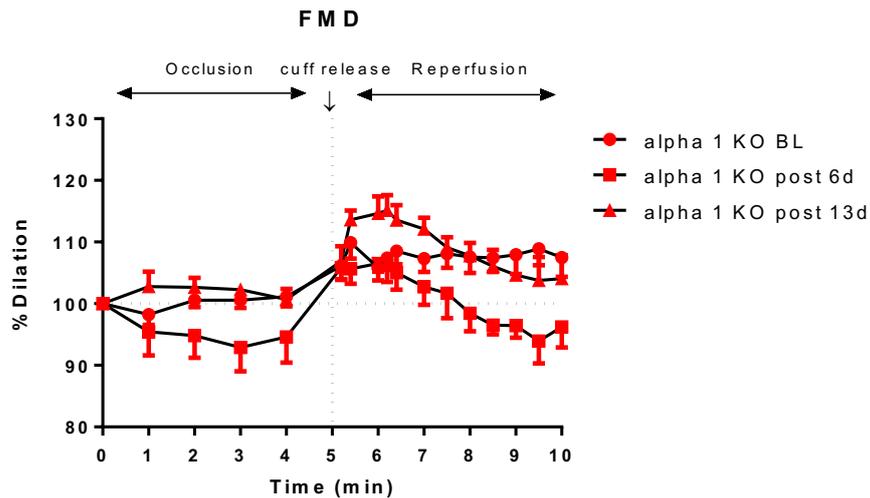
Angiotensin II führt zu einer Verkürzung der DT. Verglichen mit den basalen Werten ist die DT nach 13 Tagen Behandlung signifikant verkürzt. (alpha1-KO: n=11; 6d: n=5; 13d: n=5). Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der IVCT nach 13 Tagen (alpha1-KO: n=6; 6d: n=4; 13d: n=4) median with range, Kruskal-Wallis Test, \*\*p<0,01.

sGC Rezeptoren befinden sich nicht nur in den Kardiomyozyten, sondern spielen insbesondere eine Rolle im Gefäßendothel. Welchen Einfluss Angiotensin II auf die vaskuläre Funktion nimmt, wird im nachfolgenden erläutert.

#### **Erhaltene FMD nach 13 Tagen Angiotensin II und Dilatation während Occlusion.**

Während Occlusion bleibt der Gefäßdurchmesser der basal gemessenen alpha1-KO um den Basalwert herum stabil (maximale Kontraktion auf 98,23%), während Reperfusion dilatiert das Gefäß auf ein Maximum von 112,3±6,591%. Eine Annäherung an den Basalwert innerhalb von fünf Minuten Reperfusion zeigt sich nicht.

Nach 6 Tagen Behandlung mit Angiotensin II zeigt sich eine maximale Dilatation auf 107,6±2,831% nach Cuff-Öffnung. Der Durchmesser nähert sich dem Basalwert an. Es besteht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die maximale Dilatationsfähigkeit des Gefäßes während Reperfusion zwischen der Messung an Tag 6 und Tag 13. Während Occlusion kommt es zu einer Kontraktion des Gefäßes. Nach 13 Tagen Behandlung mit Angiotensin II zeigt sich eine verbesserte Dilatationsfähigkeit des Gefäßes nach Cuff-Öffnung auf ein Maximum von 115,7±4,315% mit anschließender Annäherung an den Basalwert. Während Occlusion zeigt sich keine Kontraktion des Gefäßes, sondern bereits hier eine Dilatation mit einem Maximum von 105,2±3,227%. Nach 6 Tagen Behandlung zeigt sich bei den alpha1-KO eine Verschlechterung der FMD-Antwort, welche nach 13 Tagen Behandlung in eine Verbesserung der Dilatationsfähigkeit des Gefäßes umschlägt (siehe Abbildung 23). Dies bedeutet, dass Angiotensin II keinen langanhaltenden Effekt auf das Endothel von alpha1-KO nach zugeführten Scherkräften hat, jedoch während der Occlusionsphase einen Einfluss auf das Endothel nimmt und im Gegensatz zu WT unter Angiotensin II zu einer Dilatation des Gefäßes führt. Das Endothel in den herznahen Gefäßen zeigt keine Veränderungen unter Angiotensin II validiert an der PWV.



**Abb. 23: Nach 13 Tagen erhaltene FMD bei alpha1-KO**

Angiotensin II führt in alpha1-KO zu einer verbesserten FMD-Antwort. Während Occlusion bleibt der Gefäßdiameter der alpha1-KO (n=12) in Höhe des Basalwertes stabil, während Reperfusion dilatiert das Gefäß auf ein Maximum von 112,3%. Eine Annäherung an den Basalwert innerhalb von fünf Minuten Reperfusion zeigt sich nicht. Behandelte alpha1-KO zeigen eine verminderte FMD-Antwort. Nach 6 Tagen Behandlung mit Angiotensin II zeigt sich eine maximale Dilatation auf 107,6% nach Cuff Öffnung, zwischen Minute 7,5 und 8 nimmt der Gefäßdiameter ab und nimmt Werte unter 100% an. Anschließend nähert sich der Diameter dem Basalwert an. Während Occlusion kommt es zu einer Kontraktion des Gefäßes, n=4. Behandelte alpha1-KO zeigen nach 13 Tagen eine verbesserte nicht signifikante FMD-Antwort. Nach 13 Tagen Behandlung mit Angiotensin II zeigt sich eine verbesserte Dilatationsfähigkeit des Gefäßes nach Cuff Öffnung auf ein Maximum von 115,7% mit anschließender Annäherung an den Basalwert. Während Occlusion zeigt sich keine Kontraktion des Gefäßes, sondern bereits hier eine Dilatation, n=4. Eine signifikante Veränderung der maximalen Dilatation nach Cuff Öffnung zeigt sich nicht. Kruskal-Wallis Test.

Parameter	Einheit	Alpha1-KO (A)	Alpha1-KO 6d (B)	Alpha1-KO 13d (C)	Signifikanz p
<b>Parameter der kardialen Funktion</b>					
Heart Rate	BPM	354,6± 54,2	406,4± 12,76	510,9± 48,93	A vs. C: <0,01
AV Geschwindigkeit	mm/s	1222±281,9	1470±859	1031±364,5	n.s.
Endsystolisches Volumen	μl	39,43±11,33	27,66±9,546	38,88±12,06	n.s.
Enddiastolisches Volumen	μl	66,90±12,89	55,73±14,27	69,32±16,39	n.s.
LV Mass corrected	mg	81,14±14,05	95,78±13,25	121±11,97	A vs. C: <0,01
IVS,s	mm	0,9654±0,231	1,136±0,1393	1,311± 0,3802	n.s.
IVS,d	mm	0,7342±0,1289	0,8684±0,1819	1,109±0,3647	n.s.
LVPW,d	mm	0,8071±0,166	1,158±0,3419	1,326±0,1551	A vs. C: <0,01
LVPW,s	mm	1,102±0,2065	1,438±0,5364	1,479±0,2148	n.s.
Ejection Fraction	%	41,74±8,192	48,20±1,779	44,46±5,749	n.s.
Fractional Shortening	%	9,877±4,435	4,632±1,566	9,562±2,557	n.s.
Stroke Volume	μl	27,46±5,097	28,06±5,312	30,43±6,481	n.s.
Cardiac Output	ml/min	9,689±2,198	11,86±2,165	15,42±2,625	A vs. C: <0,05
<b>Parameter der diastolischen Funktion</b>					
MV E/A		1,918±0,4045	2,180±0,4262	1,491±0,6848	n.s.
MPI		0,7984±0,3406	0,6713±0,2765	0,4643±0,09983	n.s.
Dezelerationszeit	ms	23,65 ±3,998	18,82±6,31	10,89±3,713	A vs. C: <0,01
Acceleration	ms	15,37±2,657	15,89±1,868	13,13±0,9983	n.s.
IVCT	ms	16,22±5,29	11,53±0,8636	7±1,055	A vs. C: >0,01
IVRT	ms	19,71±3,249	19,77±5,608	15,455,802	n.s.

**Tabelle 2: Echokardiographische Parameter *in vivo* bei alpha1-KO ohne und mit Angiotensin II**

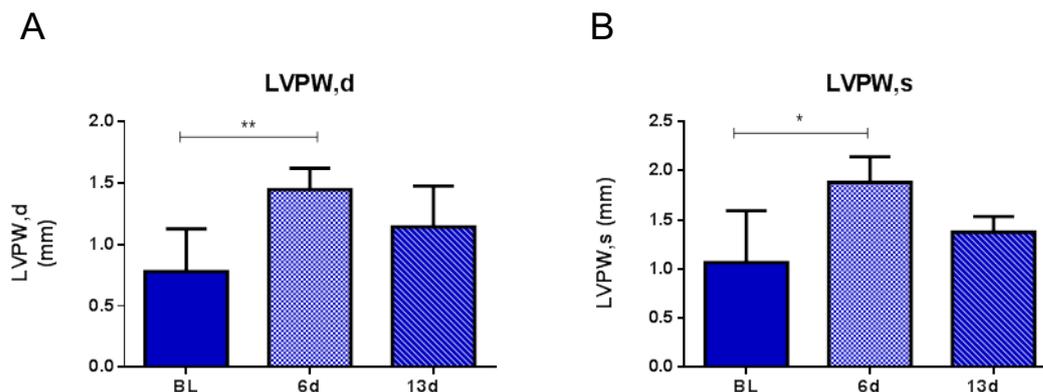
*Darstellung der Daten als Mw± SD. Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis Test bestimmt, das Signifikanzniveau liegt bei p<0,05.*

## Darstellung der echokardiographischen Ergebnisse. Einfluss von Angiotensin II auf alpha2-KO.

Um die Rolle der alpha2-KO auf die kardiale LV Funktion zu bestimmen, wurden echokardiographisch verschiedene Parameter zur Bestimmung struktureller Veränderungen der Herzmuskulatur bestimmt. Eine Übersicht der Daten findet sich in Tabelle 3.

### Dabei zeigt sich, dass Angiotensin II zu einer Hypertrophie des linken Ventrikels führt.

Die HR zeigt im Verlauf der Behandlung mit Angiotensin II keinen signifikanten Unterschied (Basalwert:  $353,5 \pm 54,80$  bpm; nach 6 Tagen:  $398,7 \pm 46,53$  bpm; nach 13 Tagen:  $407,8 \pm 62,31$  bpm). Auch das ESV und EDV sind nicht signifikant verändert. Der Basalwert des ESV liegt bei  $31,02 \pm 11,46 \mu\text{l}$ ; nach 6 Tagen liegt der Wert durchschnittlich bei  $18,52 \pm 8,697 \mu\text{l}$  und nach 13 Tagen bei  $23,86 \pm 9,723 \mu\text{l}$ . Der Basalwert des EDV liegt bei  $59,50 \pm 7,349 \mu\text{l}$ , nach 6 Tagen durchschnittlich bei  $47,42 \pm 13,58 \mu\text{l}$  und nach 13 Tagen bei  $54,03 \pm 16,95 \mu\text{l}$ . Die LV Mass corrected zeigt keine signifikanten Veränderungen (Basalwert:  $76,51 \pm 15,46$  mg; nach 6 Tagen:  $95,27 \pm 16,92$  mg; nach 13 Tagen:  $88,72 \pm 19,95$  mg). Das IVS,s und das IVS,d weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Der Basalwert des IVS,s liegt bei  $0,9528 \pm 0,1818$  mm, nach 6 Tagen bei  $1,173 \pm 0,3867$  mm und nach 13 Tagen bei  $1,129 \pm 0,3232$  mm. Der Basalwert des IVS,d liegt bei  $0,6724 \pm 0,1267$  mm; nach 6 Tagen:  $0,8955 \pm 0,1285$  mm und nach 13 Tagen:  $0,8612 \pm 0,161$  mm. Innerhalb von 6 Tagen kommt es zu einer signifikanten Zunahme der LVPW,d ( $p < 0,01$ ; Basalwert:  $0,8466 \pm 0,2067$  mm; nach 6 Tagen:  $1,420 \pm 0,2138$  mm; nach 13 Tagen:  $1,100 \pm 0,3466$  mm). Auch die LVPW,s weist signifikante Abweichungen in der zeitlichen Messung auf. Zwischen dem Basalwert und dem Wert gemessen an Tag 6 zeigt sich eine signifikante Zunahme ( $p < 0,01$ ) (Basalwert:  $1,147 \pm 0,3027$  mm; nach 6 Tagen:  $1,863 \pm 0,2272$  mm; nach 13 Tagen:  $1,230 \pm 0,4042$  mm) (siehe Abbildung 24).



**Abb. 24: LV Hypertrophie bei alpha2-KO**

Angiotensin II führt nach 6d zu einer Zunahme der LVPW,d. (alpha2-KO: n=8; 6d: n=5; 13d: n=4) (A). Angiotensin II führt nach 6d zu einer Zunahme der LVPW,s. (alpha2-KO: n=8; 6d: n=5; 13d: n=4) (B). median with range, Kruskal-Wallis Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Die Pumpfunktion des Herzens der alpha2-KO wird nachfolgend dargestellt.

### Erhalt der Pumpfunktion des LV unter Angiotensin II.

EF, FS, SV und CO zeigen keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Behandlung mit Angiotensin II. Der Basalwert der EF liegt bei  $52,27 \pm 10,13\%$ , nach 6 Tagen bei  $56,42 \pm 1,325\%$

und nach 13 Tagen bei  $56,51 \pm 9,823\%$ . Der Basalwert des SV liegt bei  $32,77 \pm 6,212 \mu\text{l}$ , nach 6 Tagen bei  $28,90 \pm 7,749 \mu\text{l}$  und nach 13 Tagen durchschnittlich bei  $30,17 \pm 9,486 \mu\text{l}$ . Der Basalwert des CO liegt bei  $11,72 \pm 3,439 \text{ml/min}$ , nach 6 Tagen liegt der Wert durchschnittlich bei  $11,44 \pm 2,997 \text{ml/min}$  und nach 13 Tagen bei  $11,91 \pm 1,939 \text{ml/min}$ .

Die AV Geschwindigkeit ist nicht signifikant verschieden (Basalwert:  $1107 \pm 364,5 \text{mm/s}$ ; nach 6 Tagen:  $1131 \pm 92,23 \text{mm/s}$ ; nach 13 Tagen:  $947,8 \pm 23,96 \text{mm/s}$ ).

#### **Angiotensin II führt zu einer erhaltenen diastolischen Funktion.**

Das MV E/A-Verhältnis zeigt keine signifikanten Veränderungen. Basal gemessen liegt ein Wert von  $1,527 \pm 0,2054$  vor. Nach 6 Tagen liegt der Wert durchschnittlich bei  $2,355 \pm 1,715$  und nach 13 Tagen bei  $1,871 \pm 0,4098$ . Der MPI weist einen Basalwert von  $0,6601 \pm 0,2195$ , nach 6 Tagen von  $0,6161 \pm 0,09710$  und nach 13 Tagen von  $0,7405 \pm 0,05501$  auf. Die DT weist folgende Werte auf: basal:  $23,65 \pm 5,659 \text{ms}$ , nach 6 Tagen:  $18,58 \pm 5,252 \text{ms}$ , nach 13 Tagen:  $19,17 \pm 5,858 \text{ms}$ . Die IVCT zeigt einen Basalwert von  $12,95 \pm 4,424 \text{ms}$  sowie einen Durchschnittswert von  $9,667 \pm 3,780 \text{ms}$  nach 6 Tagen und einen Wert von  $9,271 \pm 2,549 \text{ms}$  nach 13 Tagen. Die IVRT weist keine signifikanten Veränderungen auf (Basalwert:  $23,40 \pm 7,536 \text{ms}$ ; nach 6 Tagen:  $21,15 \pm 2,668 \text{ms}$ ; nach 13 Tagen  $26,53 \pm 2,035 \text{ms}$ ).

Die E-Wellen-Acceleration zeigt keine signifikanten Veränderungen. Es liegt ein Basalwert von  $15,66 \pm 2,394 \text{ms}$ , nach 6 Tagen liegt ein Durchschnittswert von  $15,06 \pm 2,368 \text{ms}$  und nach 13 Tagen von  $10,97 \pm 3,306 \text{ms}$  vor.

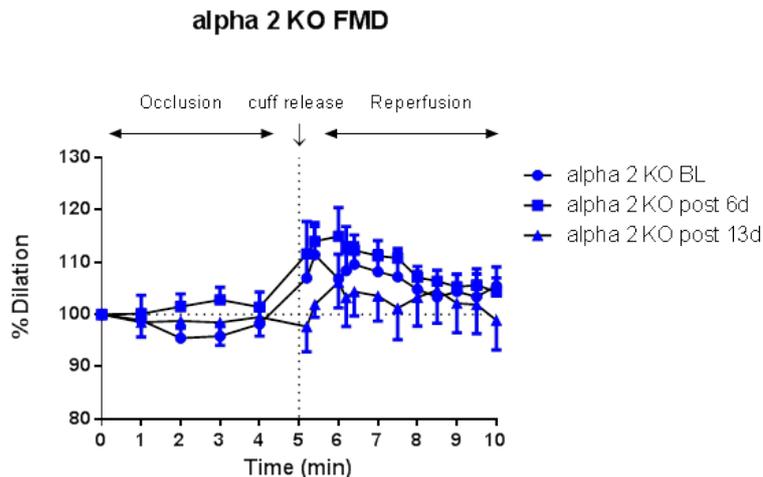
Bei alpha2-KO soll die Rolle der  $sGC\alpha_2$  im Endothel peripherer vaskulärer Gefäße sowie aortalen Gefäßen untersucht werden und der Einfluss von Angiotensin II auf die Signalkaskade eruiert werden.

#### **Angiotensin II führt zu einem Erhalt der endothelialen Funktion in alpha2-KO.**

Basal gemessene alpha2-KO zeigen eine normale FMD-Antwort. Während der Occlusion zeigen unbehandelte alpha2-KO eine Kontraktion des Gefäßes, während der Reperfusion vergrößert sich der Gefäßdiameter auf ein Maximum von  $115,5 \pm 13,77\%$ . Der Diameter nähert sich dem Basalwert im weiteren Verlauf an.

Behandelte alpha2-KO zeigen eine verbesserte FMD-Antwort nach 6 Tagen (siehe Abbildung 27). Während der Occlusion zeigt sich eine Vasodilatation der 6 Tage behandelten alpha2-KO, der Gefäßdiameter nimmt zu, während der Reperfusionsphase vergrößert sich der Diameter auf ein Maximum von  $118,0 \pm 10,34\%$ . Anschließend nähert er sich dem Basalwert wieder an. Während der Reperfusionsphase kommt es zu einer verbesserten Gefäßdilatation. Nach 13 Tagen Behandlung verschlechtert sich die FMD-Antwort verglichen mit der verbesserten FMD-Antwort der alpha2-KO nach 6 Tagen Behandlung. Während der Occlusion kommt es zu einer Kontraktion des Gefäßes mit nachfolgender Gefäßdilatation in der Reperfusionsphase auf ein Maximum von  $107,4 \pm 11,38\%$ .

Alpha2-KO zeigen ohne Behandlung eine erhaltene FMD-Antwort. Die Behandlung mit Angiotensin II führt nach 6 Tagen zu einer verbesserten FMD-Antwort mit einer einhergehenden Dilatation während Occlusion. Es zeigt sich jedoch keine signifikante Veränderung der maximalen Dilatation (siehe Abbildung 25).

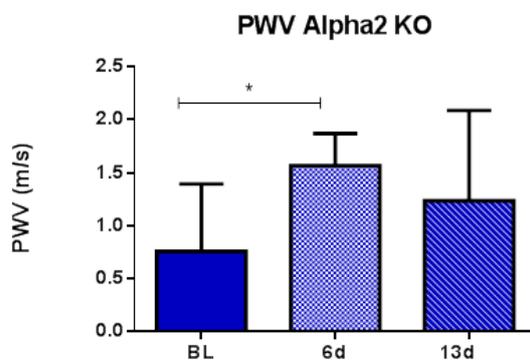


**Abb. 25: Erhalt der FMD von alpha2-KO unter Angiotensin II**

Alpha2-KO zeigen eine erhaltene FMD-Antwort. Während der Occlusion zeigen alpha2-KO (n=8) eine Kontraktion des Gefäßes, während der Reperfusion vergrößert sich der Gefäßdiameter auf ein Maximum von 115,5%. Der Diameter nähert sich dem Basalwert im weiteren Verlauf an. Behandelte alpha2-KO zeigen eine verbesserte FMD-Antwort nach 6 Tagen Angiotensin II. Während der Reperfusionsphase dilatiert das Gefäß verstärkt im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (n=5). Nach 13 Tagen Behandlung verschlechtert sich die FMD-Antwort. Verglichen mit der verbesserten FMD-Antwort der alpha2-KO (n=5) nach 6 Tagen Behandlung, kontrahiert das Gefäß während der Occlusion leicht und dilatiert in der Reperfusionsphase auf ein Maximum von 107,4%. Der Diameter nähert sich dem Basalwert wieder an. Kruskal-Wallis Test.

#### Angiotensin II führt zu einer Zunahme der PWV.

Angiotensin II hat einen signifikanten Effekt auf die PWV. Die Behandlung mit Angiotensin II weist im Verlauf eine Zunahme der PWV nach 6 Tagen Behandlung auf (p<0,05). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Basalwert und dem Wert gemessen an Tag 13. Der Basalwert liegt bei 0,7485±0,3351m/s, nach 6 Tagen liegt der Wert durchschnittlich bei 1,523±0,3382m/s und nach 13 Tagen bei 1,299±0,5552m/s (siehe Abbildung 26).



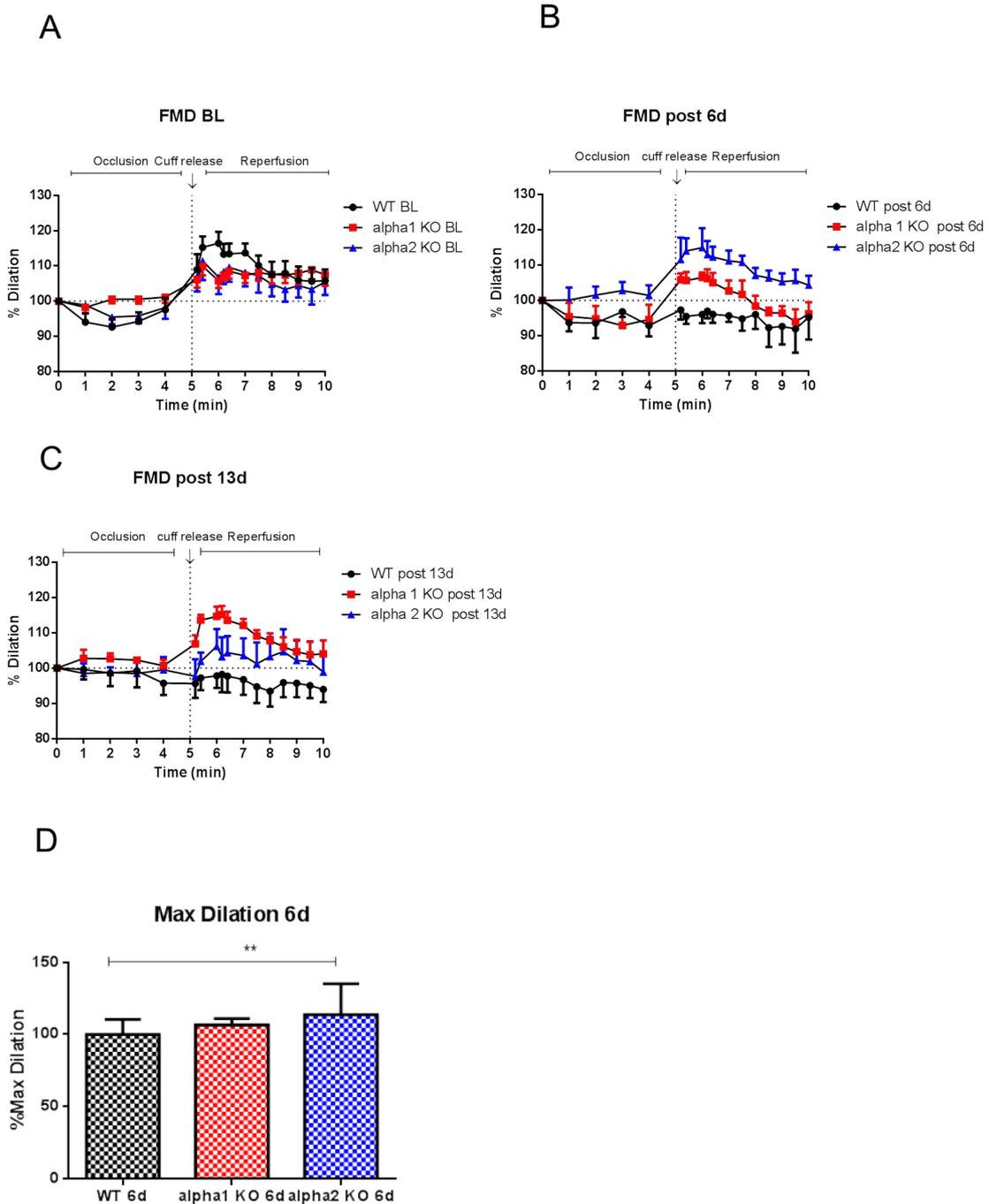
**Abb. 26: Zunahme der PWV**

Nach 6 Tagen zeigt sich eine Zunahme der PWV mit Normalisierung nach 13 Tagen (alpha2-KO: n=7; 6d: n=4; 13d: n=5), median with range, Kruskal-Wallis Test, \*p<0.05.

Parameter	Einheit	Alpha2-KO A	Alpha2-KO 6d B	Alpha2-KO 13d C	Signifikanz p
<b>Parameter der kardialen Funktion</b>					
Heart Rate	BPM	353,5±54,8	398,7±46,53	407,8±62,31	n.s.
AV Geschwindigkeit	mm/s	1107±364,5	1131±92,23	947,8±23,96	n.s.
Endsystolisches Volumen	μl	31,02±11,46	18,52±8,697	23,86±9,723	n.s.
Enddiastolisches Volumen	μl	59,50±7,349	47,42±13,58	54,03±16,95	n.s.
LV Mass corrected	Mg	76,51±15,46	95,27±16,92	88,72±19,95	n.s.
IVS,s	Mm	0,9528±0,1818	1,173±0,3867	1,129±0,3232	n.s.
IVS,d	Mm	0,6724±0,1267	0,8955±0,1285	0,8612±0,1610	n.s.
LVPW,d	Mm	0,8466±0,2067	1,420±0,2138	1,100±0,3466	A vs. B: <0,01
LVPW,s	Mm	1,147±0,3027	1,863±0,2272	1,230±0,4042	A vs. B: <0,05
Ejection Fraction	%	52,27±10,13	56,42±1,325	56,51±9,823	n.s.
Fractional Shortening	%	12,26±6,853	19,14±6,245	11,53±3,906	n.s.
Stroke Volume	μl	32,77±6,212	28,90±7,749	30,17±9,486	n.s.
Cardiac Output	ml/min	11,72±3,439	11,44±2,997	11,91±1,939	n.s.
<b>Parameter der diastolischen Funktion</b>					
MV E/A		1,527±0,2054	2,355±1,715	1,871±0,4098	n.s.
MPI		0,6601±0,2195	0,6161±0,09710	0,7405±0,05501	n.s.
Dezelerationszeit	Ms	23,65±5,659	18,58±5,252	19,17±5,858	n.s.
Acceleration	Ms	15,66±2,394	15,06±2,368	10,97±3,306	n.s.
IVCT	Ms	12,95±4,424	9,667±3,78	9,271±2,549	n.s.
IVRT	Ms	23,40±7,536	21,15±2,668	26,53±2,035	n.s.

**Tabelle 3: Echokardiographische Parameter *in vivo* der alpha2-KO ohne und mit Angiotensin II**

*Darstellung der Daten als  $Mw \pm SD$ . Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis Test bestimmt, das Signifikanzniveau liegt bei  $p < 0,05$ .*



**Abb. 27: Einfluss von Angiotensin II auf die Gefäßfunktion von WT, alpha1-KO und alpha2-KO**

FMD vor Behandlung mit Angiotensin II. WT zeigen eine bessere FMD-Antwort als alpha1-KO und alpha2-KO. WT (n=10) zeigen eine Dilatation während der Reperfusion auf maximal 119,2%. Alpha1-KO (n=12) zeigen eine Dilatation während der Reperfusion auf maximal 112,3%. Alpha2-KO (n=8) zeigen eine Dilatation während der Reperfusion auf maximal 115,5%. Während der Occlusion vermindert sich der Gefäßdiameter bei den WT und den alpha2-KO, während alpha1-KO um den Basalwert herum stabil bleiben (A). Angiotensin II hat einen Effekt auf die FMD-Antwort. Darstellung der FMD in allen 3 Strains nach 6 Tagen Behandlung mit Angiotensin II. WT (n=4) zeigen eine fehlende FMD-Antwort, es kommt nicht zu einer Dilatation ausgelöst durch Scherkräfte nach Cuff Öffnung. Alpha1-KO (n= 4) zeigen eine leicht erniedrigte FMD-Antwort auf 107,56, sowie eine vermehrte Kontraktionsfähigkeit während Occlusion. Alpha2-KO (n=5) zeigen eine verbesserte FMD-Antwort während Reperfusion. Maximale Dilatation auf 118% (B). Verbesserte FMD-Antwort bei alpha1-KO nach 13 Tagen Behandlung mit Angiotensin II. WT

*(n=5) zeigen eine verschlechterte Kontraktion während Occlusion verglichen mit der Messung am 6. Tag. Alpha2-KO (n=5) zeigen nun während Occlusion eine Kontraktion, während Reperfusion weiterhin einen Dilatation mit einem Maximum von 107,4% (C). Maximale Dilatation signifikant an Tag 6 bei alpha2-KO verändert (D). median with range, Kruskal-Wallis Test, \*\*p<0,01*

### 3.2 | Echokardiographische Beurteilung der vaskulären und kardialen Funktion von eNOS KO im Alter

#### Darstellung der echokardiographischen Ergebnisse des Vergleiches zwischen WT und eNOS KO

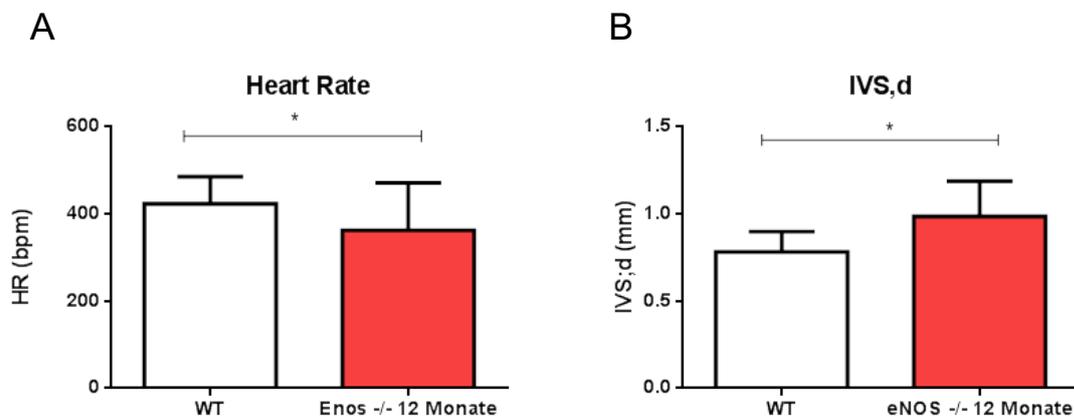
Um die Auswirkungen einer fehlenden eNOS auf die kardiale Funktion zu eruieren, werden echokardiographisch verschiedene Parameter bestimmt. Dabei zeigen sich zwei wesentliche Unterschiede bezüglich der Parameter der allgemeinen Herzfunktion bei dem Vergleich von WT (Littermates) mit 12 Monate alten eNOS KO.

#### eNOS KO zeigen eine erniedrigte HR und eine Zunahme des IVS,d.

Die Heart Rate ist bei den 12 Monate alten eNOS KO signifikant erniedrigt ( $376,8 \pm 51,51$ ;  $p < 0,05$ ).

Das endsystolische und das enddiastolische Volumen sowie die LV Mass corrected zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und 12 Monate alten eNOS KO. Dabei liegen das ESV im Mittel bei  $24,99 \pm 8,128 \mu\text{l}$  und das EDV bei  $65,46 \pm 7,905 \mu\text{l}$ . Die LV Mass corrected weist einen Mittelwert von  $102,8 \pm 35,53 \text{mg}$  auf. Das interventrikuläre Septum zeigt in Diastole eine signifikante Verbreiterung im Vergleich mit WT (WT:  $0,7847 \pm 0,103 \text{mm}$ ; 12 Monate alte eNOS KO:  $0,9539 \pm 0,1463 \text{mm}$ ;  $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 28).

Der Mittelwert des IVS,s liegt bei  $1,278 \pm 0,2526 \text{mm}$ .



**Abb. 28: Zunahme der IVS,d bei eNOS KO**

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen eNOS KO 12 Monate und WT. eNOS KO zeigen eine erniedrigte HR im Vergleich mit WT (im Mittel  $435,9 \text{bpm}$  vs.  $376,8 \text{bpm}$ ). WT:  $n=8$ ; eNOS KO 12 Monate:  $n=7$  (A). Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen WT und eNOS KO 12 Monate. Das interventrikuläre Septum ist in Diastole signifikant breiter als bei den WT. WT:  $n=8$ ; eNOS KO 12 Monate:  $n=7$  (B). median with range, Mann-Whitney Test,  $*p < 0,05$ .

Zur Bestimmung der LV Pumpfunktion im Vergleich mit WT werden echokardiographisch systolische Parameter bestimmt.

#### eNOS KO zeigen eine erhaltene systolische Funktion.

Die Parameter der systolischen Funktion SV, CO und AV Geschwindigkeit weisen bei WT und 12 Monate alten eNOS KO vergleichbare Werte auf. Das SV liegt im Mittel bei  $40,47 \pm 9,131 \mu\text{l}$ .

Das CO weist im Mittel einen Wert von  $15,48 \pm 5,060$  ml/min auf. Der Mittelwert der AV Geschwindigkeit liegt bei  $1358 \pm 526,9$  mm/s. Auch die EF und das FS zeigen keinen signifikanten Unterschied (Mittelwert EF:  $61,78 \pm 12,07$ ; FS:  $12,87 \pm 6,122$ ).

#### **eNOS KO zeigen eine erhaltene diastolische Funktion.**

Die Parameter MV E/A, MPI, DT, IVCT, IVRT und Acceleration zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und 12 Monate alten eNOS KO. Das MV E/A-Verhältnis zeigt einen Mittelwert von  $1,496 \pm 0,3919$ , sowie einen MPI von  $0,6987 \pm 0,1940$ . Die DT liegt im Mittel bei  $20,20 \pm 3,479$  ms. Die IVCT zeigt einen Mittelwert von  $11,78 \pm 6,015$  ms, die IVRT einen Mittelwert von  $21,85 \pm 5,854$  ms. Der Mittelwert der Acceleration liegt bei  $15,46 \pm 2,704$  ms. Die Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

#### **eNOS KO zeigen eine fehlende FMD-Antwort.**

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Gefäßverhalten während Reperfusion bei 12 Monate alten eNOS KO. Während der Reperfusionsphase dilatiert die *Arteria externa iliaca* nicht, während Occlusion zeigt sich eine Kontraktion des Gefäßes mit einem Rückgang auf den Basalwert kurz vor der Cuff-Öffnung (Maximale Kontraktion  $92,5 \pm 9,799\%$ ). Während der Reperfusion fehlt eine FMD-Antwort auf die zugeführten Scherkräfte, das Endothel ist in seiner Funktion gestört (siehe Abbildung 29).

#### **eNOS KO zeigen keine erhöhte PWV.**

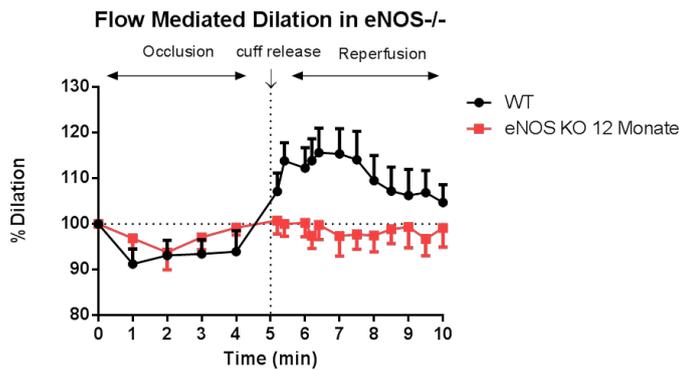
12 Monate alten eNOS KO zeigen gegenüber WT keine signifikante Erhöhung der PWV ( $1,566 \pm 0,7064$  m/s).

Parameter	Einheit	WT	eNOS KO	Signifikanz p
<b>Parameter der kardialen Funktion</b>				
Heart Rate	BPM	435,9±40,34	376,8±51,51	<0,05
AV Geschwindigkeit	mm/s	1563±412,5	1358± 526,9	n.s.
Endsystolisches Volumen	µl	33,21±13,84	24,99±8,128	n.s.
Enddiastolisches Volumen	µl	67,67±26,66	65,46±7,905	n.s.
LV Mass corrected	mg	102,1±29,05	102,8±35,53	n.s.
IVS,s	mm	1,041±0,1849	1,278±0,2526	n.s.
IVS,d	mm	0,7847±0,103	0,9539±0,1463	<0,05
Ejection Fraction	%	49,79±12,64	61,78±12,07	n.s.
Fractional Shortening	%	7,921±2,281	12,87±6,122	n.s.
Stroke Volume	µl	34,46±15,84	40,47± 9,131	n.s.
Cardiac Output	ml/min	15,32±7,857	15,48± 5,060	n.s.
<b>Parameter der diastolischen Funktion</b>				
MV E/A		1,537±0,1804	1,496± 0,3919	n.s.
MPI		0,6439±0,2649	0,6987± 0,194	n.s.
Dezelerationszeit	ms	23,32±3,955	20,20± 3,479	n.s.
Acceleration	ms	13,59±2,076	15,46± 2,704	n.s.
IVCT	ms	8,351±3,836	11,78± 6,015	n.s.
IVRT	ms	18,08±3,355	21,85± 5,854	n.s.

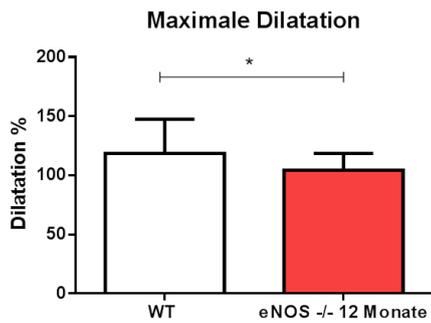
**Tabelle 4: Echokardiographische Parameter *in vivo* der eNOS KO**

Darstellung der Daten als  $Mw \pm SD$ . Unterschiede zwischen den zwei Gruppen wurden mittels Mann-Whitney Test bestimmt, das Signifikanzniveau liegt bei  $p < 0,05$ .

A



B



**Abb. 29: Fehlende FMD bei eNOS KO**

Fehlende FMD-Antwort bei eNOS KO. Während der Occlusion zeigt sich eine Kontraktion des Gefäßes auf maximal 93,78% mit einer anschließenden Annäherung an den Basalwert während der Occlusionsphase. In der Reperfusionsphase zeigt sich eine maximale Dilatation auf 101,7%. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der maximalen Dilatation zwischen WT und eNOS KO. WT: n=9; eNOS KO 12 Monate: n=7 (A). Darstellung der maximalen Dilatation bei WT und eNOS KO. (B) . median with range, Mann-Whitney Test, \*p<0,05.

### 3.3 | Echokardiographische Beurteilung der kardialen Funktion von Nrf2 KO

#### Darstellung der echokardiographischen Ergebnisse des Vergleiches zwischen WT und Nrf2 KO Mäusen

Um den Einfluss eines Fehlens des Nrf2 Transkriptionsfaktors auf die Herzfunktion zu untersuchen, werden echokardiographisch verschiedene Parameter bestimmt. Nachfolgende Ergebnisse wurden in der Arbeitsgruppe Erkens et al. ermittelt und veröffentlicht.

#### Nrf2 KO zeigen eine linksventrikuläre Hypertrophie.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT und Nrf2 KO in Bezug auf die HR. Es zeigt sich eine Tendenz hinsichtlich einer Abnahme der HR ( $p=0,056$ ).

Des Weiteren zeigt sich eine Zunahme des ESV und des EDV mit  $p<0,01$ . Der Mittelwert des ESV liegt bei Nrf2 KO bei  $54,5\pm 17,2\mu\text{l}$  und der Mittelwert des EDV bei  $90,37\pm 20,8\mu\text{l}$ .

Die LV Mass/Body weight Ratio liegt im Mittel bei  $2,7\pm 0,5$  ( $p<0,05$ ) (siehe Abbildung 30).

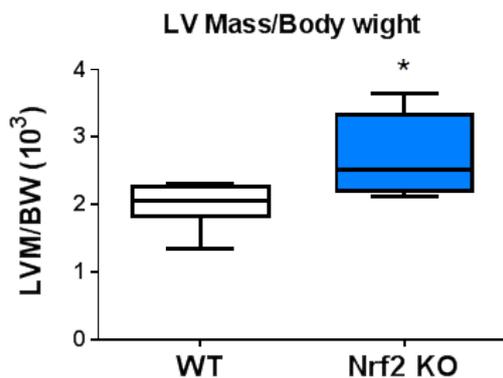


Abb. 30: Nrf2 KO zeigen eine LV Hypertrophie

Nrf2 KO zeigen eine LV Hypertrophie gemessen an dem Verhältnis der LV Mass/Body wight. WT:  $n=10$ , Nrf2 KO:  $n=12$ ,  $Mw\pm SD$ , unpaired t-test,  $*p<0,05$ .

Zur Bestimmung der Pumpfunktion des LV wurden systolische Parameter bestimmt.

#### Nrf2 KO zeigen eine erhaltene systolische Funktion.

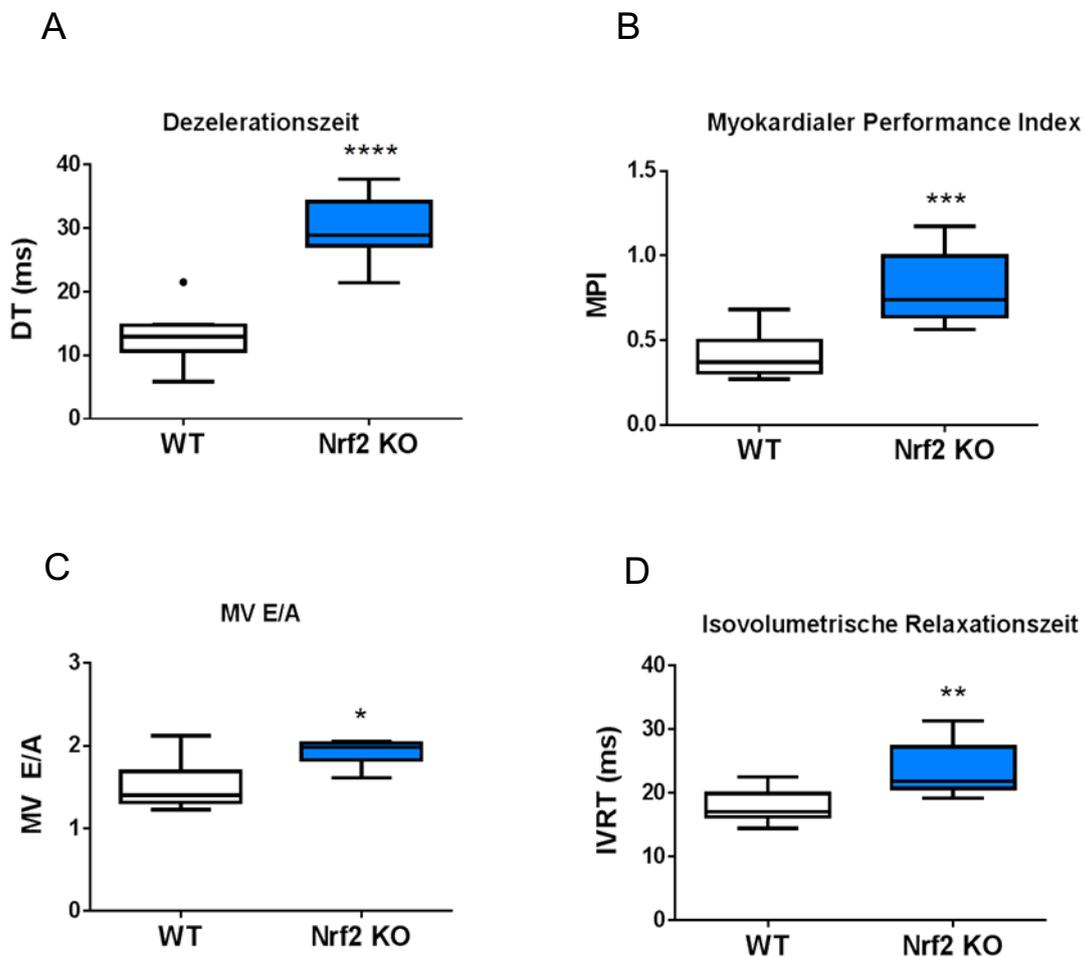
Die EF ( $41,4\pm 7,7\%$ ;  $p=0,08$ ), das FS ( $10,8\pm 4,4\%$ ) sowie das CO ( $13,0\pm 2,6\text{ml/min}$ ) zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Nrf2 KO auf, das Schlagvolumen zeigt tendenziell eine Zunahme im Vergleich zu WT,  $p=0,096$ . Der Mittelwert beläuft sich auf  $35,8\pm 6,8\mu\text{l}$ .

#### Nrf2 KO zeigen eine diastolische Dysfunktion.

Das PW-Doppler Signal der E- und A-Welle zeigt signifikante Unterschiede zwischen WT und Nrf2 KO. Es zeigt sich eine Verlängerung der DT ( $30,0\pm 4,5\text{ms}$  und  $p<0,0001$ ). Das MV E/A-Verhältnis ist signifikant erhöht ( $2,2\pm 0,6$  und  $p<0,05$ ). Die IVRT ist signifikant verlängert ( $23,6\pm 4,4\text{ms}$  und  $p<0,01$ ), ebenso zeigt sich ein erhöhter MPI ( $0,8\pm 0,2$  und  $p<0,001$ ) (siehe Abbildung 31). Die MVET liegt bei  $76,9\pm 15,5\text{ms}$  und ist signifikant verlängert ( $p<0,0001$ ). Es zeigt sich ein Unterschied zwischen den WT und den Nrf2 KO in Hinblick auf die diastolische Funktion. Eine verlängerte DT bei den Nrf2 KO deutet auf eine verringerte linksventrikuläre Relaxationsfähigkeit hin. Die verlängerte MVET und IVRT sind ebenfalls Zeichen einer vorliegenden diastolischen Dysfunktion. Eine verringerte diastolische Füllung zeigt sich durch

ein erhöhtes MV E/A ( $2,2 \pm 0,6$ ) und E/E' Verhältnis ( $30,8 \pm 6,7$  und  $p < 0,01$ ). Die reduzierte Relaxationsfähigkeit des Myokards spiegelt sich auch im MPI wieder, der ein objektives Maß der linksventrikulären Funktion darstellt.

Die IVCT ist nicht signifikant verändert ( $9,9 \pm 3,6$  ms). Ein Überblick der Daten ist in Tabelle 5 dargestellt.



**Abb. 31: Nrf2 KO zeigen eine diastolische Dysfunktion**

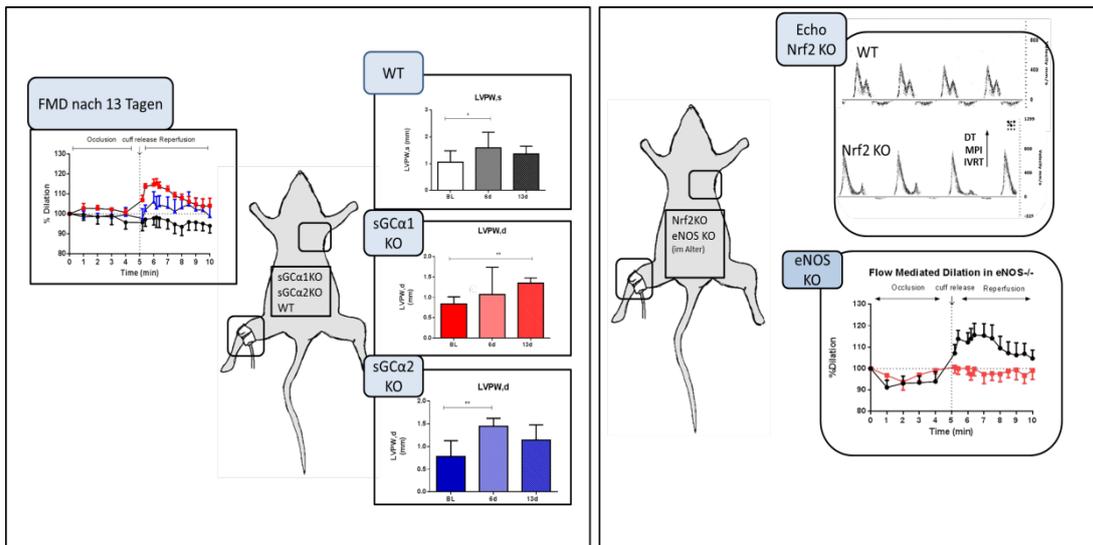
*Nrf2 KO zeigen eine verminderte Relaxation des linken Ventrikels mit Verlängerung der DT, des MV E/A Verhältnisses, der IVRT und Erhöhung des MPI im Vergleich mit WT: n=10, Nrf2 KO: n=12, Mw±SD, unpaired t-test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.*

Parameter	Einheit	WT	Nrf2 KO	Signifikanz p
Parameter der kardialen Funktion				
Heart Rate	BPM	393±21	372±23	0,056
Endsystolisches Volumen	μl	32,8±9,8	54,5±17,2	0,005
Enddiastolisches Volumen	μl	63,6±10,1	90,37±20,8	0,003
LV Mass/Body wight Ratio	mg	2,0±3,0	2,7±0,5	0,054
Ejection Fraction	%	50,1±9,3	41,4±7,7	0,08
Fractional Shortening	%	10,2±3,2	10,8±4,4	n.s.
Stroke Volume	μl	30,6±5,3	35,8±6,8	0,09
Cardiac Output	ml/min	13,1±2,7	13,0±2,6	n.s.
Parameter der diastolischen Funktion				
MV E/A		1,5±0,3	2,2±0,6	<0,05
MPI		0,4±0,1	0,8±0,2	<0,001
Dezelerationszeit	ms	13,1±4,4	30,0±4,5	<0,0001
IVCT	ms	10,2±4,1	9,9±3,6	0,89
IVRT	ms	17,8±2,6	23,6±4,4	<0,01

**Tabelle 5: Echokardiographische Parameter *in vivo* der Nrf2 KO**

*Darstellung der Daten als  $Mw \pm SD$ , unpaired t-test. Unterschiede zwischen den zwei Gruppen wurden mittels t-Test bestimmt, das Signifikanzniveau liegt bei  $p < 0,05$  (Erkens et al., 2015).*

## 4. | Diskussion



**Abb.32: Graphische Darstellung der Ergebnisse**

Darstellung der wesentlichen Ergebnisse der Echokardiographie und FMD-Messung bei sGC-KO-Mäusen unter Angiotensin II sowie bei Nrf2 KO Mäusen und eNOS KO.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Charakterisierung und Analyse des eNOS/sGC Signalweges in Bezug auf die kardiovaskuläre Funktion bei arterieller Hypertonie in unterschiedlichen Knock out Mausmodellen *in vivo* zu erheben. Insbesondere die Rolle der sGC-Isoformen stand dabei im Fokus der Untersuchungen. Hierzu wurden Parameter der Herzfunktion mittels transthorakaler Echokardiographie und Parameter der vaskuloendothelialen Funktion mittels FMD-Messung und PWV bestimmt (siehe Abbildung 32).

Die wesentlichsten Ergebnisse der Untersuchung werden nachfolgend zusammengefasst (siehe Tabelle 6):

- WT zeigen unter Einfluss von Angiotensin II eine erhaltene systolische kardiale Herzfunktion bei verminderter diastolischer Relaxation.
- WT zeigen unter Einfluss von Angiotensin II eine fehlende FMD- Antwort.
- Ein Fehlen der sGC-alpha-1-Untereinheit führt unter Einfluss von Angiotensin II zu einer LV-Hypertrophie mit erhaltener systolischer Funktion bei verminderter diastolischer Relaxation.
- Alpha1-KO zeigen unter Einfluss von Angiotensin II eine erhaltene FMD-Antwort.
- Ein Fehlen der sGC-alpha2-Untereinheit führt unter Einfluss von Angiotensin II zu einer erhaltenen systolischen Funktion mit einem Hinweis auf eine linksventrikuläre Hypertrophie.
- Alpha2-KO zeigen unter Einfluss von Angiotensin II eine erhaltene FMD-Antwort.
- eNOS-KO zeigen eine erniedrigte HR und Zeichen der LV-Hypertrophie im Vergleich zu WT.
- eNOS-KO zeigen außerdem eine fehlende FMD-Antwort.

- Nrf2 KO zeigen eine LV-Hypertrophie mit einer diastolischen Funktionsstörung bei erhaltender systolischer Funktion.

Mausstamm	Vaskuläre Funktion		Kardiale Funktion		Hauptaussage
	FMD	PWV	LVH	Diastolische Funktion	
WT+Ang II	↓	↔	↔	↓	endotheliale Dysfunktion, diastolische Dysfunktion
α1KO+AngII vs. WT+AngII	↔	↔	↑	↓	Erhalt der endothelialen Funktion, Herzinsuffizienzzeichen
α2KO+AngII vs. WT+AngII	↔	↔	↑	↔	Erhalt der endothelialen Funktion, LVH
eNOS KO vs. WT	↓	↔	↑	↔	Endotheliale Dysfunktion
Nrf2 KO vs. WT			↑	↓	LVH, diastolische Dysfunktion

**Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse**

*Darstellung der Ergebnisse im Überblick. Linksventrikuläre Hypertrophie (LVH), Verbesserung (↑), Verschlechterung (↓), keine Veränderungen (↔).*

Die in der Arbeit gewonnenen Ergebnisse werden anschließend im jeweiligen Kontext diskutiert.

## 4.1 | Einfluss von Angiotensin II auf die kardiale Funktion

Die Bedeutung von Angiotensin II im Zusammenhang mit dem kardialen und vaskulären System wird durch die Vielzahl der medikamentösen Therapien, die in die Produktion und Wirkungsweise von Angiotensin II eingreifen, verdeutlicht. Bei der Behandlung der Volkskrankheit arterielle Hypertonie kommen Inhibitoren des Angiotensin-Systems wie ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten zum Einsatz. Während Angiotensin II unter physiologischen Bedingungen unter anderem zu einer Kontraktion der Gefäße führt, ruft NO, das über die sGC/cGMP-Signalkaskade wirkt, als Gegenspieler eine Vasodilatation hervor (Yan et al., 2003).

Angiotensin II spielt darüber hinaus eine zentrale Rolle in der Entstehung von kardialem Remodeling und der damit einhergehenden kardialen Dysfunktion. Neben dieser Wirkung von Angiotensin II über den AT1-Rezeptor ist eine Vielzahl von weiteren durch Angiotensin II aktivierten Prozessen an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt. Dazu zählen sowohl die Produktion von ROS als auch die Aktivierung von Thyrosin- und Serin-/Threonin-(Rezeptor)-kinasen.

Kardiales Remodeling präsentiert sich durch Vorgänge wie Fibrose, Inflammation, Apoptose und Hypertrophie von Zellen und Gewebe.

In Studien konnte gezeigt werden, dass auch eine Veränderung der Angiotensin-II-vermittelten Genexpression Einfluss auf das kardiale Remodeling nehmen kann. Allerdings ist noch fraglich, welche molekularen Mechanismen für das kardiale Remodeling im Anfangsstadium zuständig sein könnten. Mittels Microarrays fanden Dang et al. heraus, dass eine Angiotensin-II-Infusion bei männlichen Wildtyp-Mäusen (C57BL) eine unterschiedliche Expression von 1.489 Genen im Herzen zu den Messpunkten des Tages 1, 3 und 7 bewirkt, die zur Entstehung von kardialem Remodeling beitragen. Bereits ab dem dritten Tag zeigen sich fibrotische Veränderungen sowie eine Hypertrophie der Kardiomyozyten als Zeichen des kardialen Remodelings. Es handelt sich dabei um Gene, die in verschiedenen biologischen Prozessen wie dem Metabolismus, der Oxidation und der Reduktion, der Apoptose und der Inflammation eine Rolle spielen. Des Weiteren wurden Veränderungen in 66 Signalwegen im Herzen festgestellt. Serpine1, auch bekannt als PAI1, konnte dabei als Kerngen des akuten kardialen Remodelings identifiziert werden. Die Genexpression dieses Kerngens war nach Angiotensin-II-Infusion im Herzen hochreguliert. Serpin1, das sich vor allem in glatten Muskelzellen, Adipozyten, der Plazenta und in Kardiomyozyten findet, ist ein Inhibitor des *tissue plasminogen activator* (tpA) und der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), die hauptsächlich für die Fibrinolyse zuständig sind. Somit ist eine verstärkte Fibrose am Herzen möglich und beeinflusst die kardiale Konstitution (Dang et al., 2015).

### **Einfluss von Angiotensin II auf Wildtyp-Mäuse**

#### **WT zeigen eine erhaltene systolische Funktion des LV.**

Die Behandlung mit Angiotensin II führt innerhalb der gemessenen Zeitspanne nicht zu einer Beeinträchtigung der systolischen Funktion, beurteilt an den Werten EF, FS, CO und AV-Geschwindigkeit. Die Werte, die auf eine LV-Hypertrophie hinweisen, offenbaren auch unter Einfluss von Angiotensin II keine signifikanten Unterschiede. Allerdings lässt sich eine Verbreiterung der LVPW,s beobachten. Dies deutet auf ein verstärktes Kontraktionsmuster in der Systole in Verbindung mit einer entwickelten Hypertonie hin. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Normalisierung an Tag 13 festgestellt, sodass der Einfluss von Kompensationsmechanismen diskutiert werden kann.

In der veröffentlichten Literatur finden sich jedoch auch Untersuchungen, die eine LV-Hypertrophie unter Angiotensin II beobachtet haben (Regan et al., 2015). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die nach 13 Tagen keinen eindeutigen Hinweis auf das Vorliegen einer linksventrikulären Hypertrophie finden konnte.

Eine Ursache für einen Erhalt der systolischen Parameter könnte eine zu kurze Behandlungsdauer mit Angiotensin II sein. Ein längerer Behandlungszeitraum würde demnach gegebenenfalls zu einer konzentrischen Hypertrophie bei chronischer Nachlasterrhöhung führen. Anhand der Ergebnisse kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Angiotensin II nach 13 Tagen zu einer erhaltenen systolischen Funktion führt.

#### **Angiotensin II führt zu einer Veränderung der diastolischen Funktion bei WT.**

In dieser Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine Dauerinfusion von Angiotensin II in einer höheren Dosis bei WT Veränderungen der diastolischen Funktion hervorruft. Hier kommt es während der Behandlung mit Angiotensin II zu einer Abnahme der DT. Eine Veränderung der DT weist wiederum auf eine diastolische Funktionsstörung hin.

Regan et al. untersuchten den Einfluss einer Infusion von Angiotensin II in einer niedrigen Dosis ( $0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$  im Gegensatz zu der hier verwendeten höheren Dosis von  $1,44 \text{ mg/kg}$  Körpergewicht pro Tag) auf ein Mausmodell mit Herzinsuffizienz bei erhaltener EF. Es zeigten sich eine verringerte myokardiale Relaxation und eine LV-diastolische Dysfunktion bei unverändertem arteriellem Blutdruck und systolischer Funktion mit einer Abnahme der IVRT, des MPI und des linksventrikulären enddiastolischen Drucks. Histologisch konnten eine Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie fibrotische Umbauprozesse, die auf eine Abnahme der kardialen Elastizität hinweisen, beobachtet werden (Regan et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich ebenfalls eine diastolische Dysfunktion feststellen. Jedoch zeigten sich hier keine signifikanten Veränderungen des MPI und der IVRT, sondern Veränderungen der DT. Diese Veränderungen sprechen für das Vorhandensein eines restriktiven Füllungsmusters und somit für das Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion.

#### **Einfluss von Angiotensin II auf alpha1-KO-Mäuse**

##### **Angiotensin II führt zu einer Zunahme der Herzfrequenz bei alpha1-KO-Mäusen.**

Veränderungen der Herzfunktion während der Behandlung mit Angiotensin II wurden insbesondere bei den alpha1-KO-Mäusen ersichtlich.

Es zeigte sich eine Zunahme der HR nach 13 Tagen Behandlung mit Angiotensin II. Eine Zunahme der HR kann dazu führen, dass es kompensatorisch zu Veränderungen der hier untersuchten Parameter der systolischen (CO) und diastolischen Funktion (Verkürzung der IVCT) kommt, da der LV angepasst an die erhöhte HR eine schnellere Pumpleistung vollbringen muss. Die erhöhte HR kann in diesem Fall ausschlaggebend für die Veränderung des kardialen Outputs und der IVCT sein.

##### **Angiotensin II führt zu einer LV-Hypertrophie bei alpha1-KO-Mäusen.**

Alpha1-KO zeigen eine Zunahme der LV Mass corrected sowie eine Verbreiterung der LVPW, d. Unter Angiotensin II kommt es zu einer Hypertrophie des linken Ventrikels. Angiotensin II nimmt somit Einfluss auf die Konstitution des linken Ventrikels bzw. auf die Konstitution der Kardiomyozyten.

Zusammenfassend lässt sich eine durch Angiotensin II induzierte Veränderung in der linksventrikulären Konstitution feststellen, die am ehesten auf eine linksventrikuläre Herzhypertrophie hinweist.

### **Angiotensin II führt zu einer Reduktion der diastolischen Funktion bei alpha1-KO-Mäusen.**

Neben einem unveränderten MPI und einem unveränderten MV-E/A-Verhältnis ist bei den alpha1-KO eine signifikante Abnahme der DT zu beobachten. Angiotensin II verursacht eine Zunahme der LV-Steifigkeit. Eine Verkürzung der DT spricht für eine restriktive Füllungsstörung.

In der veröffentlichten Literatur beweist eine Untersuchung an Ratten, dass Angiotensin II zu einer auf Titin basierenden Steifigkeit der Kardiomyozyten führt. Es kommt dabei zu einer Aktivierung der Phosphorylierung von Myofilamenten durch Proteinkinase  $C\alpha$  und CaMKII $\delta$ . Angiotensin II bedingt eine Transition von Titin zur Isoform N2B, die kleiner und steifer als die N2BA-Isoform ist, und erhöht dadurch die Steifigkeit der Kardiomyozyten. Dies ruft neben Veränderungen in der Konstitution der Kardiomyozyten insbesondere eine Funktionsstörung der Kontraktilität hervor und zeigt sich in einer verminderten kardialen Relaxationsfähigkeit (Kovacs et al., 2016).

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit eine Abnahme der IVCT festgestellt. Bei der Basalmessung wurde eine Verbreiterung der IVCT nach 13 Tagen verglichen mit den WT ersichtlich.

Diese Ergebnisse weisen ebenfalls auf eine diastolische Funktionsstörung des LV unter Angiotensin II hin.

### **Angiotensin II führt zu einer Zunahme des CO bei alpha1-KO-Mäusen.**

Die systolische Funktion zeigt durch den Einfluss von Angiotensin II ebenfalls Veränderungen. Die Zunahme des CO kann mit der Erhöhung der HR in Zusammenhang stehen. Die EF offenbart in diesem Fall keine signifikanten Veränderungen.

### **Einfluss von Angiotensin II auf alpha2-KO-Mäuse.**

#### **Angiotensin II führt zu einer LV-Hypertrophie bei alpha2-KO-Mäusen.**

Eine Infusion mit Angiotensin II führt bei alpha2-KO nach 6 Tagen zu einer Verbreiterung der LVPW<sub>d</sub> sowie nach 6 Tagen auch zu einer Verbreiterung der LVPW<sub>s</sub>. Bei der systolischen Herzfunktion lassen sich keine signifikanten Veränderungen während der Behandlung mit Angiotensin II feststellen.

Der Einfluss von Angiotensin II auf die Parameter bei sGC-alpha1-KO-Mäusen ist in der vorliegenden Arbeit ausgeprägter als bei sGC-alpha2-KO-Mäusen. Ein Fehlen der sGC-alpha2-Untereinheit scheint durch die erhaltene sGC-alpha1-Untereinheit kompensiert zu werden und somit protektiv gegenüber dem durch Angiotensin II entstandenen oxidativen und nitrosativen Stress zu wirken.

Dies wird durch Ergebnisse aus der Literatur unterstützt, in denen sich zeigte, dass die sGC $\alpha_1$  verstärkt im aortalen und vaskulären Gewebe vorkommt und die sGC $\alpha_2$  nur einen Anteil von 6 % in diesen Geweben hat (Mergia et al., 2006).

## 4.2 | Einfluss von Angiotensin II auf die vaskuläre Funktion

### **Angiotensin II führt zu einer fehlenden FMD-Antwort bei WT.**

Bei der FMD handelt es sich um eine nicht-invasive Methode, die eine Aussage über das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion erlaubt (Korkmaz and Onalan, 2008). Der Effekt von Angiotensin II auf die Gefäßfunktion zeigt sich auch in der zum Zeitpunkt 1 (nach 6 Tagen) und zum Zeitpunkt 2 (nach 13 Tagen) durchgeführten FMD-Messung bei WT. Eine Behandlung mit einer hohen Dosis an Angiotensin II bewirkt bereits nach 6 Tagen eine deutliche Veränderung in der Gefäßfunktion. Während unbehandelte WT bei einer FMD-Messung eine Kontraktion des Gefäßes während der Okklusionsphase und eine Dilatation des Gefäßes während der Reperfusion mit einem Maximalwert von 19,2 % zeigen, kommt es bereits nach 6 Tagen zu einer fehlenden FMD-Antwort während der Reperfusion. Im Vergleich zur FMD-Antwort bei unbehandelten WT lässt hier bei beiden Zeitpunkten eine signifikante Abnahme der Dilatationsfähigkeit des Gefäßes beobachten. Es kommt also zu einem Verlust der endothelabhängigen Dilatation. Es können keine kompensatorischen Mechanismen festgestellt werden, um die fehlende Dilatationsfähigkeit des Gefäßes wiederherzustellen.

Diese *in vivo* mittels Ultraschall dargestellten Ergebnisse stehen im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Untersuchungen. Ursachen auf molekularbiologischer Ebene sind dabei vielfältig und finden sich sowohl im Bereich des sGC-Rezeptors als auch im Bereich der NO-Bioverfügbarkeit.

So stellen Crassous et al. in einem *In-vivo*-Experiment an hypertensiven Ratten fest, dass Angiotensin II eine Reduktion der NO-abhängigen Aktivität der sGC in glatten Muskelzellen bewirkt und die vaskuläre Reaktivität durch eine verminderte NO-Ansprechbarkeit herabsetzt. Sie stellen daraufhin die Hypothese auf, dass es zu einer S-Nitrosation der sGC durch Angiotensin II kommt (Crassous et al., 2012).

An isolierten Aortenringen konnte in einem *In-vitro*-Experiment herausgefunden werden, dass Angiotensin II auf den NO/sGC-Signalweg einwirkt und zu einer Reduktion der NO-induzierten Vasodilatation führt. Die Einwirkung auf die NO/sGC-Signalkaskade sei dabei nicht auf das Endothel beschränkt, sondern zeige sich auch in glatten Muskelzellen. Als weitere Ursache kommt eine endotheliale Dysfunktion bedingt durch eine reduzierte Bioverfügbarkeit durch Superoxidproduktion in Frage sowie eine verstärkte Expression von PDEs, die in einer Reduktion von cGMP resultiert (Broekmans et al., 2015).

Insbesondere die Produktion von Superoxiden durch Angiotensin II in allen Gefäßwänden beeinflusst die Gefäßfunktion negativ im Sinne einer fehlenden Gefäßdilatation bei Scherkräften.

Angiotensin II steigert die Produktion von Superoxidanionen und erhöht die Expression von verschiedenen Untereinheiten der NADPH-Oxidase. In verschiedenen Modellen des oxidativen Stresses wie bei Diabetes mellitus oder Arteriosklerose wurde entgegen der Erwartungen eine Erhöhung der eNOS-Expression festgestellt; die vaskuläre Produktion von NO war aufgrund einer vorliegenden eNOS-Entkopplung dennoch stark reduziert (Mollnau et al., 2002).

Neben Veränderungen in der NO/sGC-Signalkaskade spielen auch Störungen auf Ebene des Sympathikus eine Rolle.

Der Neurotransmitter Norepinephrin löst ebenfalls eine Vasokonstriktion aus. Die in dieser Arbeit bei den Littermates und KO-Tieren eingesetzten Minipumpen enthalten einen Anteil an Norepinephrin in Höhe von 2,88 mg/kg KG pro Tag. Angiotensin II führt zu einer Steigerung der Aktivität des Sympathikus und so zu einer erhöhten Freisetzung von Norepinephrin. Im

Gefäßsystem balancieren diese Vasokonstriktoren Vasodilatoren wie NO, um den Muskeltonus aufrechtzuerhalten (Broekmans et al., 2015).

In dieser Arbeit konnte mittels FMD-Messung die These einer fehlenden Gefäßdilatation bei intaktem sGC-Rezeptor bei Angiotensin-II-Gabe bestätigt werden.

#### **Alpha1-KO und Alpha2- KO zeigen eine erhaltene FMD-Antwort.**

Die FMD-Messung der alpha1-KO nach einer Behandlung mit Angiotensin II nach 6 Tagen und nach 13 Tagen offenbart ein diskordantes Bild. So kommt es nach 6 Tagen vorerst zu einer Abnahme der FMD-Antwort auf ein Maximum von 107,6%. Nach 13 Tagen zeigt sich eine verbesserte FMD-Antwort, die mit den basal gemessenen Werten vergleichbar ist. Eine 13-tägige Behandlung mit Angiotensin II, das kontinuierlich über eine subkutan eingesetzte Minipumpe in den Organismus abgegeben wird, bewirkt verglichen mit der Basalmessung, keine signifikante Veränderung des Gefäßverhaltens. Es lässt sich eine erhaltene Dilatationsfähigkeit mit dem Potenzial einer Regeneration nach 6 Tagen Behandlung mit Angiotensin II beobachten. Eine fehlende FMD-Antwort, wie dies bei der Kontrollgruppe zu sehen ist, ist nicht feststellbar. Ganz im Gegenteil zeigt sich eine verbesserte Dilatationsfähigkeit in Bezug auf die Kontrollgruppe.

Angiotensin II wirkt über verschiedene Wege auf die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase ein. So beeinflussen sich NO und Angiotensin II gegenseitig. NO ruft eine Inhibition der AT1-Rezeptor-Antwort hervor, während Angiotensin II Einfluss auf die Expression der NO-Synthase und die NO-Produktion nimmt (Yan et al., 2003). Auch ein Einfluss von Angiotensin II auf die Produktion von Superoxidanionen konnte festgestellt werden. Da die Effekte der Vasodilatation über NO durch den sGC-Rezeptor transferiert werden, stellt sich die Frage, welchen Einfluss Angiotensin II auf diese Kaskade bzw. die Expression des sGC-Rezeptors haben könnte (Evgenov et al., 2006). Broekmans et al. fanden in einer Untersuchung heraus, dass alpha1-KO eine Reduktion der cGMP-Bildung sowie eine reduzierte Aktivität des Sympathikus vorweisen (Broekmans et al., 2015).

Broekmans et al. zeigten an isolierten Aortenringen von alpha1-KO, dass eine Behandlung mit Angiotensin II in einer Reduktion der endothelabhängigen Vasodilatation resultiert. Dabei ähnelt der Effekt der alpha1-KO dem Effekt der WT.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt mittels FMD-Messung nicht beobachtet werden. Es zeigt sich zwar eine Reduktion der Dilatationsfähigkeit bei den alpha1-KO; die FMD-Antwort bei WT fehlt indes vollständig.

Bei der FMD-Messung handelt es sich im Gegensatz zu Versuchen an isolierten Aortenringen um eine *In-vivo*-Methode. Das Zusammenspiel verschiedener physiologischer Prozesse lässt sich in *In-vivo*-Versuchen deutlich besser eruieren; gleichzeitig lässt sich ein Effekt häufig nicht nur einem speziellen Signalweg zuordnen (Schuler et al., 2014). Für die Vasodilatation spielt in erster Linie der NO/cGMP-Weg über die eNOS und die sGC die entscheidende Rolle. Die sGC-alpha1-Untereinheit überwiegt im Vergleich zur sGC-alpha2-Untereinheit im vaskulären Gewebe und stellt einen bedeutsamen Rezeptor in dieser Signalkaskade dar (Russwurm et al., 2001). Daher wäre ein Fehlen der FMD-Antwort im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen gewesen. Da jedoch auch weitere vaskuloendotheliale Faktoren die Vasodilatation beeinflussen, kann auch über die pGC eine vermehrte Produktion von cGMP stattgefunden haben (Tremblay et al., 2002). Mollnau et al. zeigten, dass eine Infusion mit Angiotensin II bei Ratten zu einer Zunahme der Superoxidanionen, eNOS-Entkopplung und allgemein zu einer endothelialen Dysfunktion führt.

Neben endothelialen Faktoren spielen auch Faktoren der glatten Muskulatur eine zentrale Rolle in der komplexen Wirkungsweise von Angiotensin II.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf eine Kompensation der Gefäßfunktion nach 13 Tagen Behandlung mit Angiotensin II bei sGC-alpha1-KO schließen. In diesem Fall würde ein Fehlen der sGC $\alpha_1$ -Untereinheit protektiv gegenüber Angiotensin II und ROS wirken.

sGC-alpha2-KO zeigen im Vergleich mit sGC-alpha1-KO eine verbesserte FMD-Antwort zum Zeitpunkt 2.

Im Gegensatz zur sGC $\alpha_1$ -Untereinheit findet sich die sGC $\alpha_2$ -Untereinheit vorwiegend im fetalen Gewebe und bei der Beteiligung an der synaptischen Transmission im Gehirn (Wang et al., 2012). Im aortalen Gewebe besitzt sie einen Anteil von etwa 6 % und kann bei entsprechend erhöhtem NO-Angebot ebenfalls zu einer Vasodilatation führen (Mergia et al., 2006).

Bei der FMD-Messung zeigen sich keine signifikanten Veränderungen im Hinblick auf die maximale Dilatation während der Reperfusionphase sowie der maximalen Kontraktion während der Okklusionsphase im Gegensatz zu alpha1-KO. Vergleicht man die alpha2-KO mit den WT, so wird eine verbesserte maximale Dilatation bei den alpha2-KO nach 6 Tagen deutlich. Auch die maximale Kontraktion weist einen höheren Wert nach 6 Tagen bei den alpha2-KO verglichen mit den WT auf. Die Kontraktion während der Okklusionsphase scheint bei den alpha2-KO weniger stark ausgeprägt zu sein.

Die fehlende FMD-Antwort der WT unter Angiotensin II spiegelt sich bei den alpha2-KO nicht wider. Auch hier findet weiterhin eine Vasodilatation statt. Das Vorhandensein von sGC $\alpha_1$  scheint weiterhin eine intakte Endothelfunktion zu ermöglichen. Es stellt sich die Frage, ob es weitere Kompensationsmechanismen gibt, die die erwartete Produktion von Superoxidanionen sowie die die eNOS-Entkopplung verursachenden Mechanismen regulieren. Weitere biochemische Analysen mittels isolierten Aortenringen oder Gefäßringen im Allgemeinen sollten erfolgen.

### 4.3 | Einfluss von Angiotensin II auf die PWV

Unter Angiotensin II kommt es zu einem Erhalt der Elastizität der *A. carotis communis*. Zur Bestimmung der arteriellen Steifigkeit der peripheren und zentralen Arterien wird die Messung der PWV verwendet (Fu et al., 2016). Eine Veränderung der arteriellen Steifigkeit ist durch einen Elastizitätsverlust der Lamina elastica und eine zunehmende Verbreiterung der Tunica media bedingt. Solche Veränderungen finden sich bei Arteriosklerose oder im Rahmen natürlicher Alterungsprozesse. Zoungas et al. konnten herausfinden, dass die Bestimmung der PWV einen unabhängigen Faktor zur Voraussage von tödlichen und nicht tödlichen kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten darstellt (Zoungas and Asmar, 2007). Der Tonus der glatten Muskulatur, der durch NO und Angiotensin II reguliert wird, spielt eine bedeutende Rolle in der Entstehung arterieller Steifigkeit (Bhatta et al., 2015).

Die in dieser Arbeit untersuchten WT zeigen keine Veränderungen in der PWV. Die Gefäßfunktion in der *A. carotis communis* ist erhalten. Eine Zunahme der vaskulären Steifigkeit durch den Einfluss von Angiotensin II konnte innerhalb des 13-tägigen Behandlungszeitraums mittels Bestimmung der PWV nicht beobachtet werden – ganz im Gegensatz zur fehlenden FMD-Antwort in der *A. iliaca externa*. Bhatta et al. konnten eine Zunahme der PWV bei WT nachweisen. Die Messungen fanden hier jedoch erst nach einem Zeitraum von 28 Tagen statt und nicht wie im vorliegenden Versuch bereits nach 6 und 13 Tagen (Bhatta et al., 2015).

Auch die alpha1-KO zeigen unter Einfluss von Angiotensin II keinen signifikanten Effekt auf die PWV. Welchen Langzeiteffekt Angiotensin II nach einer Behandlungsdauer von 28 Tagen auf die PWV nehmen könnte, bleibt zu eruieren. Dahingehend sollte eine Bestimmung der PWV nach 28 Tagen erfolgen.

#### **4.4 | Untersuchung der kardialen und vaskulären Funktion in eNOS-KO-Mäusen**

Der Einfluss von NO auf die kardiale Funktion zeichnet sich durch vaskulär-abhängige und -unabhängige Effekte aus. Neben der Regulierung des Tonus der Koronargefäße, der Thrombogenität und der Unterstützung der Angiogenese zeigen sich die vaskulär-unabhängigen Effekte in der Kontraktilität der Kardiomyozyten. Hier geht es insbesondere um die Feinregulierung der Kopplung von Kontraktion und Erregung sowie das Zusammenspiel der prä- und postsynaptischen Signalwege des autonomen Nervensystems (Massion et al., 2003).

##### **eNOS-KO zeigen eine Abnahme der HR.**

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass 12 Monate alte eNOS-KO-Mäuse im Vergleich zu WT eine erniedrigte HR zeigen. Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Differenzen bezüglich der HR zwischen WT und eNOS-KO-Mäusen überein. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls von Gödecke et al. mittels EKG-Aufzeichnungen dargestellt werden (Godecke et al., 1998). Die Ursachen für diesen Befund sind unklar, können möglicherweise jedoch auf eine reflektorische Veränderung auf Grund einer Blutdruckerhöhung oder auf eine Veränderung der Chronotropie des Herzens zurückgeführt werden. Die eNOS ist gleichwohl nicht der einzige Faktor, der *in vivo* auf die Chronotropie des Herzens einen Einfluss nehmen kann. Neben der eNOS zeigen auch die nNOS und der Parasympathikus eine Wirkung auf die HR. Die Chronotropie des Herzens wird ebenfalls NOS-abhängig moduliert, und zwar durch eine Verstärkung des Parasympathikus über den *Nervus vagus*, präsynaptisch über nNOS und postsynaptisch über eNOS in kardialen Zellen (Balligand et al., 2009). Die Beeinflussung der HR über das autonome Nervensystem kann sowohl prä- als auch postsynaptisch moduliert werden. Eine Verstärkung des NO-cGMP-Signalweges vermindert die HR-Antwort auf die sympathische Aktivierung und führt gleichzeitig zu einer vagal-induzierten Bradykardie. Dahingegen ruft eine Hemmung der nNOS eine Zunahme der HR-Antwort auf eine Sympathikusstimulation hervor und vermindert die HR-Antwort bezogen auf eine Stimulation des *Nervus vagus* (Paterson, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Abnahme der Chronotropie des Herzens bei eNOS-KO beobachtet werden.

##### **eNOS-KO zeigen eine erhaltene diastolische Funktion und eine Zunahme des IVS,d.**

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich eine erhaltene diastolische Funktion bei 12 Monate alten eNOS-KO-Mäusen sowie eine Zunahme der IVS,d als Indikator einer vorliegenden Hypertrophie der Herzmuskulatur. Es finden sich jedoch keine signifikanten Veränderungen in der LV-Mass sowie weiteren Indikatoren für das Vorliegen einer LV-Hypertrophie. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Studie, die nachweisen konnte, dass ein konzentrisches Remodeling auch ohne eine Veränderung der LV-Mass einhergehen kann (Verdecchia et al., 1995). Andere Studien beschreiben jedoch ein von den vorliegenden Ergebnissen abweichendes kardiales Verhalten bei eNOS-KO-Mäusen. So berichten Takimoto et al., dass es bedingt durch eine eNOS-Entkopplung zur Produktion von myokardialen ROS kommt. Dies ist assoziiert mit der Entwicklung kardialer Dilatation, Strukturremodeling, Hypertrophie sowie molekularen und funktionellen Veränderungen (Takimoto et al., 2005).

Ebenfalls stellten Barouch et al. Veränderungen der kardialen Struktur durch eNOS- und nNOS-KO-Mäuse fest. Hier kommt es bei nNOS-KO altersabhängig (14–20 Monate) zu einer Zunahme der LV-Mass und LV-Wanddicke und auch die eNOS-KO ließen ähnliche Ergebnisse erkennen. Ein KO-Typ, dem sowohl die nNOS als auch die eNOS fehlt, zeigt ein konzentrisches

Remodeling mit Hyperkontraktilität und eine Zunahme der diastolischen Steifigkeit. Am ehesten weist dieser Phänotyp eine hypertensive hypertrophe Kardiomyopathie auf. Es kommt hierbei zu einem Phänotyp mit strukturellen Veränderungen, die jedoch alleinig mit dem Fehlen der nNOS oder der eNOS nicht zu erklären wären (Barouch et al., 2003)

In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhaltene diastolische Funktion bei 12 Monate alten eNOS-KO-Mäusen ohne das Vorliegen einer ausgeprägten LV-Hypertrophie beobachtet. Eine anatomische Begutachtung der Kardiomyozyten sollte erfolgen, um einen detaillierten Grad der Hypertrophie in Altersabhängigkeit von eNOS-KO-Mäusen zu untersuchen.

#### **eNOS-KO zeigen eine fehlende FMD-Antwort.**

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Fehlen der FMD-Antwort bei 12 Monate alten eNOS-KO-Mäusen festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen überein (Schuler et al., 2014). Daraus lässt sich schließen, dass das Vorliegen der eNOS und die erhöhte Freisetzung von NO bei vermehrten Scherkräften im Gefäß essentiell für die Vasodilatation des Gefäßes sind und ein Mangel der eNOS auch bei 12 Monaten alten KO-Mäusen nicht kompensiert wurde.

#### **eNOS-KO zeigen keine Zunahme der PWV.**

In dieser Arbeit konnte keine Zunahme der PWV bei 12 Monate alten eNOS-KO im Vergleich zu WT festgestellt werden ( $p=0.061$ ). In der Literatur wird jedoch eine signifikante Veränderung der PWV beschrieben. Soucy et al. untersuchten den Einfluss von reduziertem NO auf die Gefäßsteifigkeit der Aorta. In eNOS-KO stellten sie dabei eine altersabhängige Zunahme der Gefäßsteifigkeit fest.

Dieser Befund lässt darauf schließen, dass das Vorhandensein der eNOS einen positiven Einfluss auf die Gefäßsteifigkeit hat und am ehesten protektiv und positiv auf die arterielle Compliance wirkt. Ein Fehlen der eNOS führt altersabhängig zu einer Zunahme der Gefäßsteifigkeit. Eine Zunahme der Gefäßsteifigkeit im Alter ist assoziiert mit einer erniedrigten NO-Bioverfügbarkeit und scheint eine direkte Konsequenz aus einer verminderten eNOS-Aktivierung zu sein (Soucy et al., 2006).

## 4.5 | Untersuchung der kardialen Funktion in Nrf2 KO Mäusen

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 stellt ein bedeutsames Glied in der Regulierung von antioxidativen Prozessen sowohl im Herzen als auch in den Gefäßen dar. *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien konnten belegen, dass eine pharmakologische Aktivierung von Nrf2 protektiv auf Kardiomyozyten wirkt und eine Abwehrfunktion gegenüber oxidativem und hämodynamischem Stress hervorruft. Die Arbeitsgruppe Erkens et al. konnte diesen Effekt von Nrf2 nachweisen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sind Teil dieser Studie. Nrf2 KO stellen ein geeignetes Modell für die Anpassung an oxidativen Stress dar (Erkens et al., 2015).

### **Nrf2 KO zeigen eine diastolische Funktionsstörung.**

Während Nrf2 KO unter basalen Bedingungen eine erhaltene systolische Funktion gemessen an den echokardiographisch ermittelten Parametern CO, SV und EF zeigen, lässt sich durch einen erhöhten MPI auf eine diastolische Funktionsstörung schließen. Des Weiteren konnten eine verlängerte DT und eine Zunahme der IVRT beobachtet werden. Auch diese Parameter unterstreichen das Vorliegen einer diastolischen Funktionsstörung. Veränderungen in der IVRT lassen insbesondere auf eine verminderte kardiale Relaxationsfähigkeit schließen (Garcia et al., 1996). Dabei handelt es sich um einen Parameter, der auf zellulärer Ebene die Rückstellung der Querbrücken zwischen Aktin- und Myosinfilamenten abbildet und somit die diastolische Füllung des LV initiiert (Giannuzzi et al., 1994). Erkens et al. konnten zeigen, dass eine Calcium-Dyshomöostase in Nrf2 KO-Hezen vorliegt. Eine verminderte Expression von SERCA2a in Kardiomyozyten verursacht einen ineffizienten Calcium-Transport in das sarkoplasmatische Retikulum und löst folglich eine verminderte Relaxation des LV während der Diastole aus. Die diastolische Dysfunktion lässt sich grundsätzlich in verschiedene Formen unterteilen; in der vorliegenden Arbeit kann indes nicht zwischen einer restriktiven und einer pseudonormalen diastolischen Dysfunktion differenziert werden (Erkens et al., 2015). Weiterhin konnte in der Arbeit von Erkens et al. eine kompensatorisch vermehrte Expression der eNOS gezeigt und eine verbesserte endotheliale Funktion dokumentiert werden. Dies zeigt sich in einer verbesserten FMD-Antwort. Eine durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors Nrf2 erwartete Abnahme der FMD-Antwort, verursacht durch eine verstärkte Produktion von ROS und eine damit einhergehende endotheliale Dysfunktion oder erhöhte Gefäßsteifigkeit, zeigt sich also nicht. Welche weiteren kompensatorischen Effekte bei einem Fehlen von Nrf2 zur Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion beitragen, muss noch detaillierter untersucht werden. Einen entscheidenden Anteil an der Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion scheint jedoch der eNOS/sGC $\alpha_1$ -Signalweg zu leisten.

## 4.6 | Stellenwert der Echokardiographie und der FMD-Messung

Die Anwendung der FMD-Messung der *Arteria brachialis* bei Patienten im klinischen Alltag ermöglicht neben der Beurteilung des Schweregrades einer vorliegenden Arteriosklerose auch die Beurteilung der koronaren endothelialen Funktion. So wird eine nicht-invasive Beurteilung des Gefäßstatus ermöglicht, deren Aussagekraft mit einer invasiven Messung vergleichbar ist (Gori et al., 2012).

Welchen Beitrag die Ergebnisse aus echokardiographischen und *In-vivo*-Messungen der FMD zur Erforschung unbekannter Signalwege bzw. kardialen und vaskulären Erkrankungen leisten können, wurde bereits in einer Vielzahl experimenteller Studien deutlich. Unter anderem konnte hierdurch der Einfluss des Transkriptionsfaktors Nrf2 auf die kardiale und vaskuläre Funktion dargestellt werden (Erkens et al., 2015).

Im Gegensatz zu *In-vitro*-Studien besteht bei *In-vivo*-Studien die Möglichkeit, den Organismus in seiner aktuellen und aktiven Funktion unter Erhalt physiologischer Prozessabläufe zu beurteilen. Die in dieser Arbeit genutzten Methoden der Echokardiographie und FMD-Messung finden auch im Klinikalltag am Patienten ihren Einsatz (Mirea et al., 2016, Busch et al., 1978, Pollick, 1978).

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse offenbaren, dass eine Detektion kardialer und vaskulärer Verschiebungen mittels Echokardiographie und FMD-Messung sowohl bei WT als auch bei den untersuchten KO-Tieren möglich ist. Des Weiteren eignet sich die Methode, um Hinweise auf den Einfluss von Angiotensin II auf die Herzfunktion sowie die Gefäßfunktion zu erhalten. Im weiteren Sinne kann so auf Veränderungen und Adaptationsprozesse von Endothelzellen und glatten Muskelzellen anhand eines *In-vivo* Modells geschlossen werden.

## 4.7 | Methodenkritik

Die Durchführung der FMD an Mäusen stellt eine Möglichkeit zur *In-vivo*-Erforschung von endothelial stattfindenden Prozessen dar.

Die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung an der anästhesierten Maus können jedoch von vielen Faktoren beeinflusst werden. Neben Temperaturverhältnissen im Untersuchungsraum und der Körpertemperatur der Maus, die durch eine Heizplatte aufrechterhalten wird und mitunter dem Einfluss der Narkose unterliegt, spielt auch die Erfahrung des Untersuchenden im Hinblick auf die Sonographie und die anschließende Auswertung eine große Rolle (Schuler et al., 2014, Erkens et al., 2015). Des Weiteren muss an die generelle Übertragbarkeit von murinen physiologischen Prozessen auf humane physiologische Abläufe geachtet werden. Obwohl Mäuse in den meisten Fällen die menschliche Biologie widerspiegeln, gibt es dennoch Unterschiede bezüglich der Entwicklung, Aktivierung und Anpassung des Immunsystems (Mestas and Hughes, 2004). Des Weiteren finden sich deutliche Unterschiede bezüglich der Genregulation bei beiden Spezies, während die Kontrolle der Genaktivierung einem ähnlichen System unterliegt (Yue et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnten durch Genveränderungen neue Mausmodelle erstellt werden, die aus ethischer Sicht in einem humanen Modell nicht umsetzbar wären.

### Methodenkritik der FMD-Messung

Zu Beginn der Untersuchung muss eine klare Abgrenzung zwischen der *Arteria iliaca externa* und *Vena iliaca externa* erfolgen. Nur so lässt sich eine Aussage über die durch Scherkräfte bedingte Vasodilatation der Arterie treffen. Dies gelingt mittels einer ultraschallgesteuerten Venenfahrt und einem charakteristischen pulsatilen PW-Doppler-Signal der Arterie. Auf die mittels Cuff am Hinterbein der Maus provozierte kurzzeitige Ischämie folgt ein vermehrter arterieller Blutfluss. Die durch die reaktive Hyperämie ausgelösten Scherkräfte rufen an intakten Blutgefäßen eine Dilatation des Gefäßes hervor, die vor allem durch eine NO-abhängige Vasodilatation bedingt ist (Erkens et al., 2015). So zeigt sich bei eNOS-KO-Mäusen ein Fehlen der FMD-Antwort in der Reperfusionphase.

Während die Vorgänge in der Reperfusionphase nach Cuff-Öffnung weitestgehend erforscht sind, liegen nur wenige Informationen zum Ablauf während der Okklusionsphase des Gefäßes vor. In dieser Phase kommt es bei Gefäßen mit intaktem Endothel zu einem reduzierten Blutfluss und zu einer Vasokonstriktion im humanen Modell (Gori et al., 2011). Gori et al. bezeichnen diese Vasokonstriktion als *low-flow-mediated vasoconstriction* (L-FMC) (Gori et al., 2012). Ein Vorkommen der L-FMC im murinen Modell konnte erstmals durch die Arbeitsgruppe Erkens et al. visualisiert werden (Erkens et al., 2015). Als mögliche Mediatoren sind eine Vielzahl von endothelialen Faktoren denkbar. So kommt es zu einer Freisetzung von Endothelin-1 sowie einer Hemmung der Freisetzung von Cyclooxygenase-abhängigen Produkten und des *endothelium-derived hyperpolarizing factors* (EDHF). Insgesamt handelt es sich um deutlich komplexere Vorgänge verglichen mit den Abläufen der FMD. Eine Messung der L-FMC ermöglicht eine Beurteilung des vaskulären Tonus und in Kombination mit der FMD-Messung eine Aussage über die Gefäßfunktion. Bei vorliegenden Risikofaktoren zeigen sich eine Abnahme der FMD und eine reduzierte L-FMC-Antwort (Gori et al., 2011).

Bei den hier untersuchten WT wurde während der Okklusion eine Vasokonstriktion beobachtet, gefolgt von einer Vasodilatation während der Reperfusionphase. Auch bei 12 Monate alten

eNOS-KO findet sich eine Vasokonstriktion während der Okklusion, allerdings mit einer fehlenden anschließenden FMD-Antwort. Bei fehlender NO-Synthese und daher fehlender NO-abhängiger Vasodilatation wird während der Occlusionsphase ein mit den WT vergleichbares Verhalten erkennbar. Welche Faktoren neben den oben genannten dahingehend eine Rolle spielen könnten, ist Gegenstand aktueller Forschungen.

Die Gruppe der alpha1-KO lässt im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Abschwächung der FMD erkennen. Nimmegeers et al. bewiesen in biochemischen Untersuchungen an alpha1-KO-Mäusen, dass NO hauptsächlich durch die Aktivierung von  $sGC\alpha_1\beta_1$  eine Vasodilatation bewirkt und dass der Einfluss von sGC bei alpha1-KO-Mäusen auf Blutgefäße reduziert ist. Die verbliebene Fähigkeit zur Vasodilatation wird vermutlich über die  $sGC\alpha_2\beta_1$ -Isoform sowie durch die Aktivierung sGC-unabhängiger Mechanismen ermöglicht (Nimmegeers et al., 2007). Auch bei der in dieser Arbeit angewandten nicht-invasiven Methodik der FMD-Messung wurde eine verminderte Vasodilatation bei den alpha1-KO im Vergleich mit WT gefunden.

Die alpha2-KO weisen eine zur Kontrollgruppe nicht signifikante maximale Vasokonstriktion während der Okklusionsphase und eine maximale zur Kontrollgruppe nicht signifikante Dilatation während der Reperfusionphase auf. Die Anwesenheit der Isoform  $sGC\alpha_1\beta_1$  scheint in diesem Fall eine zur Kontrollgruppe ähnliche Vasodilatation zu ermöglichen. Des Weiteren nähert sich auch die L-FMC dem Wert der Kontrollgruppe an. Die Abwesenheit der Isoform  $sGC\alpha_1\beta_1$  – nicht aber die der  $sGC\alpha_2\beta_1$ -Isoform – scheint folglich zu einer Abschwächung der L-FMC und zu einer Abnahme der FMD zu führen.

Für eine Sicherung der Daten sowie zur Beurteilung der zeitabhängigen Veränderungen der Parameter der FMD-Messung der sGC-alpha1- und sGC-alpha2-KO sollten weitere Untersuchungen mit einer erhöhten Fallzahl durchgeführt werden.

## 4.8 | Ausblick

In der vorliegenden Arbeit war es möglich, die kardiale und vaskuloendotheliale Funktion in Knockout-Mäusen durch eine echokardiographische sowie eine FMD-Messung in einem *In-vivo*-Experiment zu beurteilen. Angiotensin II kann als Induktor von arterielle Hypertonie/ oxidativem Stress zu einer Schädigung des Endothels bei WT führen, während ein Fehlen der sGCalpha1-Untereinheit einen protektiven Effekt auf die vaskuläre Funktion unter Angiotensin-II-Gabe hat. Ebenso bewirkt das Vorhandensein der sGCalpha1-Untereinheit einen kardialen Funktionserhalt unter Angiotensin-II-Gabe. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen des Transkriptionsfaktors Nrf2 und eine dadurch bedingte Zunahme des oxidativen Stresses in einer deutlich eingeschränkten diastolischen Funktion des Herzens resultieren kann.

Oxidativer wie auch nitrosativer Stress nehmen entscheidenden Einfluss auf den Ablauf von Signalkaskaden. Dabei ist die Entwicklung von Kompensationsmechanismen für einen reibungslosen Ablauf innerhalb der Signalkaskaden entscheidend. Welche Signalmoleküle in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen und welche Kompensationsmechanismen im Rahmen des oxidativen Stresses entstehen, ist Gegenstand aktueller Forschung, mit dem Ziel, neue Angriffspunkte pharmakologischer Therapien zu eruieren sowie neue Modelle zur Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen zu etablieren.

In der vorliegenden Arbeit erweist sich das Modell der Nrf2 KO als besonders geeignet für die Untersuchung von Mechanismen, die zur diastolischen Dysfunktion beitragen, während eNOS-KO-Mäuse ein entsprechendes Modell zur Untersuchung der endothelialen Dysfunktion liefern. sGCalpha1-KO-Mäuse stellen ein Modell zur Untersuchung kardialer Erkrankungen unter dem Einfluss von arterieller Hypertonie und oxidativem/nitrosativem Stress dar und geben zusätzlich Raum zur Diskussion über die protektive vaskuläre Wirkung unter Angiotensin-II-Gabe. Es zeigt sich daher eine bisher vernachlässigte Relevanz der sGCalpha2-Untereinheit in Bezug auf die kardiale und vaskuläre Funktion unter Angiotensin-II-Gabe. Auch sGCalpha2-KO-Mäuse finden ihre Wertigkeit in Bezug auf die Erforschung kardialer LV-Hypertrophie und diastolischer Dysfunktion unter Langzeitgabe von Angiotensin II.

## 5. | Literaturverzeichnis

- AXELSSON, K. L., WIKBERG, J. E. & ANDERSSON, R. G. **1979**. Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sci*, 24, 1779-86.
- BALLIGAND, J. L., FERON, O. & DESSY, C. **2009**. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*, 89, 481-534.
- BALLINGER, S. W., PATTERSON, C., KNIGHT-LOZANO, C. A., BUROW, D. L., CONKLIN, C. A., HU, Z., REUF, J., HORAIST, C., LEOVITZ, R., HUNTER, G. C., MCINTYRE, K. & RUNGE, M. S. **2002**. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*, 106, 544-9.
- BAROUCH, L. A., CAPPOLA, T. P., HARRISON, R. W., CRONE, J. K., RODRIGUEZ, E. R., BURNETT, A. L. & HARE, J. M. **2003**. Combined loss of neuronal and endothelial nitric oxide synthase causes premature mortality and age-related hypertrophic cardiac remodeling in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 637-44.
- BHATTA, A., YAO, L., TOQUE, H. A., SHATANAWI, A., XU, Z., CALDWELL, R. B. & CALDWELL, R. W. **2015**. Angiotensin II-induced arterial thickening, fibrosis and stiffening involves elevated arginase function. *PLoS One*, 10, e0121727.
- BRETT, D. S. & SNYDER, S. H. **1990**. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 682-5.
- BRETT, D. S. & SNYDER, S. H. **1994**. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, 63, 175-95.
- BROEKMANS, K., STEGBAUER, J., POTTHOFF, S. A., RUSSWURM, M., KOESLING, D. & MERGIA, E. **2015**. Angiotensin II-induced hypertension is attenuated by reduction of sympathetic output in NO-sensitive guanylyl cyclase1 knock-out mice. *J Pharmacol Exp Ther*.
- BUSCH, U., PECHACEK, L. W., GARCIA, E., SANDIFORD, F. M. & HALL, R. J. **1978**. IDENTIFICATION OF LARGE LEFT ATRIAL THROMBUS BY CROSS-SECTIONAL AND M-MODE ECHOCARDIOGRAPHY. *Cardiovasc Dis*, 5, 64-68.
- CAMPBELL, J. C., KIM, J. J., LI, K. Y., HUANG, G. Y., REGER, A. S., MATSUDA, S., SANKARAN, B., LINK, T. M., YUASA, K., LADBURY, J. E., CASTEEL, D. E. & KIM, C. **2016**. Structural Basis of Cyclic Nucleotide Selectivity in cGMP-dependent Protein Kinase II. *J Biol Chem*, 291, 5623-33.
- CELERMAJER, D. S., SORENSEN, K. E., GOOCH, V. M., SPIEGELHALTER, D. J., MILLER, O. I., SULLIVAN, I. D., LLOYD, J. K. & DEANFIELD, J. E. **1992**. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 340, 1111-5.
- CERISANO, G., BOLOGNESE, L., CARRABBA, N., BUONAMICI, P., SANTORO, G. M., ANTONIUCCI, D., SANTINI, A., MOSCHI, G. & FAZZINI, P. F. **1999**. Doppler-derived mitral deceleration time: an early strong predictor of left ventricular remodeling after reperfused anterior acute myocardial infarction. *Circulation*, 99, 230-6.
- CHEN, W., XIAO, H., RIZZO, A. N., ZHANG, W., MAI, Y. & YE, M. **2014**. Endothelial nitric oxide synthase dimerization is regulated by heat shock protein 90 rather than by phosphorylation. *PLoS One*, 9, e105479.
- CRASSOUS, P. A., COULOUBALY, S., HUANG, C., ZHOU, Z., BASKARAN, P., KIM, D. D., PAPAPETROPOULOS, A., FIORAMONTI, X., DURAN, W. N. & BEUVE, A. **2012**. Soluble guanylyl cyclase is a target of angiotensin II-induced nitrosative stress in a hypertensive rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303, H597-604.
- DANG, M. Q., ZHAO, X. C., LAI, S., WANG, X., WANG, L., ZHANG, Y. L., LIU, Y., YU, X. H., LIU, Y., LI, H. H. & XIA, Y. L. **2015**. Gene expression profile in the early stage of angiotensin II-induced cardiac remodeling: a time series microarray study in a mouse model. *Cell Physiol Biochem*, 35, 467-76.

- DERBYSHIRE, E. R. & MARLETTA, M. A. **2012**. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem*, 81, 533-59.
- DERENTOWICZ, P., MARKIEWICZ, K., WAWRZYNIAK, M., CZERWINSKA-KARTOWICZ, I., BULAWA, E. & SIWINSKA-GOLEBIEWSKA, H. **2000**. [Nitric oxide (NO)--Nobel prize in medicine and physiology for 1998]. *Med Wieku Rozwoj*, 4, 209-17.
- ENOMOTO, A., ITOH, K., NAGAYOSHI, E., HARUTA, J., KIMURA, T., O'CONNOR, T., HARADA, T. & YAMAMOTO, M. **2001**. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci*, 59, 169-77.
- ERKENS, R., KRAMER, C. M., LUCKSTADT, W., PANKNIN, C., KRAUSE, L., WEIDENBACH, M., DIRZKA, J., KRENZ, T., MERGIA, E., SUVORAVA, T., KELM, M. & CORTESE-KROTT, M. M. **2015**. Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function. *Free Radic Biol Med*, 89, 906-917.
- EVGENOV, O. V., PACHER, P., SCHMIDT, P. M., HASKO, G., SCHMIDT, H. H. & STASCH, J. P. **2006**. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 755-68.
- FLEMING, I. **2010**. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch*, 459, 793-806.
- FLEMING, I. & BUSSE, R. **2003**. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, R1-12.
- FONTAINE, D. A. & DAVIS, D. B. **2016**. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes*, 65, 25-33.
- FORSTERMANN, U. **2008**. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 5, 338-49.
- FORSTERMANN, U., CLOSS, E. I., POLLOCK, J. S., NAKANE, M., SCHWARZ, P., GATH, I. & KLEINERT, H. **1994**. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23, 1121-31.
- FORSTERMANN, U., SCHMIDT, H. H., POLLOCK, J. S., SHENG, H., MITCHELL, J. A., WARNER, T. D., NAKANE, M. & MURAD, F. **1991**. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*, 42, 1849-57.
- FORSTERMANN, U. & SESSA, W. C. **2012**. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33, 829-37, 837a-837d.
- FRANCIS, S. H., BUSCH, J. L., CORBIN, J. D. & SIBLEY, D. **2010**. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev*, 62, 525-63.
- FRANSEN, P., VAN HOVE, C. E., LELOUP, A. J., SCHRIJVERS, D. M., DE MEYER, G. R. & DE KEULENAER, G. W. **2015**. Effect of angiotensin II-induced arterial hypertension on the voltage-dependent contractions of mouse arteries. *Pflugers Arch*.
- FU, X., HUANG, C., WONG, K. S., CHEN, X. & GAO, Q. **2016**. A New Method for Cerebral Arterial Stiffness by Measuring Pulse Wave Velocity Using Transcranial Doppler. *J Atheroscler Thromb*.
- FULTON, D., GRATTON, J. P., MCCABE, T. J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T. F., PAPAPETROPOULOS, A. & SESSA, W. C. **1999**. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399, 597-601.
- FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. **1980**. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-6.
- GAO, S., HO, D., VATNER, D. E. & VATNER, S. F. **2011**. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*, 1, 71-83.
- GARCIA, M., MULVAGH, S. L., BAIREY MERZ, C. N., BURING, J. E. & MANSON, J. E. **2016**. Cardiovascular Disease in Women: Clinical Perspectives. *Circ Res*, 118, 1273-93.

- GARCIA, M. J., RODRIGUEZ, L., ARES, M., GRIFFIN, B. P., THOMAS, J. D. & KLEIN, A. L. **1996**. Differentiation of constrictive pericarditis from restrictive cardiomyopathy: assessment of left ventricular diastolic velocities in longitudinal axis by Doppler tissue imaging. *J Am Coll Cardiol*, 27, 108-14.
- GIANNUZZI, P., IMPARATO, A., TEMPORELLI, P. L., DE VITO, F., SILVA, P. L., SCAPELLATO, F. & GIORDANO, A. **1994**. Doppler-derived mitral deceleration time of early filling as a strong predictor of pulmonary capillary wedge pressure in postinfarction patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 23, 1630-7.
- GODECKE, A., DECKING, U. K., DING, Z., HIRCHENHAIN, J., BIDMON, H. J., GODECKE, S. & SCHRADER, J. **1998**. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res*, 82, 186-94.
- GORI, T., MUXEL, S., DAMASKE, A., RADMACHER, M. C., FASOLA, F., SCHAEFER, S., SCHULZ, A., JABS, A., PARKER, J. D. & MUNZEL, T. **2012**. Endothelial function assessment: flow-mediated dilation and constriction provide different and complementary information on the presence of coronary artery disease. *Eur Heart J*, 33, 363-71.
- GORI, T., PARKER, J. D. & MUNZEL, T. **2011**. Flow-mediated constriction: further insight into a new measure of vascular function. *Eur Heart J*, 32, 784-7.
- GRIENDLING, K. K. & FITZGERALD, G. A. **2003**. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*, 108, 2034-40.
- GRIENDLING, K. K., MINIERI, C. A., OLLERENSHAW, J. D. & ALEXANDER, R. W. **1994**. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 74, 1141-8.
- HANAFY, K. A., KRUMENACKER, J. S. & MURAD, F. **2001**. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, 7, 801-19.
- HARTENECK, C., KOESLING, D., SOLING, A., SCHULTZ, G. & BOHME, E. **1990**. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett*, 272, 221-3.
- HEISS, C., SIEVERS, R. E., AMABILE, N., MOMMA, T. Y., CHEN, Q., NATARAJAN, S., YEGHIAZARIANS, Y. & SPRINGER, M. L. **2008**. In vivo measurement of flow-mediated vasodilation in living rats using high-resolution ultrasound. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H1086-93.
- HEISS, E. H., SCHACHNER, D., WERNER, E. R. & DIRSCH, V. M. **2009**. Active NF-E2-related factor (Nrf2) contributes to keep endothelial NO synthase (eNOS) in the coupled state: role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels. *J Biol Chem*, 284, 31579-86.
- HINK, U., LI, H., MOLLNAU, H., OELZE, M., MATHEIS, E., HARTMANN, M., SKATCHKOV, M., THAISS, F., STAHL, R. A., WARNHOLTZ, A., MEINERTZ, T., GRIENDLING, K., HARRISON, D. G., FORSTERMANN, U. & MUNZEL, T. **2001**. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*, 88, E14-22.
- IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E. & CHAUDHURI, G. **1987**. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9265-9.
- IGNARRO, L. J., WOOD, K. S. & WOLIN, M. S. **1982**. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 2870-3.
- JARCHAU, T., HAUSLER, C., MARKERT, T., POHLER, D., VANDERKERCKHOVE, J., DE JONGE, H. R., LOHMANN, S. M. & WALTER, U. **1994**. Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9426-30.
- JENSEN, J. K. **2016**. Risk Prediction: Are We There Yet? *Circulation*.
- KEILBACH, A., RUTH, P. & HOFMANN, F. **1992**. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, 208, 467-73.
- KLEIN, C. **2002**. Nitric oxide and the other cyclic nucleotide. *Cell Signal*, 14, 493-8.

- KOESLING, D., RUSSWURM, M., MERGIA, E., MULLERSHAUSEN, F. & FRIEBE, A. **2004**. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochem Int*, 45, 813-9.
- KORKMAZ, H. & ONALAN, O. **2008**. Evaluation of endothelial dysfunction: flow-mediated dilation. *Endothelium*, 15, 157-63.
- KOVACS, A., FULOP, G. A., KOVACS, A., CSIPO, T., BODI, B., PRIKSZ, D., JUHASZ, B., BEKE, L., HENDRIK, Z., MEHES, G., GRANZIER, H., EDES, I., FAGYAS, M., PAPP, Z., BARTA, J. & TOTH, A. **2016**. Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, ajpheart.00842.2015.
- LAKOUMENTAS, J. A., PANOU, F. K., KOTSEROGLOU, V. K., AGGELI, K. I. & HARBIS, P. K. **2005**. The Tei index of myocardial performance: applications in cardiology. *Hellenic J Cardiol*, 46, 52-8.
- LANDMESSER, U., DIKALOV, S., PRICE, S. R., MCCANN, L., FUKAI, T., HOLLAND, S. M., MITCH, W. E. & HARRISON, D. G. **2003**. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, 111, 1201-9.
- LANDMESSER, U. & HARRISON, D. G. **2001**. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis*, 12, 455-61.
- LAUBOECK, H. **1980**. Echocardiographic study of the isovolumetric contraction time. *J Biomed Eng*, 2, 281-4.
- LEI, J., VODOVOTZ, Y., TZENG, E. & BILLIAR, T. R. **2013**. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide*, 35, 175-85.
- LEUNG, P. S. & CARLSSON, P. O. **2001**. Tissue renin-angiotensin system: its expression, localization, regulation and potential role in the pancreas. *J Mol Endocrinol*, 26, 155-64.
- LI, J., ICHIKAWA, T., VILLACORTA, L., JANICKI, J. S., BROWER, G. L., YAMAMOTO, M. & CUI, T. **2009**. Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 1843-50.
- LIND, L. **2014**. Flow-mediated vasodilation over five years in the general elderly population and its relation to cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*, 237, 666-70.
- LOBMAIER, S. M., CRUZ-LEMINE, M., VALENZUELA-ALCARAZ, B., ORTIZ, J. U., MARTINEZ, J. M., GRATACOS, E. & CRISPI, F. **2014**. Influence of equipment and settings on myocardial performance index repeatability and definition of settings to achieve optimal reproducibility. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 43, 632-9.
- MA, Q. **2013**. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 401-26.
- MAMUDU, H. M., PAUL, T. K., WANG, L., VEERANKI, S. P., PANCHAL, H. B., ALAMIAN, A., SARNOSKY, K. & BUDOFF, M. **2016**. The effects of multiple coronary artery disease risk factors on subclinical atherosclerosis in a rural population in the United States. *Prev Med*.
- MASSION, P. B., FERON, O., DESSY, C. & BALLIGAND, J. L. **2003**. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res*, 93, 388-98.
- MATSUNO, K., YAMADA, H., IWATA, K., JIN, D., KATSUYAMA, M., MATSUKI, M., TAKAI, S., YAMANISHI, K., MIYAZAKI, M., MATSUBARA, H. & YABE-NISHIMURA, C. **2005**. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation*, 112, 2677-85.
- MERGIA, E., FRIEBE, A., DANGEL, O., RUSSWURM, M. & KOESLING, D. **2006**. Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest*, 116, 1731-7.
- MERGIA, E., RUSSWURM, M., ZOIDL, G. & KOESLING, D. **2003**. Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal*, 15, 189-95.
- MESTAS, J. & HUGHES, C. C. **2004**. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172, 2731-8.
- MIREA, O., DUCHENNE, J. & VOIGT, J. U. **2016**. Recent advances in echocardiography: strain and strain rate imaging. *F1000Res*, 5.

- MOLLNAU, H., WENDT, M., SZOCS, K., LASSEGUE, B., SCHULZ, E., OELZE, M., LI, H., BODENSCHATZ, M., AUGUST, M., KLESCHYOV, A. L., TSILIMINGAS, N., WALTER, U., FORSTERMANN, U., MEINERTZ, T., GRIENDLING, K. & MUNZEL, T. **2002**. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*, 90, E58-65.
- MONTEZANO, A. C. & TOUYZ, R. M. **2012**. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 110, 87-94.
- MOTOHASHI, H. & YAMAMOTO, M. **2004**. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 10, 549-57.
- MUELLER, C. F., LAUDE, K., MCNALLY, J. S. & HARRISON, D. G. **2005**. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 274-8.
- MULLERSHAUSEN, F., RUSSWURM, M., FRIEBE, A. & KOESLING, D. **2004**. Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272. *Circulation*, 109, 1711-3.
- MUNZEL, T., DAIBER, A., ULLRICH, V. & MULSCH, A. **2005**. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1551-7.
- NAIRN, R. C., FRASER, K. B. & CHADWICK, C. S. **1959**. The histological localization of renin with fluorescent antibody. *Br J Exp Pathol*, 40, 155-63.
- NIMMEGEERS, S., SIPS, P., BUYS, E., BROUCKAERT, P. & VAN DE VOORDE, J. **2007**. Functional role of the soluble guanylyl cyclase alpha(1) subunit in vascular smooth muscle relaxation. *Cardiovasc Res*, 76, 149-59.
- NISHIMURA, R. A. & TAJIK, A. J. **1997**. Evaluation of diastolic filling of left ventricle in health and disease: Doppler echocardiography is the clinician's Rosetta Stone. *J Am Coll Cardiol*, 30, 8-18.
- PAINE, R. M. **1948**. Pulse-wave velocity as an index of aging in the cardiovascular system. *J Gerontol*, 3, 303-5.
- PATERSON, D. **2001**. Nitric oxide and the autonomic regulation of cardiac excitability. The G.L. Brown Prize Lecture. *Exp Physiol*, 86, 1-12.
- PFEIFER, A., RUTH, P., DOSTMANN, W., SAUSBIER, M., KLATT, P. & HOFMANN, F. **1999**. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 135, 105-49.
- POLLICK, C. **1978**. Echocardiography in a district general hospital. *Postgrad Med J*, 54, 297-301.
- PRASAD, A. M., KETSAWATSOMKRON, P., NUNO, D. W., KOVAL, O. M., DIBBERN, M. E., VENEMA, A. N., SIGMUND, C. D., LAMPING, K. G. & GRUMBACH, I. M. **2016**. Role of CaMKII in Ang-II-dependent small artery remodeling. *Vascul Pharmacol*.
- RAMANATHAN, S., MAZZALUPO, S., BOITANO, S. & MONTFORT, W. R. **2011**. Thrombospondin-1 and angiotensin II inhibit soluble guanylyl cyclase through an increase in intracellular calcium concentration. *Biochemistry*, 50, 7787-99.
- RAJAGOPALAN, S., KURZ, S., MUNZEL, T., TARPEY, M., FREEMAN, B. A., GRIENDLING, K. K. & HARRISON, D. G. **1996**. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, 97, 1916-23.
- REGAN, J. A., MAURO, A. G., CARBONE, S., MARCHETTI, C., GILL, R., MEZZAROMA, E., VALLE RALEIGH, J., SALLOUM, F. N., VAN TASSELL, B. W., ABBATE, A. & TOLDO, S. **2015**. A Mouse Model of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction due to Chronic Infusion of a Low Subpressor Dose of Angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, ajpheart 00282 2015.

- ROCHETTE, L., LORIN, J., ZELLER, M., GUILLAND, J. C., LORGIS, L., COTTIN, Y. & VERGELY, C. **2013**. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther*, 140, 239-57.
- RUSSWURM, M., WITTAU, N. & KOESLING, D. **2001**. Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem*, 276, 44647-52.
- SCHLOSSMANN, J., AMMENDOLA, A., ASHMAN, K., ZONG, X., HUBER, A., NEUBAUER, G., WANG, G. X., ALLESCHER, H. D., KORTH, M., WILM, M., HOFMANN, F. & RUTH, P. **2000**. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*, 404, 197-201.
- SCHULER, D., SANSONE, R., FREUDENBERGER, T., RODRIGUEZ-MATEOS, A., WEBER, G., MOMMA, T. Y., GOY, C., ALTSCHMIED, J., HAENDELER, J., FISCHER, J. W., KELM, M. & HEISS, C. **2014**. Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 2651-7.
- SKEGGS, L. T., JR., LENTZ, K. E., KAHN, J. R., SHUMWAY, N. P. & WOODS, K. R. **1956**. The amino acid sequence of hypertensin. II. *J Exp Med*, 104, 193-7.
- SMITH, C., MITCHINSON, M. J., ARUOMA, O. I. & HALLIWELL, B. **1992**. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J*, 286 ( Pt 3), 901-5.
- SORESCU, D., WEISS, D., LASSEGUE, B., CLEMPUS, R. E., SZOCS, K., SORESCU, G. P., VALPPU, L., QUINN, M. T., LAMBETH, J. D., VEGA, J. D., TAYLOR, W. R. & GRIENDLING, K. K. **2002**. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1429-35.
- SOUICY, K. G., RYOO, S., BENJO, A., LIM, H. K., GUPTA, G., SOHI, J. S., ELSER, J., AON, M. A., NYHAN, D., SHOUKAS, A. A. & BERKOWITZ, D. E. **2006**. Impaired shear stress-induced nitric oxide production through decreased NOS phosphorylation contributes to age-related vascular stiffness. *J Appl Physiol (1985)*, 101, 1751-9.
- SRIRAMULA, S. & FRANCIS, J. **2015**. Tumor Necrosis Factor - Alpha Is Essential for Angiotensin II-Induced Ventricular Remodeling: Role for Oxidative Stress. *PLoS One*, 10, e0138372.
- STASCH, J. P., PACHER, P. & EVGENOV, O. V. **2011**. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation*, 123, 2263-73.
- STECKELINGS, U. M., KASCHINA, E. & UNGER, T. **2005**. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides*, 26, 1401-9.
- STONE, J. R. & MARLETTA, M. A. **1994**. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, 33, 5636-40.
- STUEHR, D., POU, S. & ROSEN, G. M. **2001**. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*, 276, 14533-6.
- SURKS, H. K., MOCHIZUKI, N., KASAI, Y., GEORGESCU, S. P., TANG, K. M., ITO, M., LINCOLN, T. M. & MENDELSON, M. E. **1999**. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science*, 286, 1583-7.
- TAKIMOTO, E., CHAMPION, H. C., LI, M., REN, S., RODRIGUEZ, E. R., TAVAZZI, B., LAZZARINO, G., PAOLOCCI, N., GABRIELSON, K. L., WANG, Y. & KASS, D. A. **2005**. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest*, 115, 1221-31.
- TAWA, M. & OKAMURA, T. **2016**. Soluble guanylate cyclase redox state under oxidative stress conditions in isolated monkey coronary arteries. *Pharmacol Res Perspect*, 4, e00261.
- THIJSEN, D. H., BLACK, M. A., PYKE, K. E., PADILLA, J., ATKINSON, G., HARRIS, R. A., PARKER, B., WIDLANSKY, M. E., TSCHAKOVSKY, M. E. & GREEN, D. J. **2011**. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300, H2-12.

- TREMBLAY, J., DESJARDINS, R., HUM, D., GUTKOWSKA, J. & HAMET, P. **2002**. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem*, 230, 31-47.
- TSAI, E. J. & KASS, D. A. **2009**. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther*, 122, 216-38.
- TURRENS, J. F., ALEXANDRE, A. & LEHNINGER, A. L. **1985**. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 237, 408-14.
- UMAR, S. & VAN DER LAARSE, A. **2010**. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem*, 333, 191-201.
- UNGER, T., JAKOBSEN, A., HEROYS, J., RALPH, A., REES, T. & SHAW, M. **2008**. Targeting cardiovascular protection: the concept of dual renin-angiotensin system control. *Medscape J Med*, 10 Suppl, S4.
- VAN BUSSEL, F. C., VAN BUSSEL, B. C., HOEKS, A. P., OP 'T ROODT, J., HENRY, R. M., FERREIRA, I., VANMOLKOT, F. H., SCHALKWIJK, C. G., STEHOUWER, C. D. & REESINK, K. D. **2015**. A control systems approach to quantify wall shear stress normalization by flow-mediated dilation in the brachial artery. *PLoS One*, 10, e0115977.
- VERDECCHIA, P., SCHILLACI, G., BORGIONI, C., CIUCCI, A., BATTISTELLI, M., BARTOCCINI, C., SANTUCCI, A., SANTUCCI, C., REBOLDI, G. & PORCELLATI, C. **1995**. Adverse prognostic significance of concentric remodeling of the left ventricle in hypertensive patients with normal left ventricular mass. *J Am Coll Cardiol*, 25, 871-8.
- VERGELY, C., MAUPOIL, V., CLERMONT, G., BRIL, A. & ROCHETTE, L. **2003**. Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch Biochem Biophys*, 420, 209-16.
- VERSARI, D., DAGHINI, E., VIRDIS, A., GHIADONI, L. & TADDEI, S. **2009**. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 32 Suppl 2, S314-21.
- WANG, H., ZHONG, F., PAN, J., LI, W., SU, J., HUANG, Z. X. & TAN, X. **2012**. Structural and functional insights into the heme-binding domain of the human soluble guanylate cyclase alpha2 subunit and heterodimeric alpha2beta1. *J Biol Inorg Chem*, 17, 719-30.
- WARNHOLTZ, A., NICKENIG, G., SCHULZ, E., MACHARZINA, R., BRASEN, J. H., SKATCHKOV, M., HEITZER, T., STASCH, J. P., GRIENGLING, K. K., HARRISON, D. G., BOHM, M., MEINERTZ, T. & MUNZEL, T. **1999**. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 99, 2027-33.
- WERNET, W., FLOCKERZI, V. & HOFMANN, F. **1989**. The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, 251, 191-6.
- YAN, C., KIM, D., AIZAWA, T. & BERK, B. C. **2003**. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 26-36.
- YUE, F., CHENG, Y., BRESCHI, A., VIERSTRA, J., WU, W., RYBA, T., SANDSTROM, R., MA, Z., DAVIS, C., POPE, B. D., SHEN, Y., PERVOUCHINE, D. D., DJEBALI, S., THURMAN, R. E., KAUL, R., RYNES, E., KIRILUSHA, A., MARINOV, G. K., WILLIAMS, B. A., TROUT, D., AMRHEIN, H., FISHER-AYLOR, K., ANTOSHECHKIN, I., DESALVO, G., SEE, L. H., FASTUCA, M., DRENKOW, J., ZALESKI, C., DOBIN, A., PRIETO, P., LAGARDE, J., BUSSOTTI, G., TANZER, A., DENAS, O., LI, K., BENDER, M. A., ZHANG, M., BYRON, R., GROUDINE, M. T., MCCLEARY, D., PHAM, L., YE, Z., KUANG, S., EDSALL, L., WU, Y. C., RASMUSSEN, M. D., BANSAL, M. S., KELLIS, M., KELLER, C. A., MORRISSEY, C. S., MISHRA, T., JAIN, D., DOGAN, N., HARRIS, R. S., CAYTING, P., KAWLI, T., BOYLE, A. P., EUSKIRCHEN, G., KUNDAJE, A., LIN, S., LIN, Y., JANSEN, C., MALLADI, V. S., CLINE, M. S., ERICKSON, D. T., KIRKUP, V. M., LEARNED, K., SLOAN, C. A., ROSENBLOOM, K. R., LACERDA DE SOUSA, B., BEAL, K.,

- PIGNATELLI, M., FLICEK, P., LIAN, J., KAHVECI, T., LEE, D., KENT, W. J., RAMALHO SANTOS, M., HERRERO, J., NOTREDAME, C., JOHNSON, A., VONG, S., LEE, K., BATES, D., NERI, F., DIEGEL, M., CANFIELD, T., SABO, P. J., WILKEN, M. S., REH, T. A., GISTE, E., SHAFER, A., KUTYAVIN, T., HAUGEN, E., DUNN, D., REYNOLDS, A. P., NEPH, S., HUMBERT, R., HANSEN, R. S., DE BRUIJN, M., et al. **2014**. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature*, 515, 355-64.
- ZHONG, F., PAN, J., LIU, X., WANG, H., YING, T., SU, J., HUANG, Z. X. & TAN, X. **2011**. A novel insight into the heme and NO/CO binding mechanism of the alpha subunit of human soluble guanylate cyclase. *J Biol Inorg Chem*, 16, 1227-39.
- ZOUNGAS, S. & ASMAR, R. P. **2007**. Arterial stiffness and cardiovascular outcome. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34, 647-51.

## **6. | Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. M. Kelm für die Möglichkeit zur Durchführung einer experimentellen Arbeit in dem kardiologischen Labor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bedanken.

Herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. Dr. rer. nat. M. Cortese-Krott für die Bereitstellung des Themas sowie die intensive Betreuung und kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit.

Herrn Dr. R. Erkens möchte ich für die langjährige Unterstützung während der Planung und Umsetzung der Arbeit sowie für die vielen Denkanstöße sowie Diskussionsbereitschaft besonders danken.

Ein Dank geht auch an Frau Dr. E. Mergia für die vertrauensvolle Bereitstellung der verschiedenen Mausmodelle sowie für die Implantation der Angiotensin-Pumpen durch Frau K. Broekmans.

Vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung im kardiologischen Labor an Frau S. Becher sowie an die wissenschaftlichen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich ganz besonders für die allgegenwärtige, liebevolle und grenzenlose Unterstützung während meines Studiums und darüber hinaus bedanken.