

Untersuchungen zur Funktion von ACE2 und Angiotensin-(1-7) in glatten Muskelzellen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Brit Katja Rentzsch

aus Hoyerswerda

Berlin, Mai 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Molekularbiologie von
Hormonen im Herz-Kreislaufsystem des Max-Delbrück-Centrums für
Molekulare Medizin in Berlin-Buch angefertigt

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Bader

2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

Disputation am 11.08.2008

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG 1

ABSTRACT 3

1. EINLEITUNG 5

1.1. Das Renin-Angiotensin-System und seine Bedeutung 5

1.1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen 5

1.1.2. Das traditionelle RAS..... 5

1.1.3. Das aktualisierte, komplexere RAS..... 7

1.1.4. Das lokale RAS..... 8

1.1.5. „Outside-in-Signaling“ von ACE 9

1.2. ACE2 - Das neue Mitglied des RAS Systems 11

1.2.1. Entdeckung und Struktur von ACE2..... 11

1.2.2. Expressionsorte von ACE2 12

1.2.3. Die Substrate von ACE2 13

1.2.4. Physiologische und pathophysiologische Rolle von ACE2 14

1.2.4.1. ACE2 und der Blutdruck..... 14

1.2.4.2. Rolle von ACE2 im Herzen..... 15

1.2.4.3. Rolle von ACE2 in der Niere 16

1.2.4.4. Die Wirkung von ACE2 in der Leber 17

1.2.4.5. Die Rolle von ACE2 in der Lunge..... 18

1.3. Ang-(1-7) - Der neue Gegenspieler von Ang II im RAS 19

1.3.1. Rolle von Ang-(1-7) im Gefäßsystem 19

1.3.2. Ang-(1-7) und die Herzfunktion 21

1.3.3. Ang-(1-7) und die Nierenfunktion 22

1.4. Modulation von ACE2 und Ang-(1-7) durch Anti-RAS Medikamente..... 22

1.5. Tiermodelle in der kardiovaskulären Forschung 23

1.5.1. Tiermodelle für essentielle Hypertonie 23

1.5.2. Generierung transgener Ratten mittels pronukleärer Mikroinjektion 25

1.6. Zielsetzung 27

2. MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1. Material	28
2.1.1. Feinchemikalien und Reagenzien	28
2.1.2. Peptide und Inhibitoren	30
2.1.3. Kits, Enzyme, Antikörper und Marker	31
2.1.4. Primer	32
2.1.5. Vektoren	32
2.1.6. Laborgeräten und Verbrauchsmaterialien	32
2.1.7. Zelllinien	34
2.1.8. Versuchstiere.....	34
2.1.9. Software	34
2.2. METHODEN	35
2.2.1. Versuchstiere.....	35
2.2.1.1. Versuchstierhaltung.....	35
2.2.1.2. Entnahme und Aufbereitung von Blut und Organen	35
2.2.1.3. Erzeugung transgener Ratten	36
2.2.2. Genotypisierung der transgenen Ratten.....	36
2.2.2.1. Isolierung der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien	36
2.2.2.2. PCR – Amplifikation zur Genotypbestimmung	37
2.2.2.3. Gelelektrophorese	38
2.2.3. Klonierung von DNA - Fragmenten	39
2.2.3.1. PCR Amplifikation zur Klonierung von DNA - Fragmenten.....	39
2.2.3.2. Restriktionsverdau von DNA	40
2.2.3.3. DNA-Isolation aus Agarosegel	40
2.2.3.4. Ligation	40
2.2.3.5. Transformation von kompetenten Bakterienzellen.....	41
2.2.3.6. Kultivierung der transformierten Bakterienzellen	42
2.2.3.7. Isolierung der Plasmid-DNA	42
2.2.3.8. Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA.....	43
2.2.3.9. Sequenzierung	44
2.2.4. Expressionsanalyse	44
2.2.4.1. RNA-Isolierung	44
2.2.4.2. DNase Behandlung der RNA - Präparationen	44
2.2.4.3. Reverse Transkription	45
2.2.4.4. Quantitative Real-time PCR	45
2.2.4.4.1. Durchführung der PCR	46
2.2.4.4.2. Berechnung der Expression	48

2.2.4.5. RNase Protection Assay (RPA).....	48
2.2.4.5.1. RNA - Vorbereitung	49
2.2.4.5.2. Sondenherstellung.....	49
2.2.4.5.3. Hybridisierung.....	50
2.2.4.5.4. Größenauffrennung und Visualisierung der protektierten RNA.....	50
2.2.5. Expressionsnachweis mittels Western Blot Analyse.....	51
2.2.5.1. Proteinisolierung aus Gewebe	51
2.2.5.2. Proteinisolierung aus Zellen	51
2.2.5.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	52
2.2.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
2.2.5.5. Western Blot	53
2.2.5.6. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	54
2.2.6. Bestimmung der Peptidkonzentrationen.....	55
2.2.6.1. Messung der Ang I Konzentration	55
2.2.6.2. Messung der Ang II Konzentration.....	56
2.2.6.3. Messung der Angiotensin-(1-7) Konzentration.....	57
2.2.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten und anderer Parameter	59
2.2.7.1. ACE2 Aktivitätsassay	59
2.2.7.2. Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung von Renin.....	60
2.2.7.3. Nitrat/Nitrit-Messung (Griess-Assay).....	61
2.2.7.4. cGMP - Bestimmung	61
2.2.7.5. SOD - Aktivität	62
2.2.7.6. TBARS Assay.....	63
2.2.8. Histochemische Untersuchungen.....	63
2.2.8.1. Masson-Goldner Trichrom Färbung anhand von Paraffinschnitten	63
2.2.8.2. Immunhistochemie anhand von Kryoschnitten	65
2.2.9. Zellkultur	65
2.2.9.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen	65
2.2.9.2. Aussaat der Zellen	66
2.2.9.3. Passagieren von Zellen	66
2.2.9.4. Einfrieren und Lagerung von Zellen	66
2.2.9.5. Stimulation der Zellen und nachfolgender SAPK/JNK Assay	66
2.2.9.6. Stimulation der Zellen zur Expressionsanalyse	67
2.2.10. Physiologische Untersuchungen	67
2.2.10.1. Blutdruckmessungen.....	67
2.2.10.2. Akute sowie chronische Injektion von pharmakologischen Substanzen.....	68
2.2.10.3. Messung der Endothelfunktion in vivo	69
2.2.10.4. Messung der Endothelfunktion in vitro	69
2.2.10.5. Metabolische Käfige	70
2.2.11. Statistik	71

3. ERGEBNISSE	72
3.1. Überexpression von ACE2	72
3.1.1. Herstellung der ACE2 transgenen Ratten	72
3.1.2. Analyse der mRNA Expression des Transgens.....	73
3.1.3. Expressionsnachweis von humanem ACE2 in verschiedenen Gefäßen.....	75
3.1.4. ACE2 Aktivität.....	76
3.1.5. Einfluss der ACE2 Überexpression auf die Peptidkonzentrationen	77
3.1.6. Bestimmung der Reninaktivität und -konzentration	78
3.1.7. Peptidkonzentrationen sowie Reninwerte in den SD-ACE2 Ratten	78
3.1.8. Blutdruckmessung	80
3.1.9. Messung der vasokonstriktorischen Reaktion nach Ang II Gabe.....	81
3.1.10. Messungen der Endothelfunktion.....	84
3.1.11. Messung von NO sowie von den reaktiven Sauerstoffspezies	88
3.1.12. Kardiale Veränderungen in den SHRSP-ACE2 Ratten.....	91
3.1.13. Messung der Nierenfunktion	94
3.2. Ang-(1-7) Überexpression	96
3.2.1. Klonierung des Transgenkonstrukts.....	96
3.2.2. Nachweis der Expression	98
3.2.3. Auswirkung der Ang-(1-7) Überexpression auf die anderen RAS Komponenten.....	99
3.2.4. Blutdruckmessung	100
3.3. Überexpression eines Transgens mithilfe des Cre-loxP Systems.....	102
3.3.1. Die zugrundeliegende Strategie	102
3.3.2. Erzeugung der transgenen Rattenlinien	103
3.3.3. Expressionsnachweis in den TGR(SMMHCCre) und TGR(RGS5HAlox) Ratten ...	105
3.3.4. Charakterisierung der doppeltransgenen Ratten.....	107
3.4. Analyse der Rezeptor-ähnlichen Funktion von ACE.....	111
3.4.1. Herstellung der gezielt veränderten murinen ACE-Formen	111
3.4.2. Induktion der Signaltransduktion	113
3.4.3. Modulation der COX-2 Expression.....	116
4. DISKUSSION	118
4.1. Untersuchung der transgenen Ratten mit Überexpression von ACE2.....	118
4.1.1. Transgenexpression unter der Kontrolle des SM22 α Promotors	118

4.1.2. Einfluss der ACE2 Überexpression auf verschiedene RAS Komponenten	120
4.1.3. Akute Auswirkung der ACE2 Überexpression	121
4.1.4. ACE2 Wirkung auf den Blutdruck und die Endothelfunktion	122
4.1.5. Einfluss von ACE2 auf die Bildung von NO und ROS	124
4.1.6. Auswirkung der ACE2 Überexpression auf die Endorganschäden von SHRSP Ratten.....	126
4.2. Überexpression von Ang-(1-7) in den glatten Muskelzellen von Ratten	128
4.3. Nutzung der Cre-loxP Technologie für die Überexpression eines Transgens	130
4.4. Nähere Charakterisierung der Rezeptor-ähnlichen Funktion von ACE.....	133
4.4.1. Wirkung verschiedener Substrate	134
4.4.2. Einfluss der zwei katalytischen Domänen	134
4.5. Zusammenfassung	137
LITERATURVERZEICHNIS	139
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	155
DANKSAGUNG.....	158
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	159

ZUSAMMENFASSUNG

Das Renin - Angiotensin - System (RAS) spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung einer Hypertonie sowie von assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen, wie Schlaganfall, Myokardinfarkt, Herz- und Niereninsuffizienz. Als Haupteffektor des RAS wurde lange Zeit der Vasokonstriktor Angiotensin II (Ang II) angesehen, welcher durch die Carboxydipeptidase ACE (Angiotensin converting enzyme) erzeugt wird. In den letzten Jahren hat sich aber das Bild des RAS grundlegend geändert, wobei die Identifizierung von ACE2 (Angiotensin converting enzyme 2) eine ausschlaggebende Rolle spielte. Diese Carboxypeptidase ist unter anderem verantwortlich für den Abbau des Vasokonstriktors Ang II sowie für die Erzeugung von Angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)). Das Heptapeptid wiederum agiert über seinen Rezeptor Mas und scheint den Effekten von Ang II entgegenzuwirken. So rückte in den letzten Jahren die ACE2 / Ang-(1-7) / Mas Achse in den Fokus der Forschung.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte nun die Rolle von ACE2 in der Pathogenese von spontan hypertensiven Ratten mit Neigung zum Schlaganfall (SHRSP) näher untersucht werden. Dieses Modell war insofern interessant, da hier das ACE2 - Gen, welches sich auf dem X-Chromosom befindet, zu einem quantitativen Merkmalsloкус für Hypertonie kartiert wurde. Überdies wiesen die SHRSP Ratten eine erniedrigte ACE2 Expression auf. Folglich wurden in dieser Arbeit transgene SHRSP Ratten mit Überexpression von humanem ACE2 in den vaskulären glatten Muskelzellen charakterisiert. Dabei führte die Überexpression von ACE2 zu einem signifikant erniedrigten Blutdruck, einer verminderten Reaktion auf den Vasokonstriktor Ang II sowie zu einer verbesserten Endothelfunktion. Des Weiterem zeigten die transgenen Tiere im Vergleich zu ihren SHRSP Kontrollen eine herabgesetzte Bildung von kardialer Hypertrophie und Fibrose sowie eine verbesserte Nierenfunktion. Überdies konnte auch in den normotensiven Sprague Dawley (SD) Ratten mit Überexpression von ACE2 in den vaskulären glatten Muskelzellen eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation detektiert werden. Somit wurde nachgewiesen, dass ACE2 eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der Endothelfunktion besitzt, wobei dies wiederum einen kardiovaskulären sowie renalen Schutz auszuüben scheint.

Um insbesondere die Rolle des Heptapeptids Ang-(1-7) zu klären, welches bei einer ACE2 Überexpression in den SHRSP Tieren signifikant erhöht war, wurden ferner

transgene Ratten generiert, welche in den glatten Muskelzellen vermehrt Ang-(1-7) erzeugen. Erste Ergebnisse zeigten aber keine Unterschiede zwischen transgenen Ratten und Kontrolltieren.

Eine weitere Aufgabe bestand in der Etablierung einer Methode zur Verbesserung einer Transgenexpression in den glatten Muskelzellen von Ratten. Hierbei fand die Cre-loxP Technologie Anwendung. Diese ermöglichte die Generierung von Ratten mit einer starken Expression des gewünschten Gens, wobei aber die Gewebespezifität noch besser untersucht werden muss.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand in einem in vitro Projekt zur näheren Charakterisierung der erst kürzlich beschriebenen Rezeptor-ähnlichen Funktion von ACE. Dabei wurden mögliche Liganden gesucht, wobei vor allem Ang-(1-7) geprüft werden sollte. Des Weiteren wurde die Rolle der zwei katalytischen Domänen von ACE in Bezug auf die Induktion des intrazellulären Signalweges untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass ACE-Inhibitoren sowie Bradykinin und Angiotensin I eine Signaltransduktion über ACE auslösen. Andere Substrate hingegen, so auch Ang-(1-7), konnten eine solche Wirkung ausschließlich bei ACE-Formen mit nur einer aktiven Domäne auslösen. Die gleichzeitige Bindung dieser Substrate an beide katalytischen Domänen von ACE schien die Auslösung einer Signaltransduktion eher zu hemmen.

Die Aktivierung der ACE2/ Ang-(1-7) / Mas Achse könnte somit als neue therapeutische Strategie bei der Bekämpfung von essentieller Hypertonie sowie anderer kardiovaskulärer Erkrankungen angestrebt werden. Ferner deutet die Identifizierung des ACE-abhängigen intrazellulären Signalweges an, dass das RAS noch unerwartete Aspekte mit klinischen Auswirkungen besitzt.

ABSTRACT

The renin – angiotensin - system (RAS) plays a crucial role in the development of hypertension as well as associated cardiovascular diseases, such as stroke, myocardial infarction, heart and renal failure. For long time the vasoconstrictive angiotensin II (Ang II), which is generated by ACE (angiotensin converting enzyme), was considered as main active peptide in the RAS. Over the past years the view of the RAS changed dramatically, and the identification of ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) played a pivotal role in this process. Amongst others, this carboxypeptidase is responsible for the reduction of Ang II as well as the generation of angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)). In turn, the heptapeptide acts on Mas and counteracts the effects of Ang II. Consequently, over the past years the ACE2 / Ang-(1-7) / Mas axis moved into the centre of interest.

In this thesis the role of ACE2 in the pathogenesis of hypertension in spontaneous hypertensive stroke-prone rats (SHRSP) was investigated. This animal model was interesting, since the ACE2 gene could be mapped to a quantitative trait locus for hypertension on the X chromosome, and furthermore SHRSP rats display reduced ACE2 expression. Therefore, transgenic rats on a SHRSP genetic background expressing the human ACE2 in vascular smooth muscle cells were characterized. The vascular overexpression of ACE2 reduced high blood pressure, attenuated the vasoconstrictive response to Ang II, and improved endothelial function. In addition, the transgenic rats displayed a reduced development of cardiac hypertrophy and fibrosis as well as an improved kidney function in comparison to the controls. Also the overexpression of ACE2 in vascular smooth muscle cells of normotensive Sprague Dawley (SD) rats led to an improved endothelial dependent vasodilation. Therefore it could be shown that ACE2 exhibits a crucial role in the maintenance of endothelial function through which it apparently exerts cardiovascular and renal protection.

In order to investigate further the role of the heptapeptide Ang-(1-7), which is significantly increased in the ACE2 overexpressing SHRSP rats, transgenic rats were generated with enhanced secretion of Ang-(1-7) from smooth muscle cells. The first results of their characterization did not reveal any differences between transgenic and control rats.

One further project aimed at the establishment of a method for the improvement of transgene expression in smooth muscle cells of rats. In order to achieve this, a method

based on the Cre-loxP technology was used. This allowed the generation of transgenic rats with strong expression of the desired transgene, although the extent of tissue specificity still needs to be shown.

Another part of this thesis was an in vitro project concerning the characterization of the recently published receptor-like function of ACE in more detail. Looking for possible ligands in particular Ang-(1-7) was of interest and the role of the two catalytic ACE domains. It could be shown that ACE inhibitors as well as bradykinin and angiotensin I induce an outside-in signaling via ACE. In contrast, other substrates like Ang-(1-7) could induce such signal transduction only in ACE forms with one catalytic domain. The simultaneous binding of these substrates on both domains of ACE appears to inhibit this outside-in signaling.

The activation of the ACE2 / angiotensin-(1-7) / Mas axis may be a novel therapeutic strategy in primary hypertension as well as other cardiovascular diseases. In addition, the ACE-dependent signaling pathway implies that the RAS has still unexpected facets with clinical implication.

1. EINLEITUNG

1.1. Das Renin-Angiotensin-System und seine Bedeutung

1.1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

In den Industrieländern zählen kardiovaskuläre Erkrankungen nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen. Die Entwicklung von spezifischen Strategien zur Diagnose, Prävention sowie deren Behandlung ist daher von besonderer Bedeutung.

Kardiovaskuläre Ereignisse, wie Schlaganfall, Myokardinfarkt, Herz- und Niereninsuffizienz, können durch die Kontrolle des Blutdrucks stark reduziert werden (Mosterd *et al.*, 1999). Arterielle Hypertonie gilt als einer der Hauptrisikofaktoren. So konnte in den letzten 20 Jahren, durch eine verbesserte Behandlung der Patienten mit antihypertensiven Medikamenten, eine Erniedrigung der kardiovaskulären Mortalität erreicht werden. Vor allem Medikamente, welche in das Renin-Angiotensin-System (RAS) eingreifen, wie ACE (Angiotensin converting enzyme) Hemmer und Angiotensin AT₁-Rezeptorblocker, haben in der heutigen Therapie von Patienten einen hohen Stellenwert eingenommen. Ferner stellte man fest, dass diese auch unabhängig vom Blutdruck, positive Effekte in Hinsicht auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ausüben (Burnier, 2000).

In den letzten Jahren hat man viele neue Erkenntnisse bezüglich des RAS gewonnen, welche helfen die Rolle des Systems in der Pathogenese von Hypertonie und deren Folgeerkrankungen noch besser zu verstehen. Hinsichtlich der Behandlung dieser Erkrankungen eröffneten sich dadurch Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten.

1.1.2. Das traditionelle RAS

Das RAS spielt eine Schlüsselrolle in der Kontrolle kardiovaskulärer Funktionen. Seine Komponenten sind im Wesentlichen an der Steuerung des Salz- und Wasserhaushalts des Körpers sowie an der Regulation des Blutdruckes beteiligt (Inagami, 1994). Neuere Erkenntnisse weisen ferner auf eine Funktion in der Modulation von Zellwachstum und Differenzierung hin.

Eine abnormale Aktivierung des Systems wird wiederum assoziiert mit der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen, wie Bluthochdruck, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz (Ferrario, 1990; Nicholls *et al.*, 1998).

Lange Zeit wurde das RAS nur als endokrines Hormonsystem angesehen, in dem das Peptid Angiotensin II (Ang II), welches über eine Kaskade von koordinierten enzymatischen Reaktionen synthetisiert wird, die Hauptkomponente darstellt (Abbildung 1). Am Beginn der Kaskade ist Renin, eine in den Nieren synthetisierte Protease, welche den zirkulierenden Vorläufer Angiotensinogen spaltet. Diese Reaktion liefert das Decapeptid Angiotensin I (Ang I), welches physiologisch inaktiv ist. Anschließend wird Ang I durch die Wirkung des ACE, einer membranständigen Carboxydipeptidase, weiter zu den biologisch aktiven Octapeptid Ang II abgebaut (Soubrier *et al.*, 1993). ACE, auch Kininase II genannt, ist eine Zink-Metallopeptidase, welche überdies das vasodilatatorisch wirkende Gewebshormon Bradykinin (BK) und das Heptapeptid Angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)) abbaut (Erdos *et al.*, 1999).

Das gebildete Ang II, welches über die systemische Zirkulation zum peripheren Gewebe transportiert wird, kann seine diversen biologischen Aktivitäten über zwei bekannte G-Protein gekoppelte Rezeptoren, AT₁ und AT₂, ausüben, wobei die Konsequenzen der Bindung sehr unterschiedlich sind (de Gasparo *et al.*, 2000).

Der AT₁-Rezeptor ruft die überwältigende Mehrzahl der Ang II Effekte hervor, einschließlich Vasokonstriktion und Proliferationsförderung (Verheijen *et al.*, 2004). Ferner spielt er eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen. Im Gegensatz zum Menschen existieren in Ratten und Mäusen zwei Subtypen, AT_{1A} und AT_{1B} (Iwai *et al.*, 1992; Sasamura *et al.*, 1992; Konishi *et al.*, 1994). Pharmakologisch sind diese beide Rezeptor-Subtypen nicht zu unterscheiden, dennoch sind sie Produkte von verschiedenen Genen (*Agtr1a* und *Agtr1b*), welche unterschiedlich exprimiert und reguliert werden (Burson *et al.*, 1994; de Gasparo *et al.*, 2000). In den meisten Organen ist AT_{1A} der vorherrschende Rezeptor, während AT_{1B} vor allem in der Nebenniere und der Hypophyse zu finden ist.

Durch eine Ang II vermittelte Aktivierung des AT₁-Rezeptors kann in den Blutgefäßen eine Vasokonstriktion, in der Nebenniere eine Stimulation der Aldosteron- und Adrenalinfreisetzung und in der Hypophyse eine Freisetzung von Vasopressin beobachtet werden (Touyz, 2003). Dies führt wiederum in der Niere zu einer Natrium- und Wasserretention. Ferner bewirkt es eine Verminderung der glomerulären Filtration und das Einsetzen eines Durstgefühls, welches auf eine akute Stimulation der AT₁-Rezeptoren im Hypothalamus zurückgeführt wird. Eine chronische Stimulation der AT₁-Rezeptoren ruft außerdem eine Proliferation von glatten Muskelzellen und Myozyten, kardiale und vaskuläre Hypertrophie, endotheliale Dysfunktion und

Nephrosklerose hervor (Schelling *et al.*, 1991; Lijnen *et al.*, 2001; Verheijen *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu den AT₁-Rezeptoren war die Funktion der AT₂-Rezeptoren lange Zeit unklar. Man fand eine stärkere Expression dieser Rezeptoren in Embryonen. Daher wurde vor allem eine Funktion während der pränatalen Entwicklung diskutiert. Später wurde aber auch eine Hochregulierung der AT₂-Rezeptor Expression unter pathologischen Konditionen beobachtet. Mehrere Studien belegen, dass die durch Bindung von Ang II an den AT₂-Rezeptor hervorgerufenen Effekte oft entgegengesetzt zu den AT₁-Rezeptor vermittelten Effekten sind und dass sie eher eine protektive Wirkung besitzen (Levy *et al.*, 1996; Horiuchi *et al.*, 1999; Carey, 2005). Die AT₂-Aktivierung induziert Vasodilatation, Apoptose und Natriurese, was weitestgehend über die Stimulation von BK, NO (Stickstoffmonoxid) und cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) vermittelt wird (de Gasparo *et al.*, 2000; Yayama *et al.*, 2008).

1.1.3. Das aktualisierte, komplexere RAS

Während der letzten Jahre hat sich die klassische Ansicht vom RAS stark geändert. Dazu hat insbesondere die Erkenntnis, dass außer Ang II auch andere Angiotensin-Peptide, wie Ang-(1-7), Ang III und Ang IV, biologische Aktivität sowie physiologische Bedeutung aufweisen, beigetragen (Carey *et al.*, 2003). Ein besonderes Interesse hat vor allem das Heptapeptid Ang-(1-7) hervorgerufen, da es vielen kardiovaskulären Effekten von Ang II entgegenzuwirken scheint (Ferrario *et al.*, 1997; Stegbauer *et al.*, 2003; Tallant *et al.*, 2005). Den Beweis seiner biologischen Signifikanz erbrachte letztendlich die Entdeckung von ACE2 (Angiotensin converting enzyme II) sowie von dem G-Protein gekoppelten Rezeptor Mas, welcher als Ang-(1-7) Rezeptor identifiziert wurde.

Die Carboxypeptidase ACE2 kann innerhalb des RAS entweder Ang I zu Angiotensin-(1-9) (Ang-(1-9)) oder direkt Ang II zu Ang-(1-7) degradieren. Letzteres hat wiederum zur Folge, dass der Vasokonstriktor Ang II reduziert wird. Ang-(1-9) kann ferner über ACE oder NEP (neutrale Endopeptidase, Neprilysin) weiter zu Ang-(1-7) umgewandelt werden.

Des Weiteren existieren alternative Wege für die direkte Bildung von Ang-(1-7) aus Ang I via PEP (Prolyl-Endopeptidase) und NEP, welche aber nur eine untergeordnete Rolle besitzen (Santos *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992). Solch alternative Wege findet man ebenfalls für die Ang II Bildung, wobei die Serinprotease Chymase zu

nennen ist. Diese ist vor allem im Herzen aktiv und wandelt dort Ang I zu Ang II um (Urata *et al.*, 1996).

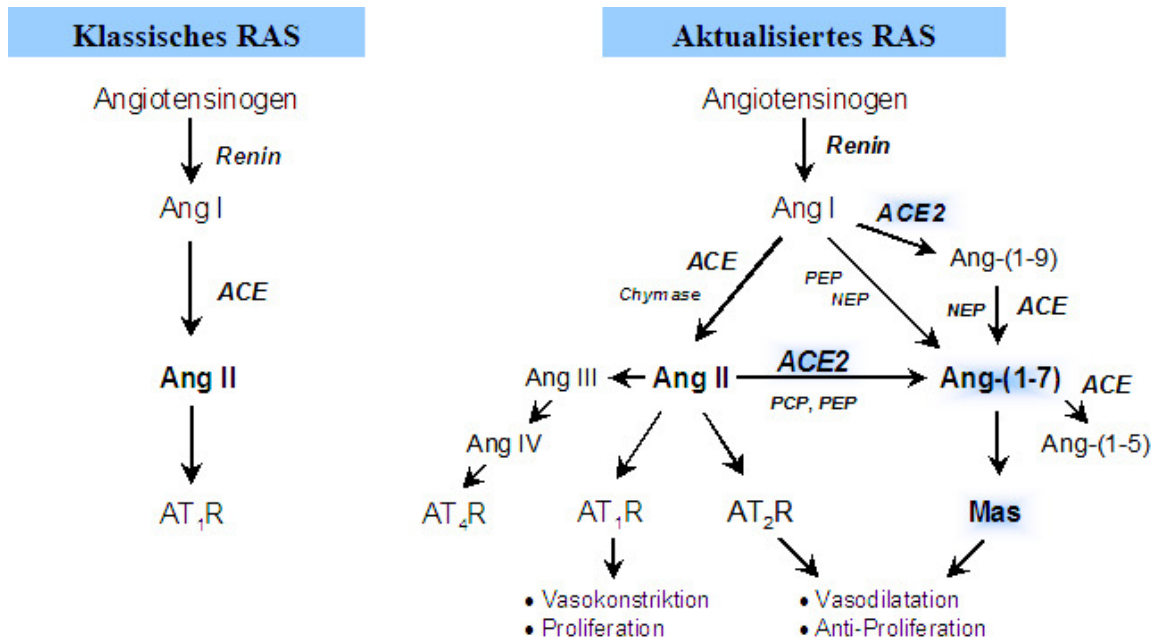


Abbildung 1: Das Renin - Angiotensin - System.

Schematische Darstellung des klassischen RAS und des aktualisierten, viel komplexeren RAS. NEP (neutrale Endopeptidase, Neprilysin); PEP (Prolyl-Endopeptidase); PCP (Prolyl-Carboxypeptidase).

1.1.4. Das lokale RAS

Die klassische Anschauung ging beim RAS von einem endokrinen System aus, in welchem die Komponenten durch bestimmte Organe bereitgestellt werden, wie z.B. Angiotensinogen von der Leber oder Renin von den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriolen der Niere. Dieses Konzept eines zirkulierenden RAS, welches lediglich über die Blutbahn agiert, reicht heute nicht mehr aus, um alle physiologischen und pathophysiologischen Effekte zu erklären. Die Hinweise auf die Existenz lokaler Systeme häufen sich und inzwischen geht man davon aus, dass neben dem systemischen RAS in verschiedenen Organen, wie z.B. Herz (Abbildung 2), Gehirn, Niere und Gefäße, auch lokale Systeme existieren. Diese basieren auf einer im Gewebe stattfindenden Synthese von Ang II sowie dessen direkte Effekte auf zellulärer Ebene, welche unter anderem Zellwachstum und Differenzierung beeinflussen können. Diese parakrinen und autokrinen Wirkungen könnten dabei eine bedeutende

physiologische Rolle bei der Erhaltung der Homöostase innerhalb eines Gewebes spielen.

Des Weiteren gab es Annahmen von intrazellulären oder intrakrinen RAS Wirkungen, welche über eine Bindung von Ang II an Rezeptoren des Zellkerns vermittelt werden (Dzau *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 1992). Allerdings benötigt das Konzept der intrazellulären Ang II Synthese und Funktion weitere Bestätigung.

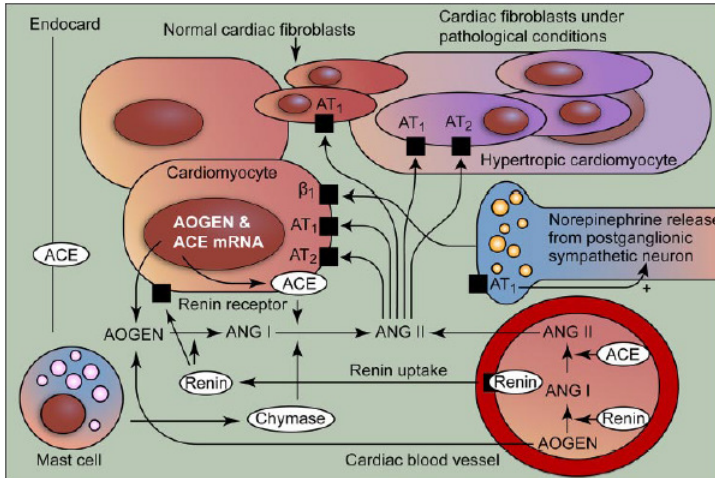


Abbildung 2: Das lokale RAS im Herzen.

Um Ang II im Herzen zu synthetisieren wird Renin und Angiotensinogen (Aogen) aus dem Plasma aufgenommen oder lokal gebildet. Ferner existiert ein alternativer Syntheseweg, der dessen Produktion mittels der in Mastzellen gebildeten Chymase involviert. Ang II übt seine Effekte auf unterschiedlichen Zelltypen des Herzens, wie Kardiomyozyten oder Fibroblasten, aus (Paul *et al.*, 2006).

Somit scheint das zirkulierende RAS vor allem eine Bedeutung für die akute hämodynamische Stabilität zu haben, wohingegen das lokale RAS kritischer für die subakute und chronische Modulation der Hämodynamik zu sein scheint (Stock *et al.*, 1995).

1.1.5. „Outside-in-Signaling“ von ACE

ACE ist ein Ektoenzym, welches vorwiegend in der Plasmamembran von Endothelzellen lokalisiert ist und dort die Umwandlung von Ang I zu Ang II sowie die Inaktivierung von BK katalysiert. Die Hemmung der ACE Aktivität führt unter anderem zu einer verbesserten Endothelfunktion und stimuliert das vaskuläre Remodeling (Schartl *et al.*, 1994; Mancini *et al.*, 1996). Ferner mindert es das Fortschreiten von Arteriosklerose und das Vorkommen von kardiovaskulären Ereignissen im Menschen (Yusuf *et al.*, 2000). Diese positiven Wirkungen der ACE-Hemmer scheinen aber nicht nur auf der Erniedrigung der Ang II Produktion und der Akkumulation von BK zu beruhen (Minshall *et al.*, 1997; Benzing *et al.*, 1999). So ist eine weitere Konsequenz einer Langzeittherapie mit ACE-Hemmern ein Anstieg von ACE selbst.

Kohlstedt *et al.* identifizierte eine ACE-Inhibitor und/oder ACE-Substrat aktivierte Signaltransduktionskaskade in Endothelzellen, welche die Expression von verschiedenen Proteinen beeinflusst (Kohlstedt *et al.*, 2004; Kohlstedt *et al.*, 2005; Kohlstedt *et al.*, 2006). Sie beobachteten, dass die Bindung von ACE-Hemmern sowie auch von BK, nicht aber von Ang I, die ACE-assoziierte Casein Kinase 2 (CK2) aktiviert, welche daraufhin den cytoplasmatischen Serin¹²⁷⁰ - Rest von ACE phosphoryliert (Abbildung 3). Dies wiederum löst eine Aktivierung der Kinase JNK (c-Jun NH₂-terminale Kinase) aus, wahrscheinlich durch die ACE-assoziierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 7 (MKK7). Aktiviertes JNK führt seinerseits zu einer Akkumulation von phosphorylierten c-Jun im Zellkern der Endothelzellen sowie einer Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator Protein-1), einen aus einem c-Jun Homodimer bestehenden Komplex.

Die AP-1 Aktivierung beeinflusst letztendlich die endotheliale Genexpression, in dem es unter anderem die Expression von ACE selbst sowie von der Cyclooxygenase-2 (COX-2) erhöht. Diese Daten stimmen ferner überein mit der Beobachtung bei Patienten, bei denen eine chronische Behandlung mit ACE-Hemmern neben einer Erhöhung von ACE auch eine erhöhte Prostacyclin (PGI₂) Produktion hervorrief. In den Endothelzellen ist PGI₂, welches vasodilatatorische Eigenschaften hat, ein Hauptprodukt der COX-2 Aktivität.

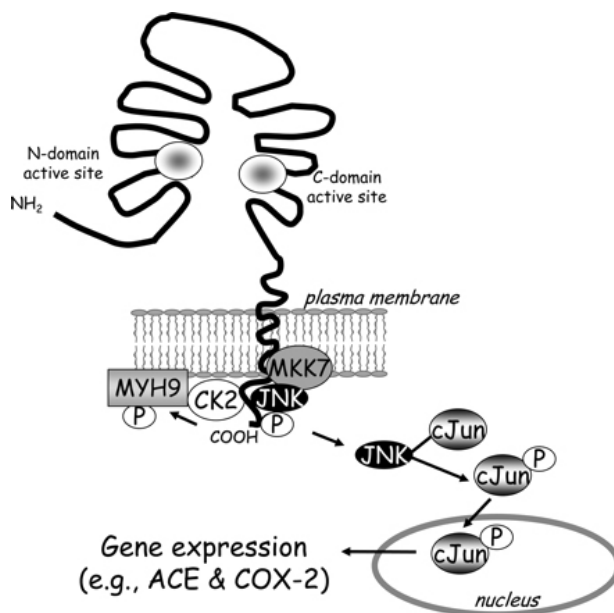


Abbildung 3: „outside-in Signaling“ von ACE.

In den Endothelzellen aktiviert die Bindung von ACE-Inhibitoren und BK an ACE eine Signaltransduktionskaskade, welche die Expression von bestimmten Genen, wie z.B. COX-2 und ACE selbst, reguliert. Diese Kaskade schließt die Aktivierung von CK2, die Phosphorylierung des cytoplasmatischen Serin¹²⁷⁰-Rests von ACE, die Aktivierung von JNK sowie die Akkumulation von c-Jun im Zellkern ein. Ein c-Jun Homodimer bildet den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher die Expression von bestimmten Genen beeinflussen kann. CK2 kann ferner MYH9 (nonmuscle myosin heavy chain IIA) phosphorylieren, welches in der Verankerung von ACE in der Zellmembran / Zytoskelett involviert ist. (Fleming, 2006).

1.2. ACE2 - Das neue Mitglied des RAS Systems

1.2.1. Entdeckung und Struktur von ACE2

ACE2 ist das erste bekannte Homolog von ACE und wurde im Jahre 2000 von einer humanen cDNA Bibliothek des Herzens eines Patienten mit Herzinsuffizienz (Donoghue *et al.*, 2000) sowie aus einer humanen Lymphom cDNA Bibliothek (Tipnis *et al.*, 2000) kloniert. Ferner konnte das Gen, welches sich aus 18 Exons zusammensetzt, auf dem X Chromosom (Xp22) kartiert werden.

ACE2 ist ein 805 Aminosäuren großes Typ-1 Membranprotein, welches ein Molekulargewicht von ~120 kDa besitzt. Die amino-terminale Domäne von ACE2 weist ungefähr 42% Sequenzidentität mit ACE auf und seine zytoplasmatische sowie transmembranäre Domäne zeigt 48% Homologie zu einem erst kürzlich charakterisierten Protein, dem Collectrin. Diese spielt wiederum eine kritische Rolle in der Aminosäuren-Absorption der Niere (Danilczyk *et al.*, 2006; Malakauskas *et al.*, 2007), der Proliferation pankreatischer β -Zellen (Akpinar *et al.*, 2005) und in der Exozytose von Insulin (Fukui *et al.*, 2005) (Abbildung 4).

Überdies ist ACE2 ein Ektoenzym mit einer extrazellulären katalytischen Domäne, welches überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert (Warner *et al.*, 2005) und dadurch befähigt ist, zirkulierende Peptide zu hydrolysieren. Wie ACE (Turner, 2003; Akpinar *et al.*, 2005) ist es aber auch Gegenstand einer juxtamembranären Abspaltung, wobei die katalytisch aktive Ektodomäne in das extrazelluläre Milieu entlassen wird (Lambert *et al.*, 2005). Dieser Prozess wird durch eine Reihe verschiedener Faktoren (u.a. Phorbolster) stimuliert und involviert eine transmembranäre Protease (ADAM17 oder TACE). Ähnlich wie bei ACE, ist die physiologische Rolle der Ektodomänen-Abspaltung von ACE2 noch im Unklaren und die Funktion des zirkulierenden Enzyms wurde noch nicht identifiziert. Es wird aber vermutet, dass die Abspaltung einen Mechanismus zur Regulation der ACE2 Aktivität an der Zelloberfläche darstellt.

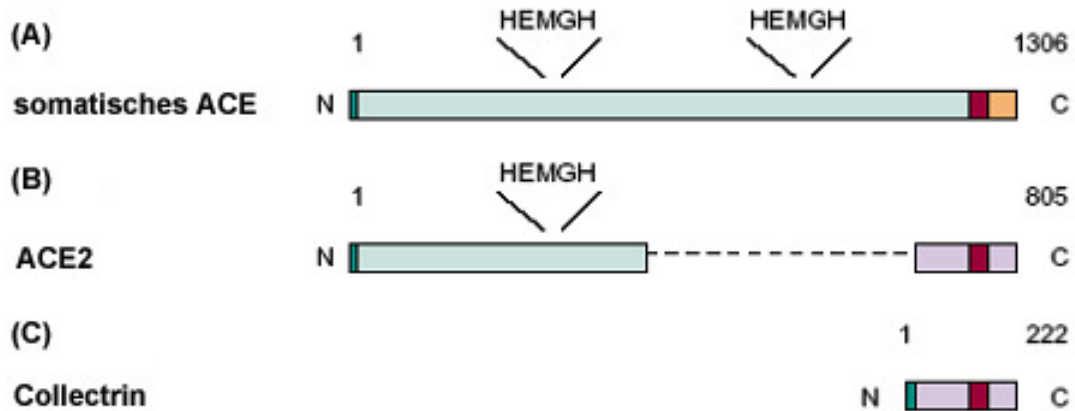


Abbildung 4: Die Domänenstruktur der ACE-Isoformen und der homologen Enzyme von ACE.
 Das somatische ACE (A), das humane ACE-Homolog ACE2 (B) und das ACE2-Homolog Collectrin (C) sind integrale Typ I Membranproteine mit einer N-terminalen Ektodomäne, einer kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne, einem Signalpeptid (grün) und einer Transmembrandomäne (rot). Die Zahlen geben die Aminosäurereste jedes Proteins an. Die ACE-Isoformen sowie auch ACE2 enthalten Zink-bindende Motive (HEMGH), welche die aktiven Zentren des Enzyms bilden (Turner und Hooper, 2002).

1.2.2. Expressionsorte von ACE2

ACE2 ist vorwiegend im Gastrointestinaltrakt, Herz, Niere, Lunge und Hoden exprimiert, wobei es im Herzen hauptsächlich auf das Endothel, in der Niere auf die apikale Oberfläche der tubulären Epithelzellen (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000; Harmer *et al.*, 2002) und im Hoden auf die adulten Leydigzellen (Douglas *et al.*, 2004) beschränkt ist. Des Weiteren findet man ACE2, wie auch ACE, in den Endothelzellen und in den vaskulären glatten Muskelzellen, wobei in letzteren die Expression geringer ist. Mit niedrigerem Expressionsniveau ist ACE2 ferner im Gehirn zu finden (Komatsu *et al.*, 2002).

Darüber hinaus verändert sich die Expressionsstärke von ACE2 unter bestimmten physiologischen bzw. pathophysiologischen Zuständen. So steigt diese zum Beispiel beim Myokardinfarkt in der Infarktzone an, gefolgt von einer Erhöhung der Expression in der Umgebung der ischämischen Zone des Myokards (Burrell *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde eine signifikante Erhöhung der Expression sowie der Aktivität bei Patienten mit Herzinsuffizienz festgestellt (Zisman *et al.*, 2003; Goulter *et al.*, 2004). Ferner findet auch bei Ratten mit Verschluss der Koronararterie und anschließender

Blockade des AT₁-Rezeptors (Ishiyama *et al.*, 2004) sowie nach Behandlung mit einem ACE-Inhibitor eine Hochregulation statt (Ferrario, 2005).

1.2.3. Die Substrate von ACE2

Im Gegensatz zu ACE, besitzt ACE2 nur eine enzymatische aktive Gruppe und fungiert als Carboxypeptidase, wobei es immer nur eine carboxyterminale Aminosäure von einem Peptidsubstrat entfernt (Tipnis *et al.*, 2000).

ACE2, wie auch ACE, gehört zu den Metalloproteasen, welche das Metallion Zink im aktiven Zentrum gebunden haben und für ihre katalytischen Reaktionen benutzen. Zink aktiviert dabei ein Wassermolekül, welches dann als nucleophile Gruppe die Peptidcarbonylgruppe des Substrats angreift. An der Bindung des Zinks ist das HEXXH-Motiv beteiligt (Abbildung 4). In diesem sind zwei konservierte Histidine lokalisiert, welche die Zinkbindung koordinieren. Ferner ist ein Glutamat-Rest, welcher 23 Aminosäuren C-terminal vom HEXXH - Motiv entfernt ist, in der Koordination des Zinkions involviert (Towler *et al.*, 2004; Guy *et al.*, 2005).

Wie bereits erwähnt, degradiert ACE2 innerhalb des RAS zum einen Ang I zu Ang-(1-9), wobei dessen Funktion noch unbekannt ist, und zum anderen Ang II zu Ang-(1-7). Die Affinität von ACE2 für Ang I ist aber, verglichen mit ACE, wesentlich schwächer. Des Weiteren ist die katalytische Effizienz von ACE2 für Ang II 400-fach größer als die für Ang I (Vickers *et al.*, 2002). Das weist daraufhin, dass die vorrangige Rolle von ACE2 die Hemmung der Wirkung von Ang II, durch dessen Inaktivierung sowie durch die gleichzeitige Bildung des Gegenspielers Ang-(1-7), ist (Brosnihan *et al.*, 1998; Leung, 2004).

Neben der Hydrolyse von Angiotensin Peptiden, ist ACE2 auch befähigt verschiedene vasoaktive Peptide anderer Systeme zu spalten. Dazu gehört Apelin-13 und -36, die Kininmetabolite (des-Arg⁹)-Bradykinin und (des-Arg¹⁰)-Kallidin, Neurotensin und das eng verwandte Kinetensin sowie auch opioide Peptide wie Dynorphin A-(1-13) (Vickers *et al.*, 2002). Verglichen mit ACE, hat ACE2 aber keinen Effekt auf BK, was wiederum dessen Substratspezifität unterstreicht.

Viele dieser Substrate sind relevant für die kardiovaskuläre Regulation. Apelin, beispielsweise, wies man ein vasokonstriktorisches sowie inotropes Wirkung nach (Katugampola *et al.*, 2002; Szokodi *et al.*, 2002) und Dynorphin A-(1-13) induziert Hypotonie über die Aktivierung der kardialen und zentralen Opioidrezeptoren (Gautret *et al.*, 1985). Die Kininmetabolite sind Agonisten der B1 Rezeptoren, welche während

Inflammation und Gewebeverletzung aktiviert werden (Duka *et al.*, 2001; Kakoki *et al.*, 2007). Man nimmt an, dass sie dabei ähnliche hämodynamische Eigenschaften wie B2 Rezeptoren ausüben (z.B. Vasorelaxation).

1.2.4. Physiologische und pathophysiologische Rolle von ACE2

1.2.4.1. ACE2 und der Blutdruck

Mehrere Beobachtungen deuten auf eine Rolle von ACE2 in der Regulation des systemischen Blutdrucks hin. So stellte man eine umgekehrte Korrelation der ACE2 mRNA sowie des Proteinspiegels mit dem Auftreten von erhöhtem Blutdruck fest. In verschiedenen Rattenstämmen mit Hypertonie, wie SHR (spontan hypertensive Ratten), SHRSP (spontan hypertensive Ratten mit Neigung zum Schlaganfall) oder Sabra (salzsensitive Ratten mit Neigung zur Hypertonie) Ratten, wurde das ACE2-Gen, welches sich auf dem X-Chromosom befindet, zu einem quantitativen Merkmalslokus (quantitative trait locus, QTL) kartiert. Damit wird ein Abschnitt eines Chromosoms bezeichnet, für den in entsprechenden Studien ein Einfluss auf die Ausprägung eines quantitativen phänotypischen Merkmals des betreffenden Organismus nachgewiesen wurde. Des Weiteren konnte in diesen Rattenmodellen eine reduzierte ACE2 Transkription sowie Protein Expression nachgewiesen werden. Diese Daten zusammen mit der Beobachtung, dass ACE2 eine starke Expression in Herz und Niere aufweist, welches Organe sind, die an der Steuerung des Blutdrucks teilnehmen, stellen ein Indiz für die Beteiligung von ACE2 an der Blutdruckregulation dar.

Bei Untersuchungen von Tiermodellen mit Deletion des ACE2 Gens erhielt man aber sehr widersprüchliche Ergebnisse. So wiesen die ersten ACE2 knock-out Mäuse, trotz eindeutigem Anstieg von Ang II, keinen erhöhten Blutdruck auf (Crackower *et al.*, 2002). Gurley *et al.* zeigte dagegen, dass der Verlust dieser Carboxypeptidase in seinem Mausmodell zu einer erhöhten Empfänglichkeit für eine Ang II -induzierte Hypertonie führt (Gurley *et al.*, 2006). Bei den ersten Modellmäusen wurde daher das Auftreten redundanter kompensatorischer Mechanismen während der Entwicklung angenommen. Ferner wird vermutet, da die essentielle Hypertonie eine multifaktoriell bedingte Erkrankung ist, dass möglicherweise der Verlust von ACE2 eher einen prädisponierenden als einen verursachenden Faktor darstellt.

Der Stellenwert von ACE2 bei der Entwicklung der arteriellen Hypertonie sowie deren Folgeerkrankungen ist somit noch nicht genau geklärt und erfordert weitere Untersuchungen.

1.2.4.2. Rolle von ACE2 im Herzen

Die hohe Expression von ACE2 im Herzen sowie die Fähigkeit zur Hydrolyse von Angiotensin-Peptiden ließ von Anfang an vermuten, dass dieses Enzym eine Rolle in der kardiovaskulären Physiologie spielt. Dies konnte dann auch experimentell bestätigt werden. Crackower *et al.* zeigte, dass die Deletion von ACE2 in Mäusen eine Reduktion der kardialen Kontraktilität hervorruft, welche mit dem Alter fortschreitet (Crackower *et al.*, 2002). Interessanterweise führte der Verlust von ACE2 in diesem Modell aber nicht zu weiteren kardialen Abnormalitäten, wie z.B. kardiale Hypertrophie oder Fibrose. Hingegen konnte in einem anderen ACE2 knock-out Modell keine Veränderungen der Herzfunktion sowie der Herzmorphologie entdeckt werden (Yamamoto *et al.*, 2006). Diese Tiere zeigten aber eine beschleunigte Entwicklung einer kardialen Hypertrophie mit einer Reduktion der Kontraktilität sowie einer Dilatation des linken Ventrikels in Reaktion auf eine chronische Druckbelastung, welche durch eine Aortenkonstriktion ausgelöst wurde. Dabei ist hinzuzufügen, dass beide Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Mausstämmen gearbeitet haben, was eine mögliche Erklärung für die beobachteten phänotypischen Unterschiede sein könnte. In beiden Modellen führte aber der ACE2 Verlust zu einem Anstieg der Ang II Konzentration sowie einer Hochregulation von Hypoxie-induzierten Genen. Die Beeinflussung der Herzfunktion, spontan oder mittels Druckbelastung induziert, scheint demzufolge mit der Akkumulation von Ang II verbunden zu sein (Oudit *et al.*, 2006). Im ersten ACE2 knock-out Modell konnte ferner durch eine zusätzliche Deletion von ACE die kardiale Dysfunktion komplett aufgehoben werden, wobei dies mit einem Absinken der Ang II Konzentration einherging (Crackower *et al.*, 2002). Des Weiteren beobachtete man im zweiten Modell nach Hemmung des AT₁-Rezeptors eine Abschwächung der Hypertrophie-Entwicklung. Die bisherigen Daten deuten somit an, dass die Rolle von ACE2 in der Gegenwirkung der Ang II Effekte liegt.

Widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Funktion von ACE2 erhielt man auch bei Tieren mit genetischer Überexpression dieser Carboxypeptidase. Interessanterweise zeigte das erste beschriebene Modell mit ACE2 Überexpression keinen Beweis eines positiven Einflusses. Die Überexpression verursachte hingegen in den kardialen Myozyten Störungen in der Erregungsleitung, welches bei den Mäusen zu Herzstillstand und plötzlichem Tod führen konnte (Donoghue *et al.*, 2003). Der Schweregrad des Phänotyps korrelierte dabei mit der Stärke der ACE2 Expression und war mit einer Reduktion von Connexin 43 verbunden. Ein zweites Modell mit Überexpression von

ACE2 im Herzen stimmte wiederum mit der Hypothese einer positiven Wirkung von ACE2 überein. Diese Ratten waren gegenüber Ang II -induzierter Bildung kardialer Hypertrophie und Fibrose geschützt (Huentelman *et al.*, 2005).

Diese widersprüchlichen Daten deuten daraufhin, dass die Rolle von ACE2 im kardiovaskulären System sehr komplex zu sein scheint. Man nimmt aber an, dass für eine normale Herzfunktion das Vorhandensein eines Gleichgewichts zwischen ACE und ACE2 notwendig ist (Abbildung 5). Darauf deuten unter anderem auch die Veränderungen der ACE2 Expression unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen hin (Zisman *et al.*, 2003).

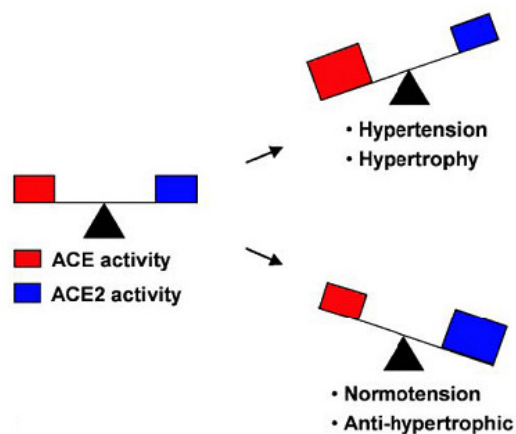


Abbildung 5: Modulation der enzymatischen Aktivität von ACE und ACE2 und deren zelluläre und physiologische Folgen (Der Sarkissian *et al.*, 2006).

1.2.4.3. Rolle von ACE2 in der Niere

Das RAS ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der renalen Struktur und Funktion. Ferner spielt es eine Rolle in der Pathophysiologie von Nierenerkrankungen. In klinischen Studien konnte man zeigen, dass eine Blockade des RAS mithilfe von ACE Hemmern oder AT₁-Rezeptorblockern das Fortschreiten von chronischen Nierenerkrankungen eingrenzt (Lewis *et al.*, 1993; Taal *et al.*, 2000; Brenner *et al.*, 2001; Taal *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden bei Menschen mit Nierenerkrankungen erhöhte Ang II Konzentrationen nachgewiesen (Mezzano *et al.*, 2001).

ACE2 wird auf der luminalen Oberfläche der proximalen und distalen Tubuli und weniger stark auch in den Glomeruli exprimiert (Li *et al.*, 2005a; Warner *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2006). Somit zeigt es ein ähnliches Expressionsmuster wie ACE und könnte

daher auch eine wichtige Rolle in der Regulation der interstitiellen Angiotensin Konzentrationen spielen. Ferner fand man eine krankheitsbedingte Regulierung der ACE2 Expression. So entdeckte man in den Nieren von jungen Mäusen mit Diabetes erhöhte ACE2 Konzentrationen, wobei diese gleichzeitig auch eine Reduktion der ACE Expression aufwiesen (Ye *et al.*, 2004; Wysocki *et al.*, 2006). Eine andere Studie wiederum zeigte merklich reduzierte ACE2 Konzentrationen nach experimentell ausgelöster diabetischer Nephropathie, wobei hier ältere Tiere verwendet wurden (Tikellis *et al.*, 2003). Daher wird vermutet, dass ACE2 eine protektive Wirkung in den frühen Phasen der Erkrankung ausübt, dass aber ein späterer Abfall seiner Expression wieder einen Anstieg der Ang II Konzentrationen auslöst und somit zu der Entwicklung einer Nephropathie führt. Diese Vermutung wird zum Teil auch durch die Beobachtung gestützt, dass männliche ACE2 defiziente Mäuse im fortgeschrittenen Alter eine Ang II abhängige Glomerulosklerose entwickeln (Oudit *et al.*, 2006).

Eine weitere Rolle spielt ACE2 wahrscheinlich in der Schwangerschaft. Man hat bei trächtigen Ratten erhöhte ACE2 sowie Ang-(1-7) Konzentrationen festgestellt, was möglicherweise einen Schutzmechanismus darstellt, um den Effekten von Bluthochdruck in den Nieren während der Schwangerschaft vorzubeugen (Brosnihan *et al.*, 2003).

1.2.4.4. Die Wirkung von ACE2 in der Leber

Oft wurde gezeigt, dass das RAS an fibrotischen Prozessen beteiligt ist und Ang II über seinen AT₁-Rezeptor profibrotische sowie mitogene Effekte ausübt (Weber *et al.*, 1999; Unger, 2002; Yu *et al.*, 2002). So konnte auch eine Beteiligung des RAS oder vielmehr der Ang II Wirkung an der Entstehung von Leberfibrose gezeigt werden (Jonsson *et al.*, 2001; Yoshiji *et al.*, 2001; Paizis *et al.*, 2002).

Aber nicht nur Ang II scheint eine wichtige Rolle in der Entstehung von Leberfibrose zu spielen sondern auch ACE2 bzw. Ang-(1-7). Paizis *et al.* stellte nach einer Ligation des Gallenganges in Ratten sowie in der zirrhotischen Leber von Menschen eine Erhöhung der ACE2 Konzentration fest, wobei dies vor allem in Zellen mit niedrigerer Sauerstoff-Exposition deutlich war (Paizis *et al.*, 2005). Ähnliches fand man auch in Studien über myokardiale Ischämie (Kittleson *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass diese Carboxypeptidase einen protektiven Effekt bei Gewebeverletzung ausübt. Dabei scheint ACE2 eine lokale Sauerstoffanreicherung zu verursachen, in dem es der Ang II vermittelten Vasokonstriktion entgegenwirkt. Diese Hypothese konnte durch eine

neuere Studie von Herath *et al.* gefestigt werden. In dieser beobachtete man, dass der Anstieg der ACE2 Konzentration nach einer Gallengangsligation mit einer Erhöhung der Ang-(1-7) Konzentration und seines Rezeptors Mas einhergeht (Herath *et al.*, 2007).

1.2.4.5. Die Rolle von ACE2 in der Lunge

Bei ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) handelt es sich um ein akutes progressives Lungenversagen, welches durch eine Reihe verschiedener Faktoren, wie z.B. saure Aspiration, peritoneale Sepsis oder akute Pankreatitis, ausgelöst werden kann. Diese Erkrankung bringt eine hohe Mortalitätsrate durch die Ausbildung von Lungenödem, Inflammation und Hypoxie mit sich.

Bei ACE2 knock-out Mäusen, in denen man experimentell ARDS auslöste, beobachtete man einen schwereren Krankheitsverlauf als bei den Wildtypen (Kuba *et al.*, 2005). Dieser Effekt konnte mittels Behandlung mit rekombinanten ACE2 Protein oder einer zusätzlichen Deletion des ACE Gens wieder aufgehoben werden. Ferner zeigte die Behandlung der ACE2 knock-out Mäuse mit AT₁-Rezeptor-Antagonisten positive Effekte, was auf eine Beteiligung von Ang II im Fortschreiten von ARDS deutet. Somit kann ACE2 über die Metabolisierung von Ang II eine protektive Wirkung ausüben.

Im Jahre 2003 wurde ferner die Entdeckung gemacht, dass ACE2 ein Rezeptor für den Erreger des schweren akuten Atemwegssyndroms (SARS; Severe Acute Respiratory Syndrome) ist, dem SARS Coronavirus (SARS-CoV) (Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005b) (Abbildung 6). Infizierte Individuen weisen eine hohe Mortalitätsrate (ungefähr 10 %) auf, welche auf die Entwicklung einer atypischen Pneumonie und einem oft nachfolgenden Lungenversagen zurückzuführen ist (Ware *et al.*, 2000).

Eine Infektion von Mäusen mit SARS resultierte in einer Erniedrigung von ACE2 und einer gleichzeitigen Erhöhung von Ang II (Kuba *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde eine verstärkte Lungenschädigung festgestellt, welche wiederum mit der Gabe von AT₁-Antagonisten verbessert werden konnte. Diese Erniedrigung von ACE2 und die damit einhergehende Verschlechterung der Erkrankung könnte somit eine wichtige Ursache an der hohen Sterberate durch SARS sein.

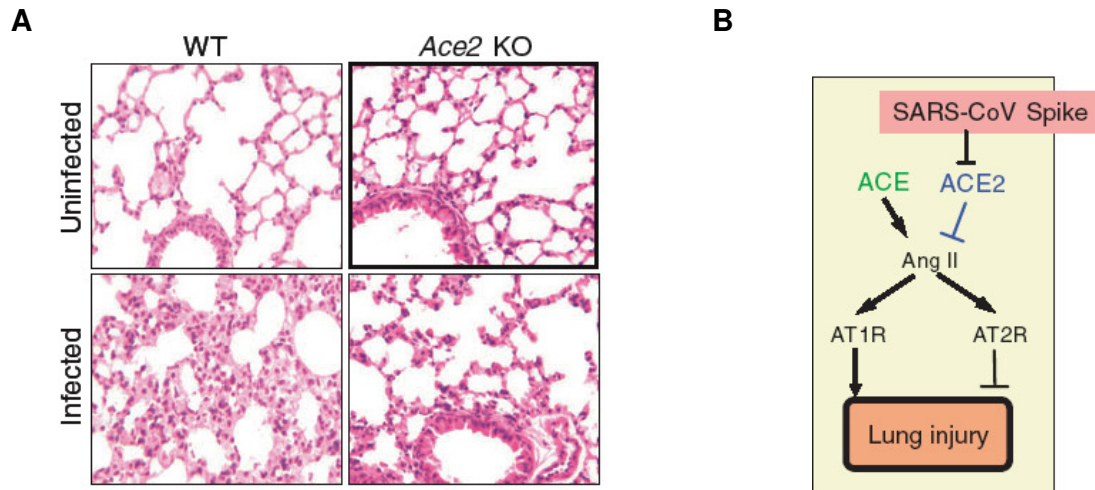


Abbildung 6: ACE2 ist ein entscheidender Rezeptor für die SARS-CoV Infektion *in vivo*.

(A) Lungen Histopathologie und (B) schematische Darstellung der RAS Wirkung bei akutem Lungenversagen nach einer SARS-CoV Infektion (Kuba *et al.*, 2005).

1.3. Ang-(1-7) - Der neue Gegenspieler von Ang II im RAS

Lange Zeit herrschte Skepsis bezüglich der Funktion des Heptapeptids Ang-(1-7). Dies hat sich aber nach der Identifizierung von ACE2 und dem Ang-(1-7) Rezeptor Mas geändert. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass sich Ang-(1-7) den klassischen RAS - Effekten entgegenstellt, in dem es den vaskulären und proliferativen Effekten von Ang II entgegenwirkt (Yamamoto *et al.*, 1992; Ferrario *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005b; Santos *et al.*, 2007).

1.3.1. Rolle von Ang-(1-7) im Gefäßsystem

Die wesentlichen Wirkungen des Heptapeptids beinhalten die Aktivierung peripherer Mechanismen zur Auslösung einer Vasodilatation sowie das Ausüben antiproliferativer Effekte. Dabei stellt das Endothelium ein Hauptziel dar. Es wurde gezeigt, dass das Heptapeptid eine vasodilatatorische Aktivität unter anderem in den Koronararterien von Hund und Schwein, in Aorten von Ratten sowie renalen Arteriolen von Kaninchen auslöst (le Tran *et al.*, 1997; Ren *et al.*, 2002; Sampaio *et al.*, 2003). Hingegen erhielt man widersprüchliche Ergebnisse bei Versuchen am Menschen (Davie *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2001). So stellte man fest, dass die Gabe hoher Ang-(1-7) Dosen sogar die Auslösung einer leichten Vasokonstriktion hervorrufen kann, die wahrscheinlich aus

einer schwachen Bindung an den AT₁-Rezeptor resultiert. Eine Gabe physiologischer Ang-(1-7) Dosen führt aber prinzipiell zu einem Effekt, welcher der Vasokonstriktion von Ang II entgegenwirkt (Ueda *et al.*, 2000).

Die durch Ang-(1-7) vermittelte endothelabhängige Dilatation scheint vor allem durch die Freisetzung von NO hervorgerufen zu werden. Sampaio *et al.* berichtete, dass eine koordinierte Stimulation der eNOS (endotheliale NO-Synthase) Aktivität sowie die Aktivierung der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) - Akt Signaltransduktionskaskade dabei involviert ist (Sampaio *et al.*, 2007) (Abbildung 7).

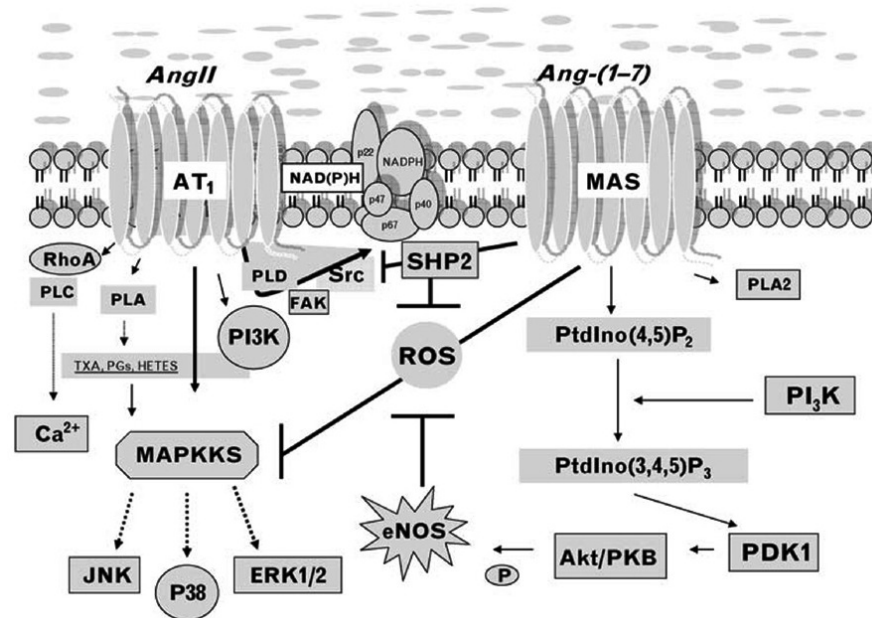


Abbildung 7: Vermutete Signaltransduktionswege, welche durch die Bindung von Ang-(1-7) an Mas ausgelöst werden. eNOS, endotheliale NO-Synthase; ERK, extrazellulär Signal-regulierte Kinase; JNK, c-Jun N-terminale Kinase; PDK1, Phosphoinosit-abhängige Proteinkinase 1; PI3K, Phosphatidylinositol 3 Kinase; MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; PKB, Proteinkinase B; ROS, reaktive Sauerstoffspezies (Santos and Ferreira, 2007).

Aber auch andere vasorelaxierende Substanzen, wie Prostaglandin und EDRF (endothelium-derived relaxing factor), sowie die Verstärkung der BK Wirkung scheinen an den Effekten des Heptapeptids beteiligt zu sein (Ferreira *et al.*, 2005; Ferrario *et al.*, 2006). So kann Ang-(1-7) die vasodilatatorische Wirkung von BK potenzieren, wobei vor allem Prostaglandine involviert sind (Almeida *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2005).

Eine weitere, bis jetzt noch ungeklärte Frage ist, ob andere Rezeptoren neben Mas an dem Vasorelaxationseffekt von Ang-(1-7) beteiligt sind. Beobachtungen, dass unter bestimmten Umständen die Wirkung auf die Blutgefäße nicht durch den Mas-Antagonisten A-779 gehemmt werden können, führten zu der Annahme, dass ein noch unbekannter Ang-(1-7) Rezeptor hierbei eine Rolle spielt. Ferner wird auch über einen Crosstalk bzw. eine Dimerisierung von Mas mit dem AT₁-, AT₂- oder den Bradykinin B₂-Rezeptor diskutiert (Castro *et al.*, 2005; Kostenis *et al.*, 2005).

Als weitere Eigenschaft von Ang-(1-7) im Gefäßsystem ist seine antiproliferative Wirkung zu nennen, welche zuerst in den vaskulären glatten Muskelzellen beobachtet werden konnte (Tallant *et al.*, 1999). Ferner hemmt es das Wachstum der Neointima, welches durch Ballondilatation oder Stentimplantation hervorgerufen wird (Freeman *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 2000; Langeveld *et al.*, 2005). An der Inhibition des vaskulären Wachstums via Ang-(1-7) ist die Freilassung von Prostacyclin, die darüber vermittelte Produktion von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und eine nachfolgende Reduktion der Ang II stimulierten ERK-1/2 (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase) Aktivität beteiligt (Zhong *et al.*, 2001; Tallant *et al.*, 2003).

1.3.2. Ang-(1-7) und die Herzfunktion

Den größten Fortschritt im Verständnis der pathophysiologischen Rolle von Ang-(1-7) hat man in Bezug auf die Herzfunktion gemacht. Im Gegensatz zu Ang II übt das Heptapeptid eine kardioprotektive Rolle aus (Carey and Siragy, 2003; Santos *et al.*, 2005a) und diese scheint unabhängig vom Blutdruck zu sein, welches in vitro (Iwata *et al.*, 2005; Tallant *et al.*, 2005) sowie Versuche in Tiermodellen zeigen konnten (Santos *et al.*, 2004; Grobe *et al.*, 2006; Grobe *et al.*, 2007). So demonstrierte Grobe *et al.*, dass eine chronische Infusion von Ang-(1-7) die Fibrosebildung unterdrückt, welche durch Ang II oder DOCA (Deoxycorticosteron Acetate) -Salz Behandlung induziert wurde. Überdies zeigten Mäuse mit einer Deletion von Mas eine Beeinflussung der Herzfunktion sowie eine Veränderung der extrazellulären Matrix in Richtung eines profibrotischen Stadiums (Santos *et al.*, 2006).

Des Weiteren konnte ein Mas - vermittelter antihypertropher Effekt von Ang-(1-7) in Kardiomyozyten von Ratten sowie antiarrhythmogene Wirkungen nachgewiesen werden (Ferreira *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004; Tallant *et al.*, 2005). Nennenswert ist ferner, dass das Heptapeptid zu einer Erniedrigung der kardialen Ang II Konzentration führt (Mendes *et al.*, 2005).

1.3.3. Ang-(1-7) und die Nierenfunktion

Ang-(1-7) spielt ferner eine Rolle in der Nierenfunktion, einem Organ, welches eng mit der Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten verbunden ist. So entsprechen die Konzentrationen des Heptapeptids in der Niere denen von Ang II (Pendergrass *et al.*, 2006). Dennoch sind die bisher beobachteten Effekte aber sehr widersprüchlich. Eine Überexpression von Ang-(1-7) sowie die Gabe des Heptapeptids nach einer akuten Volumenbelastung löste bei den Ratten einen antidiuretischen Effekt aus (Magaldi *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu konnte in isolierten Nierenpräparationen sowie in anästhesierten Tieren eine Diurese beobachtet werden (DelliPizzi *et al.*, 1994). Die bisherigen Daten sind somit sehr gegensätzlich und daher erfordert es weitere Untersuchungen, um die Rolle von Ang- (1-7) in der Wasser- und Salzausscheidung zu klären.

1.4. Modulation von ACE2 und Ang-(1-7) durch Anti-RAS Medikamente

Medikamente, welche die Bildung sowie die Effekte von Ang II blockieren, wie ACE Hemmer und AT₁-Rezeptor Antagonisten, spielen in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen eine große Rolle. Dabei deuten Experimente in Tiermodellen an, dass an deren positiven Effekten ACE2 und das Heptapeptid Ang-(1-7) beteiligt sind. So stellte man nach der Gabe von AT₁-Rezeptorblockern oder ACE Hemmern eine Erhöhung der ACE2 mRNA Expression sowie der Ang-(1-7) Konzentration im Herzen und in der Aorta fest (Ishiyama *et al.*, 2004; Ferrario *et al.*, 2005; Igase *et al.*, 2005). Ferner wird durch die gleichzeitige Gabe eines Mas Antagonisten deren Wirkung minimiert (Burnier, 2000; Zaman *et al.*, 2002). Des Weiteren fand man nach einer Hemmung des AT₁-Rezeptors eine Erhöhung der Ang II Konzentration (Gottlieb *et al.*, 1993), wobei dies durch die Blockierung seines Rezeptors auch positive Effekte zu Folge haben könnte. So könnte dies zu einer selektiven Stimulation des AT₂-Rezeptors oder eine beschleunigte Umwandlung von Ang II zu Ang-(1-7) nach sich ziehen (Iyer *et al.*, 1998).

Somit scheinen die Vorzüge der Behandlung mit AT₁-Rezeptor Antagonisten oder ACE Hemmern jenseits der direkten Suppression der Ang II Synthese bzw. Aktivität zu liegen. Die Erhöhung der „guten“ RAS Komponenten, wie Ang-(1-7), stellt daher eine alternative oder ergänzende therapeutische Methode dar.

1.5. Tiermodelle in der kardiovaskulären Forschung

Tierexperimentelle Analysen sind in Bezug auf eine Blutdruckuntersuchung sowie im Hinblick auf die Aufdeckung genetischer Mechanismen unverzichtbar. So hat sich das Wissen über die Physiologie sowie Pathophysiologie der Blutdruckregulation in den vergangenen Jahrzehnten mithilfe dieser Untersuchungen maßgeblich erweitert. Die Etablierung von Inzuchtstämmen sowie die Transgen-Technologie trug dazu beträchtlich bei. Letztere kann in vielen Tierspezies eingesetzt werden, fand aber lange Zeit hauptsächlich bei Mäusen Anwendung. Die Maus als Modell ist aber nicht immer geeignet, da für zahlreiche Phänotypen die Charakterisierung in Mäusen technisch nur sehr schwer durchführbar ist. Vor allem in der kardiovaskulären Forschung bietet die Ratte wegen ihrer Größe einige Vorteile. So ist die Technologie der integrativen Physiologie im Rattenmodell weit verbreitet. Darüber hinaus existieren gut charakterisierte Inzuchtstämme für die essentielle Hypertonie in Ratten. Mäuse mit genetisch bedingter Hypertonie wurden dagegen nur in Einzelfällen beschrieben. Ferner ist die Vielzahl an etablierten hypertensiven Rattenmodellen repräsentativ für die Heterogenität der essentiellen Hypertonie im Menschen (Rubattu *et al.*, 1995).

1.5.1. Tiermodelle für essentielle Hypertonie

Die Hypertonie beim Menschen ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der man zwischen einer primären und einer sekundären Hypertonie unterscheidet. Unter der primären oder essentiellen Hypertonie versteht man die Formen, deren zugrunde liegenden Pathomechanismen noch nicht diagnostiziert sind. Daher kann bei den Patienten nur eine symptomatische Behandlung vorgenommen werden. Diese Art der Hypertonie macht 90-95 % der Fälle aus.

Dagegen tritt die sekundäre Hypertonie als Folge einer anderen Grunderkrankung auf oder wird durch einen bestimmten, nachweisbaren Faktor, wie z.B. ein Medikament, ausgelöst. Daher kann diese meist durch eine rechtzeitige Behandlung der Ursache behoben werden. Letztere Form der Hypertonie liegt jedoch nur in 5-10 % der Fälle vor. Um nun die Ursachen der essentiellen Hypertonie näher zu charakterisieren und vor allem die verantwortlichen Gene zu identifizieren, haben Forscher Ratten mit einem hohen Blutdruck selektiert und untereinander gepaart, um einen Inzuchtstamm zu erhalten. Die Züchtung erfolgte über mehrere Generationen hinweg, um eine genetische Heterogenität zu vermeiden. So ist eine genetische Homogenität, also die

Homozygotie in allen Loci, eine wichtige Voraussetzung für die Identifikation genetischer Faktoren.

Zu diesen Inzucht-Rattenstämme mit Hypertonie gehören unter anderem die SHR, SHRSP, die DOCA-Salz sensitiven Sabra Ratten und die Salz-sensitiven Dahl-Ratten (Rapp, 2000). Die beiden letzteren Inzuchtstämme wurden aufgrund der Hypertonieentwicklung nach Salzaufnahme selektiert und nachfolgend gezüchtet (Dahl *et al.*, 1962; Ben-Ishay *et al.*, 1972). Dagegen gehen die SHR Ratten auf eine spontane Entwicklung eines hohen Blutdrucks in Wistar-Kyoto Ratten (WKY) zurück, wobei weder die Ernährung noch andere Umweltstimuli Einfluss darauf hatten (Okamoto *et al.*, 1963). Die SHRSP Ratten sind wiederum als Unterstamm aus den SHR Ratten hervorgegangen, wobei diese, neben einer Hypertonie, eine Anfälligkeit für das Auftreten von cerebrovaskulären Infarkten oder Hämorrhagien aufwiesen (Okamoto *et al.*, 1973; Yamori, 1991). Obgleich ein hoher Blutdruck sicherlich zu den kausalen Faktoren für die Induktion eines Schlaganfalls gehört, so scheinen doch noch andere genetische Faktoren hierbei involviert zu sein.

SHR sowie SHRSP Ratten zeigen einen frühzeitigen steilen Anstieg des Blutdrucks, der sich dann nach 3-4 Monaten manifestiert und eine schwere Vaskulopathie hervorruft. Aufgrund der Hypertonie sowie möglicher lokaler Wirkungen von vasoaktiven Substanzen kommt es ferner zu etlichen Endorganschäden, wie eine vaskuläre und kardiale Hypertrophie, Myokardfibrose und Glomerulosklerose (Kashgarian, 1985; Devlin *et al.*, 1995). Dabei scheinen an deren Ausprägung unter anderem freigesetzte Sauerstoffradikale eine bedeutende Rolle zu spielen (Torii *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde die Beteiligung verschiedener Gene an der Pathogenese dieser Tiermodelle diskutiert. So wurden Konzentrationsveränderungen von verschiedenen vaskulären Faktoren beschrieben, einschließlich den Komponenten des RAS, der Katecholamine und von Vasopressin (Lang *et al.*, 1981; Morris *et al.*, 1981). Ferner zeigten diese Ratten eine erhöhte Expression von Remodeling-assoziierten Genen, wie TGF β_1 (transforming growth factor- β_1) und Collagen (Kim *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1996). Überdies wurde die Beteiligung des Endothelinsystems in der Pathogenese dieser hypertensiven Ratten diskutiert. So fand man eine höhere Expression des Vasokonstriktors Endothelin-1 (ET-1) in den SHRSP Ratten sowie eine Verbesserung der Pathophysiologie nach einer Langzeitgabe von Endothelin-Rezeptorantagonisten (Jesmin *et al.*, 2004). Eine weitere Rolle scheint ferner die Expression verschiedener Rezeptoren zu spielen. So wurde eine erniedrigte Expression

des AT₂-Rezeptors festgestellt, was wiederum in einer übermäßigen Reaktion von Ang II auf den AT₁-Rezeptor resultieren könnte (Hein *et al.*, 1995; Ichiki *et al.*, 1995). Seit der Identifikation von ACE2 durch Crackower *et al.* bzw. Tipnis *et al.* sowie der fortschreitenden Charakterisierung seiner Funktionen stieg auch das Interesse dieser Carboxypeptidase an der Pathogenese dieser hypertensiven Tiermodelle (Tipnis *et al.*, 2000; Crackower *et al.*, 2002). Hervorgerufen wurde dies vor allem durch die Identifizierung des ACE2-Gens in einem QTL für Hypertonie in verschiedenen hypertensiven Tiermodellen.

1.5.2. Generierung transgener Ratten mittels pronukleärer Mikroinjektion

Einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der Funktion von Genen *in vivo* können transgene Tiermodelle leisten. In diesen kann ein Gen gezielt ausgeschaltet oder durch zusätzliche Kopien dessen Expression verstärkt werden, wobei dies eine genetische Manipulation der Keimbahn mit sich bringt. Ein besonderer Vorteil von solchen *in vivo* Modellen stellt die Möglichkeit der Untersuchung komplexer Regulationssysteme und insbesondere der kompensatorischen Mechanismen dar.

Die vorwiegend verwendete Methode zur Herstellung transgener Tiere ist die Mikroinjektion von DNA-Konstrukten in den paternalen Pronukleus einer befruchteten Oozyte (Rulicke *et al.*, 2000; Wall, 2001; Popova *et al.*, 2004) (Abbildung 8). Diese werden nach der Injektion wieder in den Uterus scheinchwangerer Ammenmütter implantiert und von diesen ausgetragen. Die Nachkommenschaft kann dann mittels PCR oder Southern Blot Analyse der DNA, welche man gewöhnlich aus Schwanz- oder Ohrbiopsien isoliert, auf die Gegenwart des Transgens getestet werden. In der Regel haben etwa 10 % der Nachkommen das Transgen in ihr Genom eingebaut und geben es an ihre Nachkommen weiter. Dabei werden oft mehrere Kopien der Konstrukt-DNA, sogenannte Konkatemere, in ein Chromosom integriert. Demzufolge ist die Expression des Transgens nicht nur von der chromosomalen Umgebung der Einbaustelle sondern auch von der eingebauten Kopienzahl abhängig.

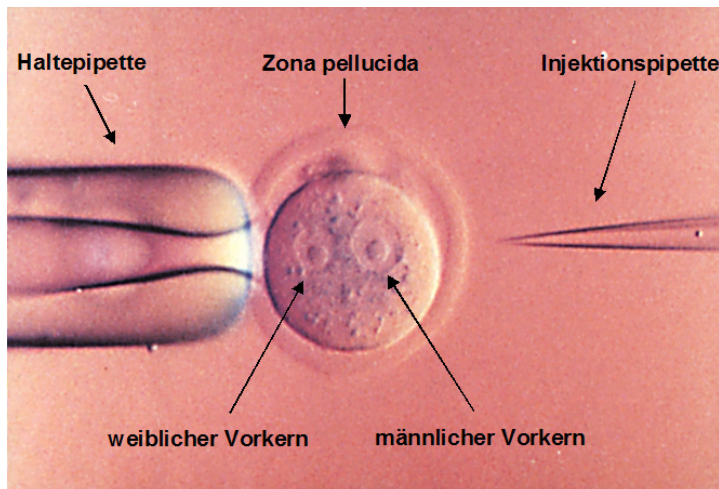


Abbildung 8: Pronukleäre Mikroinjektion.

Einbringen eines zusätzlichen Gens in das Genom durch Mikroinjektion. Die Konstrukt-DNA wird dabei mittels der Injektionspipette meist in den größeren männlichen Vorkern injiziert.

Diese Methode ermöglicht sowohl die Überexpression vorhandener als auch das Einbringen neuer Genprodukte in den Organismus. Dabei kann man einerseits die spezifischen regulatorischen Elemente des Gens selbst benutzen. Damit erreicht man eine erhöhte Expression in den üblichen Organen bzw. Zelltypen des Gens. Andererseits kann man aber auch gewebespezifische Promotoren verwenden, um die Überexpression des Transgens nur in einem bestimmten Organ bzw. Zelltyp zu induzieren.

1.6. Zielsetzung

In den letzten Jahren hat sich die Ansicht des RAS grundlegend geändert. Dazu beigetragen hat vor allem die Erkenntnis, dass außer dem Vasokonstriktor Ang II auch andere Angiotensin-Peptide, wie z.B. Ang-(1-7), eine Rolle spielen. Dieses Heptapeptid scheint dem Ang II entgegengesetzte Effekte auszulösen. Eine weitere entscheidende Rolle spielte die Identifizierung der Carboxypeptidase ACE2, welche maßgeblich an der Produktion von Ang-(1-7) beteiligt ist.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte nun die physiologische Relevanz von ACE2 und Ang-(1-7) in der Gefäßwand genauer untersucht werden. Das Hauptziel bestand dabei in der Identifizierung der Rolle von ACE2 in der Pathophysiologie der SHRSP Ratten. Dafür wurden transgene SHRSP Ratten mit einer Überexpression von ACE2 in den vaskulären glatten Muskelzellen näher charakterisiert. Des Weiteren sollte ein transgenes Rattenmodell generiert werden, in welchem die glatten Muskelzellen chronisch das Peptid Ang-(1-7) sekretieren. Dieses Tiermodell sollte helfen die Rolle von Ang-(1-7) näher zu charakterisieren, da man bei einer ACE2 Überexpression nicht eindeutig zeigen kann, welche der beobachteten Effekte auf eine Erhöhung der Ang-(1-7) Konzentration oder auf einen Abbau von Ang II zurückgehen.

Ein weiteres Teilprojekt bestand in der Etablierung einer Methode zur Verbesserung der gewebsspezifischen Überexpression eines Transgens in Ratten, wobei hier eine spezifische Expression in glatten Muskelzellen angestrebt wurde. Hierbei sollte das Cre-loxP System verwendet werden.

Ein weiteres Teilprojekt, welches in Kooperation mit einer anderen Gruppe durchgeführt wurde, bestand in der näheren Charakterisierung der erst kürzlich entdeckten Rezeptor-ähnlichen Funktion von ACE. Dabei sollte zum einen untersucht werden, welche katalytische Domäne in dieser Funktion involviert ist. Zum anderen sollten weitere Liganden identifiziert werden, wobei insbesondere die Rolle von Ang-(1-7) als möglicher Agonist untersucht wurde.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Feinchemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller, Standort
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acetylcholin (ACh)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid-/Bisacrylamid 19:1	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-/Bisacrylamid 37,5:1	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Gibco
Ang I und Ang II Standard (für RIA)	Bachem, Weil am Rhein
Ang I und Ang II Tracer (für RIA) (¹²⁵ I-Tyr4-Angiotensin I bzw. ¹²⁵ I-Tyr4-Angiotensin II)	NEN
Azophloxin	Fluka Basel
verschiedene anorganische Salze	Sigma, Merck
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS (Ammoniumpersulphat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bactoagar	Difco Microbiology
Bactotrypton	Difco Microbiology
Bayol F Mineralöl	Serva, Heidelberg
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Brij-35	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbachol	Sigma-Aldrich, Steinheim
cGMP Tracer (¹²⁵ I-cGMP)	NEN
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dextran T 70	Amersham Bioscience, NJ, USA
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Serva, Heidelberg
Diethylether	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNaseI	Boehringer Mannheim, Mannheim
dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate)	Amersham Bioscience, NJ, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DOC (Natriumdeoxycholat)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Steinheim
EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure)	Sigma, Steinheim
Eisen-III- chlorid	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim

FKS (Fötales Kälberserum)	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Fluorescein	Biomol GmbH, Hamburg
GelToI	Coulter-Immunotech, Deisenhofen
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Ham's F-12 Medium	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
HCl	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Heparin	Roth, Karlsruhe
HFBA (Heptafluorbuttersäure)	Merck, Darmstadt
<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	Sigma-Aldrich, Steinheim
HUVEC-Medium (EGM-2 Bullet Kit)	Cambrex, Walkersville
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine)	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPTG (Isopropyl-beta-D-Thiogalaktopyranosid)	Fermentas, Burlington, CDN
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kohle Norit A	Serva, Heidelberg
Levamisole	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Lichtgrün SF	Fluka, Basel
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt
MES (Morpholinoethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Riedel-DeHaen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Naphtol-AS-BI-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
NP-40	Sigma-Aldrich, Steinheim
Orange G	Merck Darmstadt
Paraffin	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
PFA (Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe
1,10-Phenantroline	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylephrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 / 2	Roche, Mannheim
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Random Hexamer Primer	Boehringer Mannheim
RNasin	Promega, Madison, WI, USA
Roti [®] -Block	Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Load	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt

Säurefuchsin	Fluka, Basel
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
SNP (Sodium Nitroprussid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
TFA (Trifluoressigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIZOL	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wolframatophosphorsäure	Merck, Darmstadt
X-Gal	Fermentas, Burlington, CDN
Xylidin-Ponceau	Waldeck GmbH
Xylol	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
[α - ³² P] UTP	PerkinElmer, Meriden, CT, USA
8-[³ H]-3',5'-cGMP	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.1.2. Peptide und Inhibitoren

Folgende Peptide wurden von der Firma Bachem, Weil am Rhein, bezogen: Ang I, Ang II, Ang-(1-7), BK und Des-[Arg⁹]-Leu⁸-BK. AcSDKP (Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro), Hip-His-Leu und Z-Phe-His-Leu wurden bei Sigma-Aldrich, Steinheim, bestellt.

Der CK2-Inhibitor DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidazole) wurde von Calbiochem (Schwalbach) und der JNK-Inhibitor SP600125 von Tocris (Bristol, UK) geordert. Der Mas-Antagonist A-779 (D-Ala⁷)-Angiotensin I/II (1-7)) wurde von Bachem bezogen. Der ACE2 Inhibitor (N-[2-(1-aziridinyl)ethyl]-1,2-ethanediamine) wurde von der Nationale Cancer Institute (Bethesda, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt.

Das Substrat MCA-APK (Dpn) [(7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Ala-Pro-Lys(2,4-dinitrophenyl)-OH] für den ACE2 Aktivitätsassay wurde von der Firma Biosynthan GmbH (Berlin-Buch) synthetisiert.

2.1.3. Kits, Enzyme, Antikörper und Marker

Komponente	Hersteller, Standort
Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase Komplex	Dako, Hamburg
Expand™ Long Template PCR System	Boehringer Mannheim, Mannheim
Finnzymes Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Finnland
JetStar Plasmid Purification MAXI Kit 2.0	Genomed GmbH, Löhne
Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit	Cayman Chemical, Michigan, USA
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuickSpin Columns for radiolabeled RNA purification	Roche, Mannheim
RPA II Kit	Ambion, Austin, TX, USA
Roti Histokit	Roth, Karlsruhe
SAPK/JNK Assay Kit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Superoxide Dismutase Assay Kit	Fluka, Basel
SuperSignaling® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
TBARS Assay	Cayman Chemical, Michigan, USA
Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System	Promega, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNaseA	Boehringer Mannheim, Mannheim
RNasin	Promega, Mannheim
SP6-RNA-Polymerase	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim
T4-DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
T7-RNA-Polymerase	Promega, Mannheim
TaqDNA Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PKA	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Anti-phospho-JNK1/2 (SAPK) (pThr ¹⁸³ /pTyr ¹⁸⁵)	Sigma, Saint Louis, USA
Biotinylated Anti-Green Fluorescent Protein	Vector Laboratories, Burlingame, USA
c-Jun Antibody (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Kollagen I Antikörper	Southern Biotechnology, Birmingham, AL
GAPDH	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Fibronektin Antikörper (polyklonal)	Paesel
Rabbit Anti-Mouse IgG	DakoCytomation, Dänemark
Streptavidin/HRP	DakoCytomation, Dänemark
Ang I – Antiserum „RIRI C“ (für RIA)	MDC-Berlin Buch
Ang II – Antiserum „Celine III“ (für RIA)	MDC-Berlin Buch
cGMP – Antikörper (für RIA)	MDC-Berlin Buch

HyperLadder I	Bioline, Luckenwalde
Precision Blue Protein™ Standard All Blue	BioRad Laboratories Richmond, USA
SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
λ DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker, 3	Fermentas, Burlington, CDN
Φ174 DNA/ <i>BsuRI</i> (<i>HaeIII</i>) Marker, 9	Fermentas, Burlington, CDN

2.1.4. Primer

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma BioTeZ GmbH (Berlin-Buch). Die im lyophilisierten Zustand gelieferten Oligonukleotide wurden in TE-Puffer gelöst, auf eine Konzentration von 50 µM verdünnt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.1.5. Vektoren

- pcDNA3.1+/- (Invitogen, Carlsbad, CA, USA)
- pBC KS+ (Stratagene, Heidelberg)
- pSP72 (Promega, Mannheim)
- pGEM®-T (Promega, Madison, WI, USA)
- pGEM®-T_{easy} (Promega, Madison, WI, USA)

2.1.6. Laborgeräten und Verbrauchsmaterialien

Gerät und Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Standort
8-Kanal-Pipette M300	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
96-Well-Fluoreszenzleser Fluoroscan Ascent FL	Labsystems, Ramsey, MS, USA
96-Well-Photometer anthos htII	Anthos Labtech Instruments, Salzburg, AT
Aldo-Xer-Geltrockner	Schütt-Labortechnik, Göttingen
Automatische Pipette Witoped XP	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Bakterienschüttler Certomat®H	B.Braun, Melsungen
Binokular MZFLIII	Leica, Wetzlar
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
C18 Bond Elut phenylsilane cartridge	Varian, Inc., CA, USA
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene®Nunc, Rochester, NY, USA
Dialyseplättchen	Millipore, Billerica, MA, USA
Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Tubes	TPP®, Trasadingen, Schweiz
Feinwaage	Sartorius Research, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Fluoreszenzreader LS50B	Perkin Elmer, Meriden, CT, USA

GenePulse® Küvetten	BioRad Laboratories Richmond, USA
Horizontale Agarosegelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Hybridisierungssofen 3032	GFL, Hannover
iCycler™	BioRad Laboratories Richmond, USA
Inkubator Zellkultur Heracell	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Kryoröhrchen Cryo.S	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Sigma 3K12	Sigma, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge Sorvall®PC5C Plus	Kendro, Hanau
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 1900 TR	PerkinElmer, Meriden, CT, USA
Magnetrührer MR3001	Heidolph, Schwabach
Mikrotom SM2500	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowelle 8020	Privileg, Fürth
Millipore-Filter	Millipore
Mikroskop CKX31	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Nitrocellulosemembranen	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
OP-Besteck, Diverses	Fine Science Tools
Osmotische Minipumpen (Model 2002)	Alzet
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Tubes	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
pH-Meter pH Level 1	WTW, Weilheim
Phosphoimager Fujix BAS2000	Fuji, Tokyo, J
Phosphoimagerplatte BAS-III	Fuji, Tokyo, J
Photometer GeneQuant pro	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Pipetten	Gilson, Langenfeld
Potter-Homogenisator	Roth, Karlsruhe
Präzisions-Quarzglasküvetten Suprasil®	Hellma, Müllheim
PVDF-Membranen	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Roller Mixer SRT1	Snijders, Tilburg, NL
Röntgenfilme X-ray Retina	Fotochemische Werke GmbH, Berlin
Save-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Schwenkplattform Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
SDS-PAGE-Gelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories Richmond, USA
Spannungsquellen PowerPac™HC	BioRad Laboratories Richmond, USA
SpeedVac SVC100	Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA
Sterilbank Laminair®HB2448	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Tankblotter	BioRad Laboratories Richmond, USA
Telemetrieanlage und Telemetriesender, TA11PA-C20	Data Sciences International
Test-Tube Rotator	Snijders, Tilburg, NL
Thermocycler PTC-200	BioRad Laboratories Richmond, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tierfutter	Sniff, Soest
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Labofuge 400e	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Transilluminator MultiImage™Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation, CA, USA
Ultraschallgerät Sonoplus	Bandelin electronic, Berlin
Ultra-Turrax T25 basic	IKA® Labortechnik, Staufen

Vakuumpumpe Vacusafe comfort	IBS Integra Bioscience, Chur, SUI
Vertikale Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Vortexer Genic 2	Bender & Hobein AG, Zürich, SUI
Waage 440-43N	Kern & Sohn GmbH, Baldingen-Frommern
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Whatmanpapier	Whatman® International, Maidstone, UK
Zeiss Axiopan-2 Mikroskop	Zeiss, Jena
Zellkulturschalen und -flaschen	TPP®, Trasadingen, SUI
γ-Counter 1470 Wizard	Amersham Pharmacia Freiburg

2.1.7. Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Zellart
HUVEC	Homo sapiens	Endothelzellen der Umbilikalvene
CHO	Chinesischer Hamster	Ovarienzellen

2.1.8. Versuchstiere

Die Tiere des Stammes Sprague Dawley Hannover wurden von der Firma Dimed Schönwalde und die Sprague Dawley Taconic Ratten von Dänemark bezogen. Bei den hypertensiven SHRSP Tieren handelte es sich um einen Inzuchtstamm, welcher im MDC gezüchtet wurde.

2.1.9. Software

Für die Erfassung und Auswertung der Daten aus den physiologischen Experimenten wurde das Programm *PowerLab-Chart Version 5* verwendet, welches von der Firma ADInstruments entwickelt wurde. Die Statistik zu den Daten sowie die Erstellung der Graphen wurde mittels des Programms *GraphPad Prism 4* (GraphPad Software Inc.) vollzogen. Für die Aufzeichnung und Auswertung der Telemetrie Daten wurde das Programm *LabPRO-Software* von Dataquest verwendet. Quantifizierungen von Bandenstärken bei Western Blot und RPA erfolgten mit dem Programm *TINA2.0* von raytest Isotopenmessgeräte GmbH.

2.2. METHODEN

2.2.1. Versuchstiere

2.2.1.1. Versuchstierhaltung

Die für die Experimente verwendeten transgenen Ratten sowie deren Kontrolltiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin gezüchtet, wobei die Haltung der Tiere unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ erfolgte. In der Versuchstieranlage existierte ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus, wobei die Tagphase morgens um 8.00 Uhr begann. Die Jungtiere wurden im Alter von 4-5 Wochen von ihren Eltern entwöhnt und die Geschwister nach Geschlecht getrennt gehalten. Sofern nicht anders beschrieben, hatten sie freien Zugang zu Standardfutter für Ratten und Trinkwasser. Für die Versuche wurden Tiere im Alter von 16 - 24 Wochen verwendet, sofern nicht anders angegeben. Alle Tierversuche und Organentnahmen wurden vom Berliner Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit (LaGetSi) genehmigt.

2.2.1.2. Entnahme und Aufbereitung von Blut und Organen

Blut wurde entweder aus dem retrobulbären Venenplexus oder direkt nach Tötung entnommen. Anhängig von der bevorstehenden Anwendung wurde das Blut in Röhrchen überführt, welche entweder EDTA, Heparin oder einen Inhibitor-Cocktail enthielten. Dabei wurden folgende Dosierungen verwendet: 30 U Heparin/ml Blut, 100 μl 7,5 %iges EDTA/ml Blut oder 140 ml Inhibitor-Cocktail/ml Blut. Anschließend wurde es für 10 min mit 3000 g bei 4°C zentrifugiert, das gewonnene Plasma aliquotiert und bei -80°C gelagert. Bei der Entnahme von Organen wurden diese mit 0,9 %ige NaCl-Lösung gespült, in 2 ml Eppendorffgefäße überführt und direkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung wurde bei -80°C durchgeführt.

Inhibitor-Cocktail	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	1 mM
	1,10-phenanthroline	30 mM
	PMSF	1 mM
	Pepstatin A	1 mM
	EDTA	7,5%

2.2.1.3. Erzeugung transgener Ratten

Als Rattenstämme für die Erzeugung transgener Ratten wurden entweder SD Hannover/Taconic oder SHRSP Ratten verwendet. Die pronukleäre Mikroinjektion des Transgen-Konstrukts erfolgte dabei in die Eizellen, welche von superovulierten befruchteten Weibchen entnommen wurden.

Zur Gewinnung dieser befruchteten Eizellen wurde bei den Rattenweibchen eine Superovulation ausgelöst. Dafür wurde den Weibchen 3 Tage vor dem Experiment das PMS-Gonadotropin Intergonan (Intervet) und 48 h später das Chorion-Gonadotropin Ovogest (Intervet) intraperitoneal injiziert. Nach der Injektion von Ovogest wurden die Weibchen sofort mit einem Männchen über Nacht zur Verpaarung angesetzt und am folgenden Tag wurden die Rattenweibchen getötet, die Eileiter entfernt und diese in 37°C warmes M2-Medium (Sigma) transferiert. In diesem Medium befand sich außerdem Hyaluronidase (aus bovinen Hoden gewonnen), welches die Eizellen umgebenden Cumulus Zellen entfernte. Danach erfolgte die Injektion des Transgen-Konstrukts (1- 1,5 ng) in den männlichen Vorkern der befruchteten Eizellen mithilfe einer Injektionsspritze. Nach der Injektion erfolgte die Überführung dieser Eizellen (je 20-30) in den Eileiter von scheinchwangeren Weibchen mittels einer Transferkanüle. Etwa 22 Tage nach dem Eingriff kam es zur Geburt, wobei eine 5-10-%ige Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines transgenen hemizygoten Founders bestand.

2.2.2. Genotypisierung der transgenen Ratten

2.2.2.1. Isolierung der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien

Die Schwanzbiopsien von 2-4 mm Größe wurden über Nacht in je 90 µl Ohrenpuffer mit Proteinase K bei 55°C unter Schütteln verdaut. Anschließend wurde durch Erhitzen der Proben für 10 min auf 95°C die Proteinase K inaktiviert. Zu den Proben wurden dann je 750 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNaseA gegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Lösungen für die PCR-Reaktion verwendet werden.

Ohrenpuffer	Tris-HCl pH 8.5	100 mM
	EDTA pH 8.0	5 mM
	NaCl	200 mM
	SDS	0.2 %
	Proteinase K (frisch zugeben)	1 mg/ml
TE-Puffer	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
	EDTA pH 8.0	1 mM

2.2.2.2. PCR – Amplifikation zur Genotypbestimmung

Die PCR (Polymerasekettenreaktion) zur Bestimmung des Genotyps der transgenen Ratten wurde unter Verwendung der *Taq* DNA Polymerase mit dem folgenden Reaktionsansatz von 50 µl durchgeführt:

PCR - Komponente	Volumen	Endkonzentration
genomische DNA - Lösung	1- 3 µl	
PCR-Puffer (10 x)	5 µl	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	2 µl	2 mM
dNTPs (5 mM)	2 µl	200 µM
Vorwärts - Primer (F) (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Rückwärts - Primer (R) (10 µM)	1 µl	0,2 µM
<i>Taq</i> - Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	0,02 U/µl
ddH ₂ O	ad 50 µl	

Die PCR - Ansätze wurden auf Eis in dünnwandige PCR-Gefäßen pipettiert, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und in die schon auf 95 °C vorgeheizte PCR-Maschine überführt. Die Amplifizierung erfolgte mit folgendem Programm:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	5 min	95°C	1 x
Denaturierung	30 sec	95°C	
Annealing	30 sec	56 - 65°C	35 x
Elongation	30 sec	72°C	
Elongation	5 min	72°C	1 x

Folgende Primer wurden für die jeweiligen Genotypisierungen verwendet:

Produkt	Primerbezeichnung	Sequenz 5'→3'	Bandengröße
SHRSP-ACE2 / SD-ACE2	SV40 -F SV40-R	gaa gga acc tta ctt ctg tgg tct tgt ata gca gtg cag c	407 bp
SMMHC-Ang-(1-7)	IgG5-F hRENEX-F	cat cac cca tcg aga gaa cc gga cca agc ctgg cca tgt cc	463 bp
TGR(RGS5Halox)	EGFP5-F EGFP3-R	tga ccc tga agt tca tct gc tgc cgt cct cct tga agt c	279 bp
TGR(RGS5Halox)	LoxP-F EGFP-R	caa cgt gct ggt tgt tgt gc gtc ttg tag ttg ccg tcg tcc	501 bp
TGR(SMMHCCre)	Cre-F Cre-R	cga tgc aac gag tga tga ggt tc gca cgt tca ccg gca tca ac	345 bp
<u>DTG</u> (eGFP-Schnitt) TGR(RGS5Halox)	LoxP-F RGS5-R	caa cgt gct ggt tgt tgt gc cac ctc ttt agg agc ctc cg	1983 bp mit eGFP 677 bp ohne eGFP
<u>DTG</u> (RT-PCR) (RGS5-Expression)	CX1 RGS5-R	tga ctg acc gcg tta ctc c cac ctc ttt agg agc ctc cg	597 bp

Anschließend erfolgte die Untersuchung der PCR-Produkte durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel.

2.2.2.3. Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden, abhängig von der Größe der DNA-Moleküle, 1 bis 2 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die DNA-Lösungen wurden dafür mit circa 0,1 Volumen 10 x DNA-Probenpuffer versetzt, auf die Agarosegele aufgetragen und in TAE-Puffer bei 1-8 V/cm gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA wurden die Gele mit ca. 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und im Transilluminator mit UV-Licht ($\lambda = 300$ nm) bestrahlt. Die Fragmentgröße der aufgetrennten DNA-Banden konnte durch den Vergleich mit den λ DNA/*EcoRI* + *HindIII* und Φ 174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) Molekulargewichtsmarkern abgeschätzt werden.

TAE-Puffer	Tris-Acetat pH 7.8 EDTA ad 1000 ml	40 mM 1 mM
10 x DNA-Proben-Puffer	Saccharose Bromphenolblau ad 10 ml TE-Puffer	40 % 0.025 %

2.2.3. Klonierung von DNA - Fragmenten

2.2.3.1. PCR Amplifikation zur Klonierung von DNA - Fragmenten

Kurze DNA-Stücke für die Klonierung von Sonden wurden ebenfalls mithilfe der *Taq* DNA Polymerase amplifiziert, wobei der Reaktionsansatz sowie das Thermocycler - Programm dem der PCR zur Genotypisierung von Kapitel 2.2.2.2. entsprach.

Zur Amplifikation größerer DNA-Fragmente wurde das Expand™ Long Template PCR System oder das Finnzymes`Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase System verwendet, welche DNA-Polymerasen mit *proof reading* - Aktivität enthalten. Es wurde hierbei nach beigefügter Vorschrift gearbeitet. Die Elongationszeit wurde etwas länger gewählt, wobei in der Regel 10 sec für 100 bp berechnet wurden .

Folgende Primer fanden Anwendung in der Klonierung von PCR – Fragmenten:

Konstrukt	Primerbezeichnung	Sequenz 5' > 3'	Bandengröße
hACE2 RPA-Sonde	hACE2-RPA-F	cta gcg atg tca agc tct tcc	298 bp
	hACE2-RPA-R	cag ctg aag ctt gac tgt gag	
rACE2 RPA-Sonde	ACE2-F	ggc tcc ttc tca gcc ttg	339 bp
	rACE2-RPA-R	ggt ctt gtc tgg tga cag c	
rL32 RPA-Sonde	L32-F	aac caa gca cat gct gcc tag	112 bp
	L32-R	att gtg agc aat ctc agc aca g	
Ang-(1-7) RPA-Sonde	SMMHCP5-F	gca gag gca agt aga tcc g	380 bp
	Ren-R1	cca cgt tgt tca caa acc agc	
Cre RPA-Sonde	SMMHCP5-F	gca gag gca agt aga tcc g	411 bp
	Cre-R	gca cgt tca ccg gca tca ac	
eGFP RPA-Sonde	Lox-FS	ggt ata tta agg gtt ccg gat cc	368 bp
	EGFP-R	gtc ttg tag ttg ccg tog tcc	

2.2.3.2. Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme wurden mit den vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Reaktionspuffern verwendet. Ein analytischer Restriktionsansatz von 10 µl enthielt ca. 0,2-1 µg DNA, 1 µl des entsprechenden 10fach Puffers, 1 µl (ca. 10 U) des Restriktionsenzym und ddH₂O ad 10 µl. Die Ansätze wurden 1-2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Sollte DNA im präparativen Maßstab geschnitten werden, wurden bis zu 50 µg DNA in einem entsprechend vergrößerten Volumen mit ca. 50 U Restriktionsenzym über Nacht angesetzt. Bei einem Verdau mit zwei Enzymen wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Restriktionsenzyme über ausreichende Aktivität von 75-100 % verfügen.

Das Abstoppen eines Verdau wurde mittels Hitzeinaktivierung bei 65°C für 15 min durchgeführt und störende Puffersubstanzen entfernte man mithilfe einer Mikrodialysemembran.

2.2.3.3. DNA-Isolation aus Agarosegel

Nach einer Größenauftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.2.3) wurden diese unter langwelligem UV-Licht visualisiert, die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mithilfe des QIAquick[®] Gel Extraction Kit aus dem Agarosegel extrahiert. Dabei wurde gemäß den Angaben des Herstellers verfahren. Ein Aliquot der isolierten DNA wurde erneut einer Agarosegelelektrophorese unterzogen, um damit die Ausbeute und Fragmentgröße durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker abzuschätzen.

2.2.3.4. Ligation

Die Ligation von DNA - Fragmenten in die jeweilige Vektor-DNA wurde mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Um eine hohe Ligationsausbeute zu erzielen, erfolgte der Einsatz von Insert-DNA und Vektor-DNA in einem Verhältnis von ca. 3:1. Dabei wurde ein Reaktionsvolumen von 10 µl genutzt, welches sich wie folgt zusammensetzte:

Insert - DNA	ca. 75 ng
Vektor - DNA	ca. 25 ng
Ligasepuffer (10x)	1 μ l
T4-DNA-Ligase (1U/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	ad 10 μ l

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend für die Transformation in *E. coli* Bakterien verwendet.

2.2.3.5. Transformation von kompetenten Bakterienzellen

Die Amplifikation von rekombinanten Plasmiden wurde in kompetenten Zellen des *E.coli* Stammes K12-DH5 α vorgenommen, welche zur Blau/Weiß- Selektion der positiven Klone befähigt sind. Die Transformation der Plasmid-DNA in die Bakterien wurde entweder mit der Hitzeschock-Methode oder mittels Elektroporation bewerkstelligt.

Für die Transformation via Hitzeschock-Methode wurden kompetente Bakterienzellen nach der CaCl₂-Methode (Hanahan *et al.*, 1983) hergestellt und bis zum Bedarf bei -80°C gelagert. Vor der Benutzung wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurde dann der 10 μ l Ligationsansatz (Abschnitt 2.2.3.5.) zu 150 μ l dieser kompetenten Zellen pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C, dem eine Inkubation auf Eis für ca. 3 min folgte. Anschließend wurden die Zellen mit 750 μ l antibiotikafreiem LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C im Thermomixer geschüttelt, um dann auf einer Agar-LB-Platte ausgestrichen zu werden.

Bei der Elektroporation wurden je Ansatz 50 μ l elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1-2 μ l Ligationsansatz versetzt. Dieser Ansatz wurde in eine gekühlte GenePulse® Elektroporationsküvette transferiert und in einem Elektroporator für 5 msec einem Impuls von 1350 mV ausgesetzt. Sofort danach wurde 1 ml antibiotikafreies LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese für 1h bei 37°C im Thermomixer geschüttelt.

Die Transformationsansätze wurden anschließend auf Agar-LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum, meist Ampicillin, ausgestrichen und bei 37 °C in einem Brutschrank über Nacht inkubiert.

2.2.3.6. Kultivierung der transformierten Bakterienzellen

Um erfolgreich transformierte Bakterien zu selektieren, wurden die Transformationsansätze mit einem Drigalskispatel auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Diese Agarplatten enthielten außerdem noch X-Gal und IPTG, um eine Blau/Weiß-Selektion zu ermöglichen.

LB-Platten	Baktoagar	10-15 %
	X-Gal	100 µg/ml
	IPTG	80 µg/ml
	Ampicillin oder Kanamycin in LB-Medium	100 µg/ml

Zur weiteren Plasmidamplifikation wurden die positiven Klone gepickt und in 5 ml LB-Medium überführt, welches mit dem geeigneten Antibiotikum versehen wurde. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator. Um eine größere Konzentration von Plasmid-DNA isolieren zu können, wurden auch sogenannte Maxikulturen angesetzt. Dafür wurde 1 ml einer Flüssigkultur mit hoher optischer Dichte in 250 ml LB-Medium gegeben und auf die gleiche Weise behandelt.

LB-Medium	Hefeextrakt	5 g
	Bactotrypton	10 g
	NaCl	10 g
	Ampicillin oder Kanamycin ad. 1000 ml H ₂ O	100 µg/ml

Des Weiteren wurde von jedem positiv identifiziertem Klon jeder Klonierung eine Dauerkultur angelegt. Dazu wurden 200 µl der Flüssigkultur eines Klons mit 800 µl 87 %igem Glycerol versetzt und bei -80°C aufbewahrt. Bei einer erneuten Verwendung strich man 50 µl der Dauerkultur auf einer mit Selektionsantibiotikum versehenen Agarplatte aus und inkubierte diese über Nacht bei 37°C.

2.2.3.7. Isolierung der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurde mittels alkalischer Lyse nach Birnboim & Doly isoliert (Birnboim *et al.*, 1979). Dafür wurden zuerst ca. 2 ml Flüssigkultur zentrifugiert (15 min, 5000 rpm, 4°C), um die Bakterienzellen von dem Medium zu trennen. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl GTE-Puffer resuspendiert. Durch

Zugabe von 250 µl Lysispuffer und einer 5 minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen aufgeschlossen. Mittels einer weiteren Zugabe von 250 µl Neutralisationspuffer wurden die Proteine und die denaturierte chromosomale DNA präzipitiert und durch eine Zentrifugation (10 min, 15000 rpm, 4°C) pelletiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde durch eine Isopropanolfällung gereinigt, in TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen und durch DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 2.2.3.3.) analysiert.

Bei größeren Flüssigkulturansätzen wurde zur Plasmidisolierung der JetStar Plasmid Purification MAXI Kit 2.0 genutzt, wobei nach den Angaben des Herstellers verfahren wurde.

GTE-Puffer	Glucose	50 mM
	EDTA pH 8.0	10 mM
	Tris-HCl pH 8.0	25 mM
	RNaseA	0.4 mg/ml
Lysispuffer	NaOH	100 mM
	SDS	0.5 %
Neutralisationspuffer	Kaliumacetat	1,7 M
TE-Puffer	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

2.2.3.8. Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA

Die Quantifizierung der DNA sowie auch der RNA erfolgte photometrisch in Präzisions-Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm.

DNA: $OD_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA

RNA: $OD_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$ RNA

Für die Messung wurde zuerst ein Nullwertabgleich mit ddH₂O bzw. DEPC-Wasser durchgeführt, um danach die 1:100 Verdünnungen der Proben zu bestimmen.

Nach folgender Formel wurde die Konzentration ermittelt:

Konzentration = $Absorption_{260\text{nm}} \times A_{260}\text{-Einheit (DNA/RNA)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Anhand der Verhältnisse von OD_{260}/OD_{280} konnten Rückschlüsse auf die Reinheit der Proben gezogen werden. Ein Quotient kleiner als 1,7 wies auf einen hohen Proteingehalt in der Lösung hin. Die Nukleinsäuren wurden in solchen Fällen durch Phenolextraktion gereinigt und erneut vermessen.

2.2.3.9. Sequenzierung

Alle anfallenden Sequenzierungen wurden von der Firma Invitex (Berlin-Buch) durchgeführt. Dabei wurden die benötigten Primer meist von der Firma bereitgestellt.

2.2.4. Expressionsanalyse

2.2.4.1. RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus Gewebe oder Zellen wurde mithilfe von TRIZOL-Reagenz extrahiert. Dabei wurden je 100-200 mg einer Gewebeprobe mit 1 ml des Reagenz versetzt und mittels dem Ultra-Turrax homogenisiert. Bei kultivierten Zellen wurde 1 ml des TRIZOL-Reagenz auf die Zellkulturplatte (10 cm Durchmesser) gegeben, wobei sich die Zellen sofort von dem Untergrund lösten und das Lysat in ein Eppendorfgefäß überführt werden konnte. Die weitere Schritte der RNA-Isolierung erfolgten gemäß der Anleitung des Herstellers. Am Ende wurde die durch Isopropanolfällung gereinigte RNA in DEPC-Wasser aufgenommen und das RNA-Pellet durch Vortexen und Inkubation bei 55 °C gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

DEPC-Wasser Diethylpyrocarbonat (DEPC) 0.1 %
→ über Nacht bei 37 °C gerührt, dann autoklaviert

2.2.4.2. DNase Behandlung der RNA - Präparationen

Prinzipiell weisen RNA-Isolierungen mit TRIZOL nur geringe DNA-Kontaminationen auf. Dennoch wurden die RNA-Präparationen vor ihrer Verwendung mit DNase I behandelt. Dafür wurde entweder der mitgelieferte Puffer verwendet oder der folgende Reaktionsansatz benutzt:

RNA - Lösung	20 μ l
PCR-Puffer (10x)	3 μ l
MgCL (50mM)	0,6 μ l
DNase I (0,1U/ μ l)	1 μ l
DEPC - Wasser	ad 30 μ l

Die darauffolgende Inkubation dauerte 15 - 30 min. Anschließend wurde die DNase für 5 min bei 95 °C hitzeinaktiviert und die RNA-Konzentration (siehe Abschnitt 2.2.3.8.) gemessen.

2.2.4.3. Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA wurde die mit DNase I vorbehandelte RNA verwendet. Diese wurde zusammen mit 6,5 μ M Random Hexamer Primer in DEPC-Wasser (Endvolumen 15,25 μ l) für 3 min bei 80 °C denaturiert und danach sofort auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde pro Ansatz folgender Mastermix hinzupipettiert :

Komponente	Volumen	Endkonzentration
1 st strand buffer (5x)	6 μ l	1,2 x
dNTPS (5 mM)	3 μ l	600 μ M
RNasin (40 U/ μ l)	0,75 μ l	1,2 U/ μ l
DDT (100 mM)	3 μ l	12 mM
M-MLV (200 U/ μ l)	2 μ l	16 U/ μ

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Danach erfolgte wieder für 10 min eine Denaturierung bei 80 °C sowie eine schnelle Abkühlung auf Eis. Die erhaltene cDNA - Lösung konnte dann für den Nachweis der Genexpression verwendet werden.

2.2.4.4. Quantitative Real-time PCR

Die quantitative Real-time PCR ist eine Technik zur Amplifizierung von Nukleinsäuren, welche auf dem herkömmlichen Prinzip der PCR beruht, aber zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Um dies zu ermöglichen, werden entweder Nukleinsäurebindende Fluoreszenzfarbstoffe oder sequenzspezifische

Fluoreszenz-markierte Sonden verwendet. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde zur Quantifizierung der PCR-Produkte der interkalierende DNA-Farbstoff SYBR[®] Green I (Anregung 497 nm; Emission 520 nm) verwendet, welcher sich in doppelsträngige DNA einlagert und deren Fluoreszenz erhöht. Folglich nimmt diese proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die Messung erfolgt daher immer am Ende einer Elongation in jedem Zyklus.

Ein Nachteil dieser Methode ist die geringe Spezifität, da die PCR-Produkte nicht von entstandenen Primerdimeren unterschieden werden können. Daher wird nach Beendigung der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Länge der produzierten Fragmente und damit die Spezifität der jeweiligen PCR bestimmt werden kann. Dafür wird die DNA durch eine sich kontinuierlich erhöhende Temperatur (50°C → 95°C) in ein einzelsträngiges Molekül überführt, wobei die dabei abnehmende Fluoreszenz registriert wird. Die Schmelztemperatur der jeweiligen Fragmente ist dabei von der Doppelstranglänge abhängig.

Für die Bestimmung der Expressionsstärke einer mRNA wird der Anfang der exponentiellen Phase gemessen, was dem sogenannte CT-Wert (Threshold Cycle, Schwellenwert-Zyklus) entspricht. Das ist der Punkt an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Folglich ist dieser Wert umso kleiner je größer die anwesende cDNA Konzentration ist.

2.2.4.4.1. Durchführung der PCR

Die Real-Time PCR Reaktion wurde mithilfe des QuantiTect SYBR Green PCR Kits ausgeführt. Für jedes zu testende Primerpaar wurde vorab eine Standardkurve erstellt, wobei eine 1:5 oder 1:3 Verdünnungsreihe einer beliebigen cDNA Probe verwendet wurde. Damit ermittelte man die optimal einzusetzende cDNA - Konzentration sowie die PCR - Effizienz. Für den eigentlichen Expressionstest wurde die PCR - Reaktion von jeder zu testenden cDNA in Triplikaten angesetzt. Ferner wurden für jedes getestete Primerpaar noch zwei Negativkontrollen ohne Template - cDNA mitgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA	varierte	0,1 - 100 ng
SYBR Green Mix (2x)	10 µl	1 x
Fluoreszein - Dye (400 nM)	0,5 µl	10 nM
F - Primer (50 µM)	0,12 µl	0,3 µM
R -Primer for (50 µM)	0,12 µl	0,3 µM
ddH ₂ O	ad 20 µl	

Die PCR wurde im iCycler™ der Firma Bio-Rad Laboratories mit folgenden Programm durchgeführt:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	15 min	95°C	1 x
Denaturierung	15 sec	95°C	
Annealing	20 sec	56 - 63°C	50 x
Elongation	30 sec	72°C	
Denaturierung	1 min	95°C	1 x
Schmelzkurve	10 sec	55 - 95°C	80 x

(-0,5°C je Zyklus)

Beim Primerdesign für die Real-Time PCR Experimente musste man beachten, dass diese keine Primerdimere bilden. Des Weiteren sollte das zu produzierende PCR-Produkt eine Größe von 100 - 150 bp besitzen.

Folgende Genexpressionen wurden mithilfe der nachfolgend aufgelisteten Primer untersucht:

Konstrukt	Primerbezeichnung	Sequenz 5' > 3'	Bandengröße
ACE2 (Mensch/Ratte)	ACE2-F ACE2-R	ggc tcc ttc tca gcc ttg ttc ata aaa ggc aga cca ttt g	203 bp
GAPDH (Mensch/Ratte/Maus)	GAPDH-rt-F GAPDH-rt-R	gct gtg ggc aag gtc atc c ctt cac cac ctt ctt gat gtc	143 bp
hCOX-2 (Mensch)	h-Cox2-F h-Cox2-R	ctg atg att gcc cga ctc agt gct ggg caa aga atg	147 bp

COX-2 (Hamster/Ratte/Maus)	COX-CHO-F COX-CHO-R	tca tca gtt ttt caa gac aga tc acc tga tat ttc aat ttt cca tcc	148 bp
h-β-Aktin (Mensch)	H-Bact-F H-Bact-R	aca atg agc tgc gtg tgg gca cag cct gga tag caa c	130 bp
β-Aktin (Hamster/Ratte/Maus)	β-Act-F β-Act-R	ctg gcc tca ctg tcc acc tt cgg act cat cgt act cct gct t	147 bp

2.2.4.4.2. Berechnung der Expression

Die Bestimmung der Expression wird über eine relative Quantifizierung bewerkstelligt, wobei die Expression eines bestimmten Gens mit der eines Referenzgens, wie GAPDH oder β-Aktin, verglichen wird. Dabei gleicht man Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA aus. Daher erfolgt die Berechnung über die $\Delta\Delta CT$ - Methode, bei der die n-fache Expression mithilfe des $\Delta\Delta CT$ -Wertes angegeben wird. Für die Berechnung wird dabei zuerst von jeder Probe der ΔCT -Wert über folgende Gleichung ermittelt: $\Delta CT = CT (\text{Zielgen}) - CT (\text{Referenzgen})$. Dann wird der $\Delta\Delta CT$ berechnet, welcher den Unterschied zwischen den beiden zu unterscheidenden Gruppen (z.B. transgen / Kontrolle) beschreibt und wie folgt berechnet wird: $\Delta\Delta CT = \Delta CT\text{-Wert (Proben von Interesse, z.B. Transgen)} - \Delta CT\text{-Wert (Referenzprobe, z.B. Wildtyp)}$. Abschließend wurde der normalisierte Wert der Zielgen-Expression wie folgt kalkuliert: $= 2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.2.4.4.5. RNase Protection Assay (RPA)

Der RPA wurde mithilfe des RPA-Kit II durchgeführt. Er dient dem Nachweis einer bestimmten mRNA in Gewebe- oder Zellproben und überdies ist er geeignet für einen direkten quantitativen Vergleich von mehreren detektierten mRNAs.

Für den Nachweis einer mRNA muss eine exakt komplementäre radioaktiv markierte Antisense Sonde hergestellt werden. Diese wird zusammen mit der zu testenden RNA - Lösung über Nacht inkubiert, wobei es zur Hybridisierung der Sonde mit der passenden mRNA kommt. Anschließend wird das RNA-Gemisch mit einer einzelstrangspezifischen RNase behandelt. Hierbei wird jede ssRNA abgebaut, somit auch die ungebundene Sonde, und lediglich die hybridisierten doppelsträngigen RNAs sind vor dem Verdau geschützt. Nachfolgend werden diese gefällt, denaturiert und in einem Harnstoffgel aufgetrennt. Mittels Autoradiografie werden dann die unverdauten Sondenmoleküle

nachgewiesen, die durch die Bindung an ihre komplementäre mRNA geschützt waren. Die Stärke des Signals ist somit direkt proportional zur Menge der ursprünglich im Ansatz enthaltenen Ziel - mRNA.

Überdies werden bei einem RPA immer zwei Kontrollen mitgeführt, bei denen Hefe-RNA verwendet wird. Die Konzentration der gebrauchten Hefe-RNA entspricht der Proben. Diese Kontrollen werden genauso bearbeitet wie die Proben bis auf den RNase-Verdau nach der Hybridisierung, welcher bei einer Kontrolle, Y⁻, nicht durchgeführt wird. Diese behält somit die unverdaute Sonde und ist folglich eine Kontrolle für Sondenzustand und -größe. Die andere Kontrolle, Y⁺, hingegen sollte theoretisch keine Homologien zur nachzuweisenden RNA aufweisen. Hier erwartet man eine komplett verdaute Sonde und damit eine leere Spur auf dem Gel. Folglich stellt diese eine Kontrolle des RNase Verdau dar.

2.2.4.5.1. RNA - Vorbereitung

Zuerst wurden 20 - 40 µg der zu testenden RNA - Probe mithilfe einer SpeedVac lyophilisiert. Danach konnte diese sofort für die Hybridisierung genutzt werden oder sie wurde vorerst bei -20°C eingelagert.

2.2.4.5.2. Sondenherstellung

Die mRNA Antisense Sonde sollte eine Größe von 200 bis 500 bp besitzen. Für deren Herstellung wurde daher mittels PCR ein Fragment der Ziel - mRNA amplifiziert, wobei meist dessen cDNA verwendet wurde, und dieses unter Nutzung des pGEM®-T oder pGEM®-Teasy Vektors kloniert. Über eine Sequenzierung wurde die Sonde nochmals überprüft. Ferner zeigte diese die Orientierung des Inserts im Vektor an, welche ausschlaggebend für die Wahl des Enzyms bei der darauffolgende Linearisierung des Vektors war. Hierbei wurden 20 µg DNA mit 4 µl Enzym und 10 µl passendem 10 x Puffer in einem Gesamtvolumen von 100 µl über Nacht bei 37°C verdaut. Das Enzym wurde anschließend 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert und der Ansatz zur Beseitigung der Puffersubstanzen 20 min dialysiert.

Um eine radioaktiv markierte Antisense Sonde zu erhalten, wurde der entsprechend linearisierte Vektor unter Nutzung von radioaktiven [α -³²P] UTP transkribiert. Bei dieser Transkription wurden 500-1000 ng des linearisierten Sondenvektors in einem Reaktionsansatz von 25 µl, welcher ferner noch die Ribonukleotiden ATP, GTP und CTP (0.4 mM), das radioaktive [α -³²P] UTP (2 mM), RNA-Polymerasepuffer, DTT

(4 mM), RNasin (2 U/ μ l) und die jeweilige RNA - Polymerase (SP6 oder T7 mit 4 bzw. 1 U/ μ l) enthielt, für 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Verdau mit 0,1 U/ μ l DNase I für 30 min. Die so entstandenen Sondenmoleküle wurden mithilfe der QuickSpin Columns for radiolabeled RNA purification entsprechend der Herstellerhinweise von freien Nukleotiden gereinigt.

Zur Überprüfung der Transkription wurden 2 μ l der gereinigten Sonde zusammen mit 8 μ l Loading Buffer auf ein Harnstoffgel aufgetragen. Der Gellauf wurde mit einer Spannung von 250 V gestartet und nach dieser Einlaufphase wurde diese auf 300 V erhöht. Als Laufpuffer diente TBE. Außerdem wurde die Sondenaktivität in cpm/ μ l mithilfe eines Szintillators bestimmt.

Harnstoffgel	Harnstoff (9 M)	7 M
	TBE (10 x)	1 x
	Acrylamid/Bis-Acrylamid 19:1	5 % (v/v)
	APS	0,0008 % (v/v)
	TEMED	0,001 % (v/v)
TBE-Puffer	Tris	130 mM
	Borsäure	45 mM
	EDTA	2,5 mM

2.2.4.5.3. Hybridisierung

Für die Hybridisierungsreaktion wurden die lyophilisierten RNA-Proben mit jeweils 20 μ l Hybridisierungspuffer versetzt, welcher 60000 - 80000 cpm der spezifischen RNA-Sonde sowie meist auch 5000 - 10000 cpm einer Sonde für das Housekeeping-Gen L32 enthielt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 16-18 h in einem Hybridisierungsofen, wobei die Reaktionsansätze zuvor für 5 min bei 95°C denaturiert wurden, um eventuell ausgebildeten Sekundärstrukturen zu entfernen.

2.2.4.5.4. Größenauftrennung und Visualisierung der protektierten RNA

Nach der Hybridisierungsreaktion wurden die nicht gebundenen Sondenmoleküle und RNAs mit 200 μ l Digestionbuffer und 2,5 μ l RNase-ATI für 1 h bei 37°C verdaut. Anschließend wurden 300 μ l einer Inaktivierungslösung zugegeben, um den RNase - Verdau zu stoppen und die protektierte RNA zu fällen. Dafür erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei -20°C und eine anschließende Zentrifugationsfällung (13000 g, 20 min, 4°C). Die dsRNA Pellets wurden vollständig vom Überstand befreit, in 8 μ l Loading

Buffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Harnstoffgel aufgetragen und die Trennung erfolgte anfänglich bei einer Spannung von 250 V und nach 10 minütiger Einlaufphase mit 300 V. Im Allgemeinen dauerte die Auftrennung 1-2 Stunden, wobei als Laufpuffer TBE benutzt wurde. Danach wurde das Gel auf Whatmanpapier überführt und für 2 h bei 80°C auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet. Anschließend wurde für 4 - 48 h eine Phosphoimagerplatte aufgelegt, welche die Autoradiografie des Gels festhielt. Dieses wurde mithilfe eines Phosphoimagers sichtbar gemacht.

2.2.5. Expressionsnachweis mittels Western Blot Analyse

2.2.5.1. Proteinisolierung aus Gewebe

Für die Isolierung des zellulären Gesamtproteins wurden 100-200 mg Gewebe in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zerkleinert und anschließend in RIPA-Puffer aufgenommen. Danach wurden die Proben für 20 min auf Eis inkubiert, für 30 sec mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert (13000 g, 15 min, 4°C), um grobe Gewebereste zu entfernen. Die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmte man fotometrisch mit der Bradford-Methode und die Lagerung erfolgte bei -80°C.

RIPA-Puffer	NaCl	150 mM
	Tris-HCL pH 7.5	50 mM
	NP-40	1 %
	DOC (Natriumdeoxycholat)	0,5 %
	SDS	0,1 %
	PMSF	1 mM
	Complete Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette / 10 ml

2.2.5.2. Proteinisolierung aus Zellen

Die Zellen wurden zuerst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde Lysispuffer zugegeben und es erfolgte die Ernte der Zellen durch Abschabung und Überführung in ein Eppendorfgefäß. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden diese für 30 sec einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (13000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,0 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	pH 7.5 eingestellt	
Lysispuffer	Tris-HCl pH 7.4	20 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Triton X-100	1 %
	PMSF	1 mM
	Complete Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette / 10 ml
	Phosphatase - Inhibitor Cocktail 1	100µl / 10 ml
Phosphatase - Inhibitor Cocktail 2	100µl / 10 ml	

2.2.5.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt. Diese beruht auf der Komplexbildung zwischen den basischen Aminosäuren-Seitenketten der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue in der Bradfordreagenz, welches von der Firma Sigma bezogen wurde.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde unter Nutzung einer Standardgerade bestimmt, welche einen Bereich von 0,1 – 1,5 mg/ml abdeckte. Für deren Erstellung wurde BSA benutzt. Die zu messenden Proben wurden wenn nötig verdünnt, um innerhalb des Konzentrationsbereiches der Standardreihe zu liegen. Für die eigentliche Messung wurden je 5 µl Probe bzw. BSA-Standard mit 250 µl Bradfordreagenz gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte mithilfe eines 96-Well-Photometer bei 595 nm.

2.2.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um einen immunologischen Nachweis der Proteine durchzuführen, mussten zuerst die Proben in SDS-Polyacrylamidgelen der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Hierfür wurde ein diskontinuierliches vertikales Elektrophoresesystem verwendet. Dabei werden die Proteine zuerst in einem Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert und im sich anschließenden Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Bei der Herstellung des Gels wurde zuerst das Trenngel gegossen. Abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins, wurde dafür 8-15%

Acrylamid benutzt. Zur Ausbildung eines glatten Überganges wurde das Trenngel sofort mit Isopropanol überschichtet. Nachdem dieses polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und mit dem Sammelgel (5 % Acrylamid) überschichtet. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und anschließend mit SDS-PAGE-Laufpuffer aufgefüllt.

Trenngel (8-15 %)	Acrylamid-/Bisacrylamid 37:5:1	8 - 15 %
	Tris-HCL pH 8.8	375 mM
	SDS	0,1 %
	TEMED	0,25 %
	APS	0,1 %
Sammelgel (5%)	Acrylamid-/Bisacrylamid 37:5:1	5 %
	Tris-HCL pH 6.8	125 mM
	SDS	0,1%
	TEMED	0,25 %
	APS	0,1 %
SDS-PAGE-Laufpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 %

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 4-fach konzentriertem Roti®-Load SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 95 °C im Heizblock inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert (13000 g, 1min). Für eine Western Blot Analyse wurden 20-40 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde außerdem noch ein Proteinstandard (Precision Blue Protein™ Standard All Blue oder SeeBlue®Plus2 Pre-stained Protein Standard) mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei einer Spannung von 180 V.

2.2.5.5. Western Blot

Beim Western Blot werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch einen Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose- oder PVDF- Membran übertragen und so für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert.

Um den Transfer vorzubereiten, wurde die Membran sowie Filterpapier entsprechend der Gelgröße (Standard: 6x9 cm) zurechtgeschnitten. PVDF-Membranen wurden mit Methanol und Nitrocellulose-Membranen mit ddH₂O kurz angefeuchtet und

anschließend für 5-10 min in Transferpuffer, zusammen mit dem Filterpapier, äquilibriert. Anschließend wurde der Blot aufgebaut, wobei der Aufbau in der Abbildung 9 schematisch dargestellt ist. Geblottet wurde 2 Stunden bei 4°C mit einem konstanten Stromfluss von 250 mA bzw. einer Spannung von 100 V.

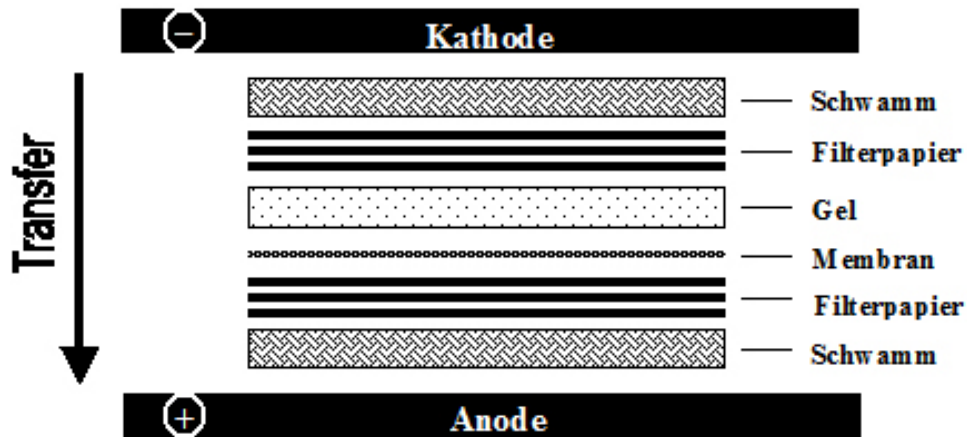


Abbildung 9: Western Blot Aufbau.

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Western Blots.

Zur Kontrolle eines erfolgreichen Proteintransfers wurde die Membran reversibel mit Ponceau-Färbelösung gefärbt. Durch Spülen unter fließendem Wasser wurde überflüssiger Farbstoff entfernt und die Banden wurden sichtbar. Danach entfernte man den roten Farbstoff durch einmaliges Waschen mit TBST- bzw. PBST- Lösung wieder.

Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	Methanol	20 %

2.2.5.6. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Nach der Immobilisierung der Proteine an die Membran können diese durch eine Antikörper-vermittelte Enzymreaktion nachgewiesen werden. Dafür wurde die Membran zuerst für 1 h in TBST oder PBST mit 5 % Milchpulver oder in Roti-Block auf einem Rollmixer unter leichten Schwenken bei RMT inkubiert. Das diente dem Absättigen unspezifischer Bindungstellen auf der Membran. Anschließend wurde die Membran in ein 50 ml Falcontube transferiert, mit dem Primärantikörper-Lösung (AK in TBST oder

PBST mit 3% BSA) versetzt und über Nacht bei 4°C auf einen Rollenmischer inkubiert. Nach Bindung des ersten Antikörpers wurde die Membran 3 x 10 min mit Waschpuffer (TBST- oder PBST- Lösung) gewaschen und nachfolgend in der Lösung (TBST oder PBST mit 5% Milchpulver) mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper für 1-2 h bei RMT inkubiert. Nach erneutem waschen erfolgte die Detektion der Antigen-Antikörperkomplexe. Dafür wurde auf der Membran ein ECL-Substrat (SuperSignaling® West Dura Extended Duration Substrate) verteilt und nach einer kurzen Inkubation von 1-5 min wurde in einer Autoradiographiekassette ein Röntgenfilm aufgelegt. Nach einer Expositionszeit, welche von 5 sec bis 1 h variierte, wurde der Film in einer Entwicklermaschine entwickelt.

TBS	Tris NaCl → pH 7.5 einstellen	50 mM 150 mM
TBST	Tween20 in TBS	0,1 %
PBST	Tween20 in PBS	0,1 %

2.2.6. Bestimmung der Peptidkonzentrationen

Die Bestimmung von Peptidkonzentrationen wurde mittels eines Radioimmunoassays (RIA) durchgeführt. Dieser erlaubt aufgrund der hohen Spezifität der Antikörper-Antigen-Reaktion die Bestimmung selbst geringer Peptid-Konzentrationen. Das Prinzip basiert dabei auf der Konkurrenz zwischen einer definierten Menge radioaktiv-markierten Peptids mit dem zu bestimmenden Peptids um die Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers. Nach der Bindungsreaktion wird das ungebundene, markierte Antigen durch Aktivkohle von den Antikörper-Peptid-Komplexen getrennt und die Radioaktivität bestimmt. Der erhaltene Wert des gebundenen markierten Antigens verhält sich dabei umgekehrt proportional zu der des unmarkierten Antigens.

2.2.6.1. Messung der Ang I Konzentration

Um die Ang I Konzentration zu bestimmen, wurden je 50 µl Cocktail-Plasma mit 50 µl RIA-Puffer, 500 µl Ang I-Antiserum (1:10⁵ Verdünnung) und 500 µl radioaktiv (¹²⁵I) markiertem Ang I – Peptid (6 pg/ml), den sogenannten „Tracer“, versetzt und für 16 - 20

Stunden bei RMT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde zu den Proben 300 µl Dextranskohle hinzugegeben, nochmals 15 min bei RMT inkubiert und anschließend 20 min zentrifugiert (4000 U/min, 4°C). Der Überstand wurde danach entfernt und die Radioaktivität der Kohlepellets, an denen freies markiertes sowie unmarkiertes Angiotensin adsorbiert ist, wurde im γ -Counter gemessen.

Es wurden für alle Proben Doppelbestimmungen durchgeführt und bei jedem Radioimmunoassay wurde eine Standardkurve mitgeführt. Diese wurde immer in Triplikaten erstellt und reichte von 10 fg/ml bis 5 pg/ml Angiotensin (1:2 Verdünnung).

Ang I RIA-Puffer	Tris	0,1 M
	EDTA	1 mM
	BSA (frisch zugeben)	0,5 mg/ml
	→ pH 7.4 mit HCL einstellen	
Dextranskohle (für Ang I RIA)	Ang I-RIA-Puffer (ohne BSA)	100 ml
	Norit A Kohle	1,25 g
	Dextran T 70	0,25 g

2.2.6.2. Messung der Ang II Konzentration

Für die Bestimmung der Ang II Konzentration wurde das gleiche Protokoll wie für den Ang I – Radioimmunoassay genutzt, wobei aber kleine Abweichungen vorkommen. Hierbei wurden 50 µl Cocktail-Plasma mit 350 µl RIA-Puffer, 100 µl Ang II-Antiserum (1:30000 Verdünnung) und 100 µl radioaktiv (^{125}I) markiertem Ang II - Peptid (40 pg/ml) versetzt und die Inkubation fand bei 4°C statt.

Ang II RIA-Puffer	Tris	0,1 M
	Neomycin	0,325 mM
	BSA (frisch zugeben)	0,1 %
	Triton X-100 (frisch zugeben)	0,1 %
	→ pH 7.4 mit Essigsäure einstellen	
Dextranskohle (für Ang II RIA)	Ang I-RIA-Puffer (ohne BSA)	240 ml
	Norit A Kohle	4 g
	Dextran T 70	1 g

2.2.6.3. Messung der Angiotensin-(1-7) Konzentration

Vor der Bestimmung der Ang-(1-7) Konzentration mittels Radioimmunoassay wurden erst die Peptide aus den Plasma- oder dem Gewebeproben isoliert.

Peptidisolierung aus dem Plasma:

Hierbei wurde immer Cocktail-Plasma (Abschnitt 2.2.1.2.) verwendet. Die Peptide wurden mithilfe von speziellen Säulen (C¹⁸ BondElut phenylsilane cartridge) extrahiert. Dabei wurden diese zuerst mit 10 ml der Lösung 1 und 10 ml der Lösung 2 präaktiviert. Zur Aktivierung wurden die Säulen dann der Reihe nach mit 10 ml Lösung 1, 10 ml Lösung 2, 3 ml Lösung 3, 10 ml Lösung 4 und 3 ml Lösung 2 gewaschen. Anschließend wurden die Plasmaproben auf die Säule gegeben, worauf wieder ein Waschgang mit 20 ml der Lösung 2 und 3 ml der Lösung 5 folgte. Die adsorbierten Peptide wurden daraufhin mit 3 ml der Lösung 1 eluiert und in einem mit 0,1% BSA gespülten Polypropylentube aufgefangen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (45°C; ± 12h). Bis zur nächsten Verwendung wurden diese bei -20°C gelagert.

Lösung 1	Acetonitril (ACN)	99,9%
	Heptafluorbuttersäure (HFBA)	0,1%
Lösung 2	HFBA	0,1%
Lösung 3	HFBA	0,1%
	BSA	0,1%
Lösung 4	ACN	10%
	HFBA	0,1%
Lösung 5	ACN	20%
	HFBA	0,1%

Peptidisolierung aus Gewebeproben:

Die Aortaproben wurden in der Homogenisierungslösung mithilfe von einem Ultra-Turrax zerkleinert. Davon wurde die Proteinmenge bestimmt, welche für die spätere Berechnung der Peptidkonzentration benötigt wurde. Anschließend wurden die Proben mittels einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert (45°C für ± 12h) und wieder in 750 µl ddH₂O resuspendiert, wobei man die Proben mit Ultraschall behandelte. Danach folgten 1 Waschgang mit 750 µl Trifluoressigsäure (TFA, 0,2%) und eine weiterer mit 1500 µl TFA (0,1%). Nach der letzten Zentrifugation (30 min, 2500 rpm, 4°C) wurden aus dem

Überstand die Peptide über die C¹⁸ Säulen isoliert. Dabei wurde das bereits beschriebene Protokoll der Peptidisolierung aus Plasma befolgt.

Homogenisierungslösung (für 1g Gewebe)	HCL in Ethanol (0,045 N)	10 ml
	Inhibitor-Cocktail	1400 µl
	BSA (5%)	10 µl
Inhibitor-Cocktail	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	1 mM
	1,10-phenanthroline	30 mM
	PMSF	1 mM
	Pepstatin A	1 mM
	EDTA	7,5%

Radioimmunoassay:

Die lyophilisierten Proben wurden in 650 µl Resuspensionspuffer unter Ultraschallbehandlung resuspendiert. Danach wurde der Reaktionsansatz für die Ang-(1-7) Bestimmung pipettiert, wobei dieser sich wie folgt zusammensetzte: 100 µl Probe, 100 µl Ang-(1-7) RIA-Puffer, 100 µl (¹²⁵I) markiertes Ang-(1-7) Peptid (6000 cpm) und 100 µl Ang-(1-7)-Antiserum (1:20000 Verdünnung). Diese Ansatz wurde für 18 - 22 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 ml Dextranskohle versetzt, für 20 min zentrifugiert (2500 rpm, 4°C) und der Überstand im γ-Counter gemessen. Es wurden für alle Proben Doppelbestimmungen durchgeführt und bei jedem Radioimmunoassay wurde eine Standardkurve mitgeführt. Diese wurde immer in Triplikaten erstellt und reichte von 6,25 µg/0,1 ml bis 200 µg/0,1 ml Angiotensin.

Resuspensionspuffer	NaCL	0,9 %
	BSA	0,1 %
	Essigsäure	0,03 %
Ang-(1-7) RIA-Puffer	Tris-HCL	50 mM
	NaCL	50 mM
	BSA	0,1 %
	Sodiummazid	0,02 %
	→ pH 7.5 einstellen	

2.2.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten und anderer Parameter

2.2.7.1. ACE2 Aktivitätsassay

Für die Messung der Zn-abhängige enzymatische ACE2 Aktivität wurde das sehr selektive Substrat MCA-APK (Dpn) verwendet, welches zuvor in DMSO resuspendiert wurde (50 μ M). Bestimmt wurde die ACE2 -Aktivität im Citrat-Plasma und in Gewebeproben. Dafür wurden die Gewebe in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 (3 ml/100 g Gewebe) mittels eines Potter-Homogenisators homogenisiert, durch ein Nylonnetz filtriert und 30 sec mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden deren Proteinkonzentrationen durch einen Bradford Assay bestimmt (Abschnitt 2.2.5.3.). Der Aktivitätsassay wurde in MES-Puffer und 2 mM ZnSO₄ in einem Endvolumen von 2 ml durchgeführt und die Inkubation fand bei 37°C in einem Thermoschüttler statt. Die eingesetzte Probenmenge und die Inkubationszeit waren vom jeweiligen Gewebe abhängig und wurden vorher ausgetestet. Ferner wurde der Assay zur Kontrolle mit EDTA (0,5 M) durchgeführt, welches eine Zn - Komplexierung bewirkte. Damit konnte die unspezifische Fluoreszenz ermittelt werden. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 90°C für 10 min gestoppt. Danach erfolgte eine Abkühlungsperiode von ca. 30 min bei RMT sowie eine Zentrifugation (10000 g, bei RT, 10 min). Anschließend wurde die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 320 nm und einer Emission von 405 nm in dem Fluoreszenzreader LS50B gemessen.

Organ	Probenvolumen (V_{Probe})	Inkubationszeit (t)
Aorta	20 μ l	3 h
Darm	20 μ l	1 h
Lunge	20 μ l	1 h
Niere	30 μ l	1 h
Herz	20 μ l	2 h
Plasma	20 μ l	2 h

MES-Assaypuffer	MES (Morpholinoethansulfonsäure)	100 mM
	NaCl	3 M
	Brij-35	0,02 %
	→ pH 7.4 mit NaOH einstellen	

Die Formel zur Berechnung der Aktivität lautete wie folgt:

$$\text{ACE2 Aktivität} = \frac{F * V_{\text{Gesamt}}}{305,75 * V_{\text{Probe}} * t * p}$$

- F = Fluoreszenz
- V_{Gesamt} = Volumen des Inkubationsansatzes (200 µl)
- V_{Probe} = Proben-Volumen
- t = Inkubationszeit
- p = Proteinkonzentration der Probe in µg/µl

Der Faktor 305,75 entstammt der Kalibrierungsgeraden, die mit dem Standard ermittelt wurde.

2.2.7.2. Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung von Renin

Die Bestimmung der Reninkonzentration und Aktivität erfolgte durch den spezifischen Radioimmunoassay für Ang I, dem Produkt von Renin. Vor der Durchführung dieses Assays wurden die Plasmaproben aber noch wie folgt vorbereitet.

Bestimmung der Reninkonzentration:

Zur Messung der Reninkonzentration wurde die Plasmaproben mit Rattensubstrat (BN Plasma) im Überschuss versetzt und im Wasserbad für 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

EDTA-Plasma	25 µl
BN-Plasma	25 µl
Inkubationspuffer	100 µl
BSA (1 mg/ml)	95 µl
PMSF (50 mg/ml Ethanol)	5 µl

Danach wurden je 50 µl der so vorbereiteten Proben für den Radioimmunoassay für Ang I eingesetzt (Abschnitt 2.2.6.1.). Die initiale Geschwindigkeit der Angiotensinbildung wurde zur Berechnung der Reninkonzentration herangezogen. Als Einheit wurde die Reninmenge definiert, die ein ng Ang I pro Stunde Inkubation bildet.

Inkubationspuffer	Tris	0,2 M
	EDTA	50 mM
	BSA (frisch zugeben)	1 mg/ml
	→ pH 7.3 einstellen	

Bestimmung der Reninaktivität:

Die Reninaktivität bezeichnet die Geschwindigkeit der Ang I Bildung aus Angiotensinogen, welche von Renin katalysiert wird. Für die Bestimmung der Aktivität wurden 100 µl EDTA-Plasma mit 95 µl Tris-Puffer (pH 7.4) und 5 µl PMSF für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mithilfe eines Radioimmunoassay die entstandene Ang I Konzentration gemessen, wobei 50 µl der vorbereiteten Probe eingesetzt wurden. Der weitere Ablauf ist unter Abschnitt 2.2.6.1. beschrieben.

Tris-Puffer	Tris	0,2 M
	EDTA	50 mM
	BSA (frisch zugeben)	1 mg/ml
	→ pH 7.4 einstellen	
PMSF	PMSF in Ethanol	50 mg/ml

2.2.7.3. Nitrat/Nitrit-Messung (Griess-Assay)

Nitrat und Nitrit sind die stabilen Oxidationsprodukte von NO und fungieren als Indikatoren der endogenen NO-Synthese. Für deren Bestimmung wurde der Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit verwendet. Dieser Assay setzte sich im Wesentlichen aus zwei Schritten zusammen. Der 1. Schritt bestand in der Umwandlung des Nitrat zu Nitrit durch die Zugabe einer Reduktase, womit die Sensitivität der Reaktion erhöht wurde. Der zweite Schritt bestand in der Zugabe des Griess-Reagents, welches Nitrit in eine violette Azo-Verbindung (λ_{\max} : 540 nm) umwandelte. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Analysiert wurden EDTA-Plasmaproben, welche zuvor mithilfe von Millipore - Filtern von störenden Substanzen, wie Hämoglobin, gereinigt wurden.

2.2.7.4. cGMP - Bestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von 3',5'-zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) erfolgte in Aortaproben, welche zuvor in 500 µl HBSS-Puffer mit 1 mM des

Phosphodiesterasehemmer IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine) homogenisiert wurden sind. Danach wurden 150 μl einer eiskalten Trichloressigsäure (TCA; 6% Endkonzentration) zugegeben und für 10 min zentrifugiert (12000g, 4°C). Darauf schloss sich eine Entfernung von TCA aus dem Überstand an, wobei dieser mehrmals mit H_2O -gesättigten Ether gewaschen wurde. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis ein pH-Wert von 7 erreicht war.

Die cGMP- Konzentration wurde letztendlich mit einem Radioimmunoassays bestimmt. Dafür wurde zuerst die Aktivität des radioaktiv markierten ^{125}I -cGMP (Tracer) mit einer 50 mM Natriumacetatlösung auf 3200 cpm/50 μl eingestellt. Ferner wurde eine Standardkurve mit definierten cGMP-Konzentrationen (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 200; 500 und 800 fmol/ml) erstellt. Anschließend wurden 150 μl der Proben mit 30 μl einer 5 M KOH-Lösung versetzt und mit 10 μl Essigsäureanhydrid azetyliert. Davon wurden dann 25 μl oder 50 μl in ein RIA-Röhrchen pipettiert und mit 30 μl eines Anti-3',5'-cGMP-Antikörpers (Verdünnung 1:10000) sowie mit 50 μl Tracer versetzt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Den nächsten Tag wurden zu jeder Probe 50 μl einer 0,5%igen BSA-Lösung und 2 ml 96%iger Ethanol hinzugefügt. Es folgte eine 30 minütige Inkubation bei RMT sowie eine Zentrifugation (3200 rpm, 30 min), um die Antigen-Antikörper-BSA-Komplexe zu erhalten. Nach Entfernen des Überstandes wurde die Radioaktivität mithilfe eines γ -Counters gemessen und die cGMP-Konzentration berechnet.

HBSS – Puffer	NaCl	0,137 M
	KCL	5,4 mM
	Na_2HPO_4	0,25 mM
	KH_2PO_4	0,44 mM
	CaCl_2	1,3 mM
	MgSO_4	1,0 mM
	NaHCO_3	4,2 mM

2.2.7.5. SOD - Aktivität

Die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert den Abbau von Superoxid (O_2^-) und stellt somit eine der wichtigsten antioxidativen Enzyme dar. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde deren Aktivität in Aortahomogenaten mithilfe des Superoxide Dismutase Assay Kits der Firma Fluka bestimmt, wobei nach Angaben des Herstellers verfahren wurde. Die SOD-Aktivität wurde berechnet und als Units/mg Protein angegeben.

2.2.7.6. TBARS Assay

Der TBARS Assay diente der Bestimmung der Lipidoxidation. Diese ist ein Indikator für oxidativen Stress im Gewebe bzw. in Zellen und ein natürlich vorkommendes Produkt dieser Lipidoxidation ist Malondialdehyd (MDA). Diese Substanz kann durch Zugabe von 2-Thiobarbitursäure (TBA) nachgewiesen werden, da deren Reaktion einen rot fluoreszierenden Farbstoff (530 - 540 nm) bildet. Der hier benutzte TBARS Assay Kit war von der Firma Cayman Chemical und die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Untersucht wurden dabei EDTA-Plasma-Proben. Die dabei erhaltene MDA-Konzentration wurde durch die Proteinkonzentrationen normalisiert.

2.2.8. Histochemische Untersuchungen

2.2.8.1. Masson-Goldner Trichrom Färbung anhand von Paraffinschnitten

Die entnommenen Organe wurden direkt in eine 5 %ige PFA-Lösung (Paraformaldehyd in PBS) eingelegt und für ~ 24 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde diese Lösung entfernt und die Organe in eine 0,4 %ige PFA-Lösung überführt, in der sie bis zum Einbetten gelagert wurden. Die in Paraffin eingebetteten Organe wurden dann mittels eines Microtoms in 6 µm dicke Scheiben geschnitten.

Vor der Färbung mussten die Paraffinschnitte zunächst für 3 x 5 min in Xylol deparaffinisiert werden. Darauf schlossen sich folgende Rehydrierungsreihen an: 3 x 3 min 100 % Ethanol; 2 x 2 min 96 % Ethanol und 1 x 1 min 70 % Ethanol.

Für die eigentliche Färbung wurden die Paraffinschnitte nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

2 min	Weigert-Lösung
15 min	Leitungswasser
30 sec.	1 %ige Essigsäure
30 sec.	PWO
30 sec.	1% ige Essigsäure
2 min	Lichtgrün-Lösung
15 sec	1 %ige Essigsäure

Nach den Färbeschritten wurden die Schnitte sofort wieder mit aufsteigenden Alkoholreihen dehydriert: 2 x kurz 96 % Ethanol und 3 x 2 min 100 % Ethanol. Anschließend 3 x 2 min mit Histoclear behandelt und mithilfe des Histokits eingedeckt.

MATERIAL UND METHODEN

Weigert A -Lösung	Hämatoxylin 96 % Ethanol → filtrieren	2 g 200 ml
Weigert B -Lösung	Eisen-III-chlorid ddH ₂ O 25 %ige HCL	2,32 g 198 ml 2 ml
Weigert-Arbeitslösung	Weigert A -Lösung Weigert B -Lösung → filtrieren	100 ml 100 ml
Xylin-Ponceau	Xylidin-Ponceau ddH ₂ O → aufkochen und filtrieren Eisessig	1 g 100 ml 1 ml
Säurefuchsin	Säurefuchsin ddH ₂ O → aufkochen und filtrieren Eisessig	1 g 100 ml 1 ml
Azophloxin	Azophloxin ddH ₂ O Eisessig	0,5 g 100 ml 0,2 ml
Masson-Lösung	ddH ₂ O Eisessig Xylin-Ponceau Säurefuchsin Azophloxin	176 ml 0,35 ml 15 ml 5 ml 4 ml
PWO	Wolframatophosphorsäure ddH ₂ O Orange G ddH ₂ O → pH 1 → 2 x filtrieren	10 g 100 ml 4 g 90 ml
Lichtgrün-Lösung	Lichtgrün SF gelblich ddH ₂ O Eisessig → pH 3.3 → filtrieren	0,5 g 250 ml 0,5 ml

Interpretation der Färbungen:

Grün = Kollagen

Rot = Muskelgewebe, Zytoplasma, Keratin

Schwarz = Zellkerne

2.2.8.2. Immunhistochemie anhand von Kryoschnitten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Fibronectin und Kollagen I immunhistochemisch anhand von Kryoschnitten nachgewiesen. Dafür wurden die Organe, hier Herzen, schnell in Isopentan (-35°C) auf Trockeneis gefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die gefrorenen Organe wurden in 6 µm dicke Scheiben geschnitten und luftgetrocknet. Danach wurden die Schnitte mit kaltem Aceton fixiert, mit TBS pH 7.6 gewaschen und in einer feuchten Kammer für 60 min bei RMT mit dem primären Antikörper gegen Fibronectin bzw. Kollagen I inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit TBS gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (Rabbit Anti-Mouse IgG) für 30 min bei RMT inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang mit TBS wurde der Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase Komplex auf die Schnitte appliziert und für 30 min bei RMT inkubiert. Die Immunoreaktivität wurde mithilfe einer Mischung aus Naphtol-AS-BI-Phosphat und Neufuchsin sichtbar gemacht. Die endogene Alkaline-Phosphatase wurde durch die Zugabe von 10 mmol/l Levamisole zu der Substratlösung gestoppt. Die Schnitte wurden leicht mit einer Mayers Hämalaun Lösung gegengefärbt, mit Leitungswasser gewaschen und mit dem Einbettmedium GelTol eingebettet. Diese Präparationen wurden dann mittels eines Zeiss Axioplan-2 Mikroskops analysiert und digital fotografiert.

2.2.9. Zellkultur

2.2.9.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturen wurden in einem Inkubator mit wassergesättigter, 5%iger CO₂ Atmosphäre bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium der Zellen gewechselt, wobei das alte Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt wurde.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde hauptsächlich mit CHO Zellen (Ovarienzellen von chinesischen Hamstern) sowie HUVEC Zellen (humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene) gearbeitet. Dabei wurde für die CHO Zellen das Ham's F-12 Medium verwendet, welches ferner mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) versetzt wurde. Für die HUVEC Zellen wurde ein spezielles Endothelzellmedium von Cambrex benutzt, welches bereits alle wichtigen Zusatzstoffe bereitstellte.

2.2.9.2. Aussaat der Zellen

Eingefrorene Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, sofort in Medium aufgenommen und anschließend pelletiert (3 min, 800 g), um das DMSO zu entfernen. Das Pellet wurde in 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und in eine 10 cm² Schale ausgesät.

2.2.9.3. Passagieren von Zellen

Wenn die Zellen eine Konfluenz von 100 % erreicht hatten, wurde sie zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und in 500 µl Trypsin für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:10 auf neue Zellkulturschalen mit 10 ml frischem Medium verteilt.

2.2.9.4. Einfrieren und Lagerung von Zellen

Um die Zellen wieder einzufrieren, wurden sie zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die vom Schalenboden gelösten Zellen im 5 ml Medium aufgenommen und pelletiert (3 min, 800 g). Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Diese wurden mithilfe eines Freezing Containers im Tiefkühler mit einer Kühlungsrate von 1 °C/min auf -80°C abgekühlt. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -192°C untergebracht.

Einfriermedium	DMSO	10 %
	FKS	90 %

2.2.9.5. Stimulation der Zellen und nachfolgender SAPK/JNK Assay

Der SAPK/JNK Assay diente der Bestimmung der ACE-assoziierten JNK-Aktivität, wobei getestet wurde, welche Substanzen diese Auslösen können. Um die Zellen mit verschiedenen Substanzen zu stimulieren, wurden sie in 60 mm Zellkulturschalen ausplattiert. 24 Stunden vor dem Experiment wurde das Medium entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt. Den darauffolgenden Tag wurde erneut 2 Stunden vor der Stimulation das Medium entfernt und genau 2 ml neues serumfreies Medium zugegeben. Die zwei Stunden dienten der Adaptation der Zellen. Danach erfolgte die Stimulation, wobei die zu testenden Substanzen zu den Zellen mit einer

Endkonzentration von 100 nmol/l zugegeben wurden. Nach einer 7 minütigen Inkubation wurde die Stimulation gestoppt, indem das Medium entfernt und die Zellen sofort zweimal mit eiskalten PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden 300 µl Lysispuffer zugegeben und die weitere Proteinisolierung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.2. beschrieben. An die Isolierung schloss sich eine Immunpräzipitation von aktivierten JNK mithilfe von c-Jun gekoppelten Agarosebeads sowie ein Kinase-Assay an, in welchem durch Zugabe von ATP und Kinasepuffer eine Phosphorylierung von c-Jun durch das präzipitierte JNK ausgelöst wurde. Die Präzipitation sowie der Kinase Assay wurde mithilfe des SAPK/JNK Assay Kits von Cell Signaling bewerkstelligt, wobei nach den Angaben des Herstellers verfahren wurde. Ferner enthielt dieser Kit einen Primärantikörper für den Nachweis des phosphorylierten c-Jun (Ser63). Folglich wurde dieses mittels eines Western Blots nachgewiesen.

2.2.9.6. Stimulation der Zellen zur Expressionsanalyse

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die ACE -abhängige Expression von COX-2 zu analysieren, wurden die CHO Zelllinien sowie die HUVEC Zellen mit diesen Substanzen stimuliert. Hierbei wurde aber erst zum Zeitpunkt der Stimulation das Medium entfernt und durch neues ersetzt, wobei dieses bereits die zu testende Substanz enthielt. Die Stimulation wurde nach 4 oder 24 Stunden durch Zugabe von TRIZOL abgebrochen. Anschließend wurde eine RNA-Isolierung, wie in Abschnitt 2.2.4.1. beschrieben, ausgeführt.

2.2.10. Physiologische Untersuchungen

2.2.10.1. Blutdruckmessungen

Die folgenden Methoden standen für die Bestimmung des Blutdrucks zur Verfügung:

Messung mittels Tail-Cuff-Methode: Diese Methode beruht auf der Benutzung einer Druckmanschette, die einen Pulssensor enthält, und in die Nähe der Schwanzwurzel der Ratte angelegt wird. Der Sensor registriert nach Aufblasen der Manschette Druckschwankungen in den arteriellen Gefäßen. Über die so gewonnenen Daten konnte dann der systolische Blutdruck ermittelt werden. Die Messung wurde hierbei an narkotisierten Tieren durchgeführt.

Messung mittels Katheter: Nach der Narkotisierung der Ratten mithilfe einer intraperitonealen Injektion von Chloralhydrat (400 mg/kg) wurde ihnen ein Polyethylenkatheter (PE-50) in die linke Arteria femoralis so weit eingeführt, dass die Katheterspitze in der Aorta abdominalis zu liegen kam. Danach wurde der Katheter an der Arteria femoralis durch chirurgisches Nahtmaterial fixiert. Das andere Katheterende wurde subkutan zum Nacken und dort mit einem kleinen Schnitt nach draußen geführt und fixiert. Nach der Katheterlegung konnten die Tiere sich für zwei Tage von der Operation erholen. Für die Messung wurde der interarterielle Katheter mit einem Drucktransducer (MLT 1050/D) verbunden. Dieser zeichnete den arteriellen Blutdruck sowie die Herzfrequenz der freibeweglichen, nicht narkotisierten Ratten mithilfe eines Multikanalpolygraphen auf. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm *Chart Version 5*.

Telemetrische Messung: Mittels Telemetrie kann der zirkadiane Verlauf von Blutdruck, Herz- und Atemfrequenz bei wachen Kleintieren gemessen werden. Dabei besteht das Telemetriesystem aus einem Transmitter, einem Empfänger sowie dem Erfassungssystem. Zur Implantation der Telemetriesender wurde den mit Isofluran narkotisierten Ratten der Katheter infrarenal in die Aorta abdominalis eingeführt und mit einem Spezialkleber befestigt. Der Transmitter wurde anschließend mithilfe von chirurgischen Nahtmaterial am Peritoneum fixiert und der Bauchraum verschlossen. Erst 10 Tage nach der Operation begann die Datenerfassung an den wachen Tieren, indem deren Käfige über spezielle Empfangsgeräte positioniert wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *LabPRO*-Software von Dataquest.

2.2.10.2. Akute sowie chronische Injektion von pharmakologischen Substanzen

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf den Blutdruck zu messen, wurde neben dem Katheter für die Blutdruckmessung ein weiterer Katheter für die Injektion eingeführt. Dieser konnte entweder in das venöse oder das arterielle System inseriert werden, wobei das abhängig von der Stabilität bzw. der Wirkung der verwendeten Substanz war. Für eine Injektion ins venöse System wurde ein Polyethylenkatheter (PE-50) in die linke Vena femoralis eingeführt und bis zur Vene cava inferior vorgeschoben. Eine Injektion ins arterielle System erfolgte mittels eines Polyethylenkatheters (PE-10), der über die Arteria carotis in die absteigende thorakale Aorta eingeführt wurde. Nach der Katheterlegung wurde eine zweitägige Erholungsphase der Ratten abgewartet. Vor

der Injektion einer Substanz sowie der Blutdruckmessung wurden die Ratten zuerst 1-2 Stunden adaptiert, indem sie bereits mit dem Transducer verbunden wurden, aber noch keine Messung erfolgte.

Diese Injektionsmethode wurde unter anderem für die Messung der vasokonstriktorisches Reaktion genutzt, indem entweder Ang II (100 ng/kg) allein oder 10 min nach einer Injektion des ACE2 Inhibitors (N-[2-(1-aziridiny)ethyl]-1,2-ethanediamine; 100 µg/kg) verabreicht wurde.

Für die Verabreichung einer Substanz über einen längeren Zeitraum bietet sich die Verwendung von osmotischen Minipumpen an. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden diese für eine einwöchige Infusion des Mas Antagonisten A-779 benutzt. Die hierbei verwendeten osmotischen Minipumpen der Firma Alzet (Model 2002) besaßen ein Speichervolumen von 200 µl und eine Pumpfrequenz von 0,5 µl/h. Der Inhibitor wurde letztendlich mit einer Dosis von 100 ng/kg/min verabreicht. Erst nach der einwöchigen Applikationsphase erfolgte die Insertion des Katheters zur Blutdruckmessung.

2.2.10.3. Messung der Endothelfunktion in vivo

Um die Endothelfunktion in vivo bestimmen zu können, wurde erst die Endothel-abhängige Reaktion auf ansteigende Dosen von ACh (25, 50, 100 und 200 ng/kg) oder BK (50, 100, 200 und 300 ng/kg) sowie die endothelunabhängige Vasodilatation auf SNP (5 und 10 µg/kg) über die Veränderung des Blutdrucks gemessen. Injiziert wurden diese Substanzen dabei in die thorakale Aorta (siehe Abschnitt 2.2.10.2.). Abschließend berechnete man die eigentliche Endothelfunktion (EF) mittels der folgenden Gleichung: $EF = \Delta MAP (ACh) / \Delta MAP (SNP)$, wobei das die Normalisierung der ACh ausgelösten vasodilatatorischen Reaktion mittels der SNP- Werte darstellt.

2.2.10.4. Messung der Endothelfunktion in vitro

Die vaskuläre Reaktivität der Aorta wurde mithilfe von Organbad-Experimenten gemessen. Dafür wurde die thorakale Aorta der Ratten entnommen, sorgfältig von umgebenden Bindegewebe gesäubert und anschließend in transversale Ringe von 3-4 mm Länge geschnitten. Jedes zu testende Aorta-Segment wurde an zwei Haken in eine Röhre des Organbads aufgehängt. In diesen befand sich Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) angereicherter und auf 37°C vorgewärmter Krebs-Henseleit-Puffer (118, mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,22 mM KH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 11,1 mM Glukose, pH 7.4), welcher je nach Bedarf schnell ausgewechselt werden konnte. Von

den beiden Haken war einer im unteren Teil der Röhre fest fixiert und der andere wurde an einen isometrischen Transducer angeschlossen, welcher die Kontraktion des Muskels registrierte und in eine der Längenänderung proportionale Spannung umwandelte. Diese wurde direkt an ein 6-Kanal Transducer Akquisitionssystem weiterleitet und die Wiedergabe und Analyse der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm *Chart Version 5*.

Nach der Überführung der Aortaringe ins Organbad wurden diese mithilfe einer Mikrometerschraube vorsichtig auf eine Ausgangsspannung von 2 g gestellt und es folgte eine Äquilibrationsphase von ca. 90 min. Um die Endothelfunktion untersuchen zu können, wurden die Ringe mittels Phenylephrin (Phe, 1 µM) kontrahiert. Nach dem Erreichen des Kontraktionsplateaus wurden kumulative Konzentrationen von Carbachol oder SNP (1 nmol/L - 10 µmol/L) zupipettiert und die Vasorelaxation für jede Konzentration wurde berechnet in Prozent der maximalen Phe-Kontraktion. Abschließend wurde die Carbachol Reaktion über die von SNP normalisiert, um die eigentliche endotheliale Funktion zu erhalten.

2.2.10.5. Metabolische Käfige

Der Trinkwasserverbrauch, Diurese und Kotmenge einer Ratte konnte für ein bestimmtes Zeitintervall unter Verwendung eines metabolischen Käfigs ermittelt werden. Dafür wurde je ein Tier in einen Käfig gesetzt und zuerst für 24 h an diesen adaptiert. Danach erfolgte die Messung der Trink- und Urinmenge, wobei dies immer nach 24 h erfolgte. Ferner wurden bei den Tieren aus dem retroorbitalen Plexus mittels einer Pasteurpipette Blut entnommen, dieses mit Heparin versetzt und nachfolgend durch Zentrifugation das Plasma isoliert. Anschließend wurde unter anderem die Osmolarität mittels eines Osmometers ermittelt. Die Messung der Albuminmenge wurde von der Firma CellTrend GmbH in Luckenwalde durchgeführt, und die Bestimmung der Kreatininkonzentration im Sammelurin und im Plasma erfolgte durch das Labor28 AG in Berlin. Zur Beurteilung der Nierenfunktion wurde ferner die Kreatinin-Clearance nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kreatinin-Clearance (ml/min)} = \frac{[U]_{\text{Kreatinin}} / V_{\text{Urin}} \times 1000}{[P]_{\text{Kreatinin}} \times 24 \times 60}$$

U = Urin

P = Plasma

V = Urinvolumen

2.2.11. Statistik

Die erhaltenen Datenreihen wurden unter Verwendung der Programme *Microsoft Excel* und *GraphPad Prism 4* statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch den t-Tests oder durch die Analyse der Varianz (ANOVA). Eine statistische Signifikanz wurde bei einem P-Wert $< 0,05$ erreicht.

3. ERGEBNISSE

3.1. Überexpression von ACE2

3.1.1. Herstellung der ACE2 transgenen Ratten

Die Klonierung des Konstruktes sowie die Erzeugung der transgenen Ratten erfolgte bereits im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bader, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch.

Das Ziel war die Erzeugung von Ratten, welche die Carboxypeptidase ACE2 in den glatten Muskelzellen der Gefäße überexprimieren. Dafür wurde die cDNA des humanen ACE2 Gens (hACE2) verwendet, welche aus einem RZPD-Klon (DKFZp434A014; 2,5 kb) isoliert wurde. Um eine gewebespezifische Expression in den glatten Muskelzellen der Gefäße zu erhalten, wurde der Promotor eines Proteins der glatten Muskulatur, SM22 α (2,8 kb), verwendet (Akyürek *et al.*, 2000). Dieser Promotor sowie die ACE2 cDNA wurde in den Vektor pBluescript II SK (Stratagene) kloniert. Des Weiteren wurde das ATG Startcodon, welches in dem RZPD-Klon fehlte, sowie ein SV40-Intron und ein Polyadenylierungssignal eingefügt. Das resultierende 6,5 kb große Transgen-Fragment (SM22-ACE2) konnte durch einen Verdau des Vektors mit den Enzymen *KpnI* und *NotI*, einer anschließenden Auftrennung in einem Agarosegel sowie nachfolgender Gelextraktion isoliert werden (Abbildung 10).

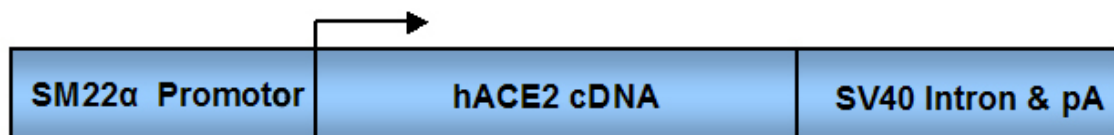


Abbildung 10: Konstrukt zur Herstellung transgener Ratten mit vaskulärer Überexpression des humanen ACE2 Gens. Schematische Darstellung der strukturellen Komponenten des DNA Konstruktes, welches für die pronukleäre Mikroinjektion benutzt wurde.

Nach der Aufreinigung des Konstruktes erfolgte die Mikroinjektion in den männlichen Pronukleus von Zygoten, welche anschließend in scheinchwangere Ratten reimplantiert wurden. Mittels PCR wurden die Nachkommen auf die Integration des Transgens in das Genom überprüft (Abbildung 11). Identifizierte Träger des Transgens, die sogenannten Foundertiere, wurden danach mit Wildtyptieren verpaart, um

heterozygote F1-Nachkommen zu erhalten. Danach erfolgte die Weiterverpaarung bis zur Homozygotie. Potenziell homozygote Tiere wurden durch Rückkreuzung mit Wildtyptieren auf ihren Genotyp getestet.

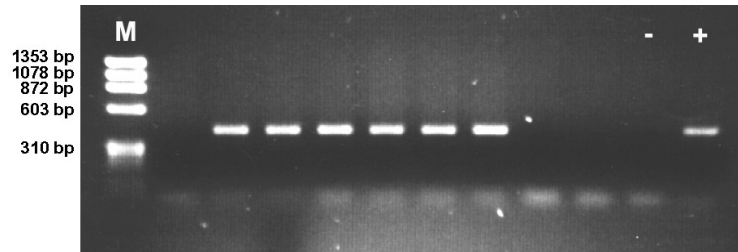


Abbildung 11: Nachweis der transgenen Nachkommen. Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte mittels PCR. Dabei wies das entstehende Fragment eine Größe von 407 bp auf. M, Marker; -, Negativ-Kontrolle; +, Positiv-Kontrolle.

Als Rattenstämme für die Erzeugung der transgenen Tiere wurden normotensive SD Ratten sowie hypertensive SHRSP Ratten verwendet. Die SHRSP Ratten waren insofern interessant, da bei ihnen die ACE2 mRNA sowie Protein Konzentration erniedrigt (Crackower *et al.*, 2002) und damit der zu erwartende Phänotyp aussagekräftiger sein sollte. Daher steht bei der vorliegenden Doktorarbeit die Charakterisierung der transgenen SHRSP Tiere (SHRSP-ACE2) im Vordergrund. Die Ergebnisse der transgenen SD Tiere (SD-ACE2) werden nur teilweise in dieser Arbeit diskutiert.

3.1.2. Analyse der mRNA Expression des Transgens

Die Expressionsanalyse erfolgte mittels RPA. Die radioaktiv markierte cDNA Sonde wurde dabei so gewählt, dass sie vollständig komplementär zur humanen ACE2 mRNA ist. Ferner wurde als interner Standard das Housekeeping-Gen L32 detektiert, welches für ein ribosomales Protein codiert.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, war die Expression des Transgens vorwiegend in der Aorta zu finden. Daneben konnte die hACE2 mRNA auch in der Lunge beobachtet werden (Abbildung 12B). Da diese Expression jedoch nicht immer zu detektieren war, wurde angenommen, dass der in den Lungenpräparationen unterschiedliche Anteil an Gefäßen verantwortlich war. Die Abbildung 12C zeigt überdies den RPA der transgenen SD-ACE2 Linie, welcher das gleiche Expressionsergebnis aufwies.

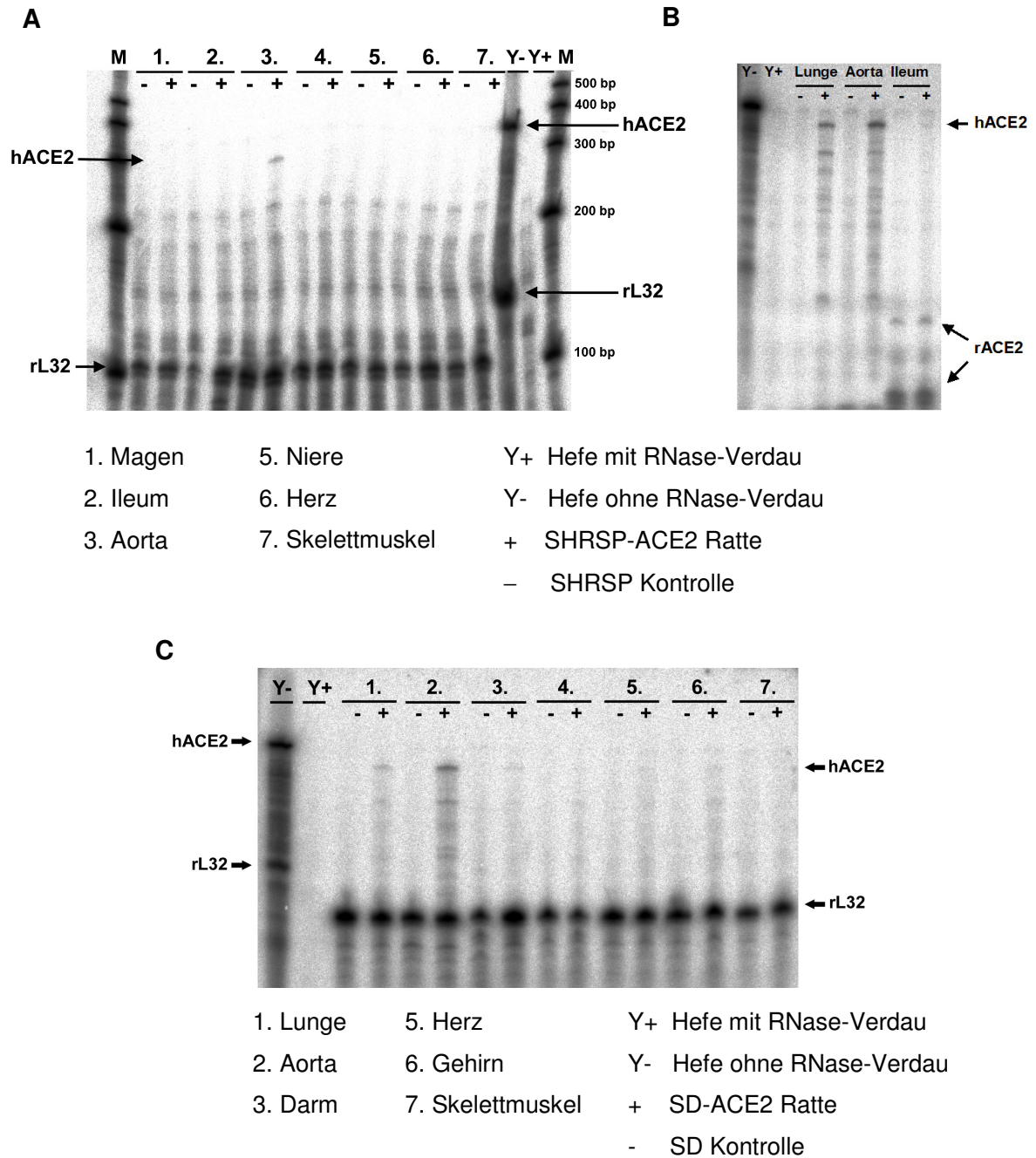


Abbildung 12: hACE2 Expressionsnachweis in verschiedenen Rattenorganen.

Für die Expressionsanalyse wurde eine spezifische cDNA Sonde für die Transgen mRNA (hACE2; geschütztes Fragment: 298 bp; 80000 cpm) und eine cDNA Sonde für das Housekeeping-Gen L32 (rL32; geschütztes Fragment: 111 bp; 7500 cpm) benutzt. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Rattengewebe wurden für einen RPA eingesetzt. (A) RPA der transgenen SHRSP-ACE2 Ratten. Die geschützten Fragmente sind auf der linken Seite und die unverdauten auf der rechten Seite mit Pfeilen markiert. (B) Hierbei ist eine Expression in Aorta und Lunge sowie die endogene ACE2 Expression (rACE2) im Darm in Form von zwei kleinen Fragmenten zu sehen. (C) RPA der transgenen SD-ACE2 Ratten. Hierbei sind die geschützten Fragmente auf der rechten Seite und die unverdauten auf der linken Seite mit Pfeilen markiert.

Die cDNA Sonde für die humane ACE2 mRNA ist für einen kurzen Bereich von ~ 30 bp auch komplementär zu der endogenen ACE2 mRNA. So wurde bei einem RPA ohne Benutzung der Sonde des Housekeeping-Gens L32 auch die endogene ACE2 Expression sichtbar. Diese konnte aber nur im Darm detektiert werden (Abbildung 12B). Ein RPA mithilfe einer cDNA Sonde, die spezifisch für die ACE2 mRNA der Ratte ist, zeigte ebenfalls eine stärkere endogene ACE2 Expression im Darm (Abbildung 13). Im Vergleich zu den transgenen Tieren war diese aber stärker in den SHRSP Kontrollen. Überdies war eine etwas schwächere rACE2 Expression in der Lunge zu finden.

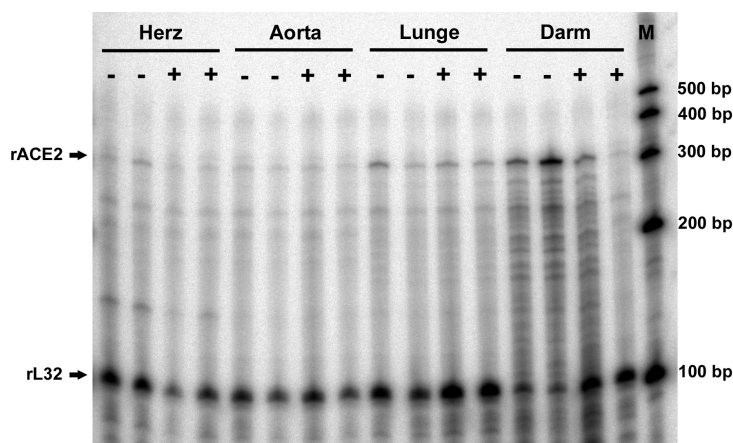


Abbildung 13: Nachweis der endogenen ACE2 mRNA mittels RPA. Für die Expressionsanalyse wurde eine spezifischen cDNA Sonde für die ACE2 mRNA der Ratte (rACE2; geschütztes Fragment: 339 bp) und eine cDNA Sonde für das Housekeeping-Gen L32 benutzt. Die geschützten Fragmente sind auf der linken Seite mit Pfeilen markiert. +, SHRSP-ACE2; -, SHRSP-Kontrolle; M, Marker.

3.1.3. Expressionsnachweis von humanem ACE2 in verschiedenen Gefäßen

Bei der Blutdruckregulation spielen vor allem die kleineren Gefäße eine Rolle. Daher wurde getestet, ob eine ACE2 Überexpression außer in der Aorta auch noch in anderen Gefäßen zu finden ist. Mittels einer quantitativen Real-time PCR Analyse wurde daher die ACE2 mRNA in renalen und mesenterialen Arterien sowie in der Aorta bestimmt. Hierbei wurden Primer verwendet, welche nicht nur die humane ACE2 sondern auch die endogene ACE2 mRNA der Ratte erkannten.

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, war die ACE2 mRNA Expression in allen untersuchten Gefäßen signifikant erhöht. Hingegen konnte in den SHRSP Kontrollen kaum eine Expression detektiert werden.

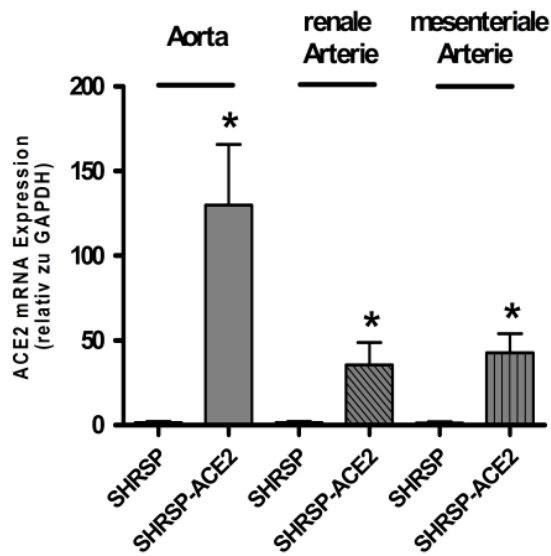


Abbildung 14: Real-time PCR Analyse der ACE2 mRNA in Aorta sowie in renalen und mesenterialen Arterien. Die Expression von ACE2 wurde in jeder Probe über die mRNA Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die Daten stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler von 3 Ratten in jeder Gruppe dar. *P ≤ 0.05.

3.1.4. ACE2 Aktivität

Um die Überexpression von ACE2 noch besser beurteilen zu können, wurde die enzymatische Aktivität dieser Carboxypeptidase im Plasma und in verschiedenen Gewebeproben bestimmt. Dabei wurde eine 7,8-fach höhere ACE2 Aktivität in der Aorta der SHRSP-ACE2 Tiere verglichen mit den Kontrollen gefunden (Abbildung 15). In anderen Organen, wie Darm, Lunge, Niere oder Herz sowie im Plasma konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede in der enzymatischen Aktivität registriert werden. Ferner zeigte sich in Darm und Lunge von den transgenen Ratten und den SHRSP Kontrollen im Vergleich zu den anderen Organen eine sehr starke basale ACE2 Aktivität.

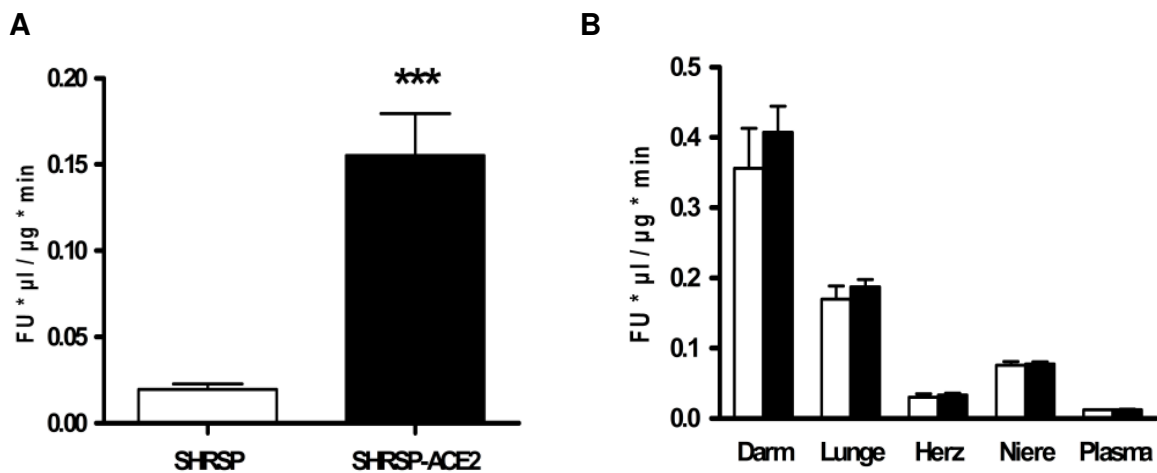


Abbildung 15: Analyse der ACE2 Aktivität (A) in der Aorta sowie (B) in Darm, Lunge, Herz, Niere und Plasma von SHRSP-ACE2 und SHRSP Ratten. Dargestellt sind die Daten mit dem Standardfehler des Mittelwertes. ***P ≤ 0.001 (n = 6 Tiere pro Gruppe).

3.1.5. Einfluss der ACE2 Überexpression auf die Peptidkonzentrationen

Als Konsequenz einer erhöhten ACE2 Expression und Aktivität wurde eine vermehrte Ang II Degradierung sowie ein Anstieg der Ang-(1-7) Konzentration erwartet. Um dies zu überprüfen, wurden die Peptidkonzentrationen in Plasmaproben mittels eines Radioimmunoassays bestimmt. Ferner wurde auch die Ang-(1-7) Produktion in der Aorta ermittelt.

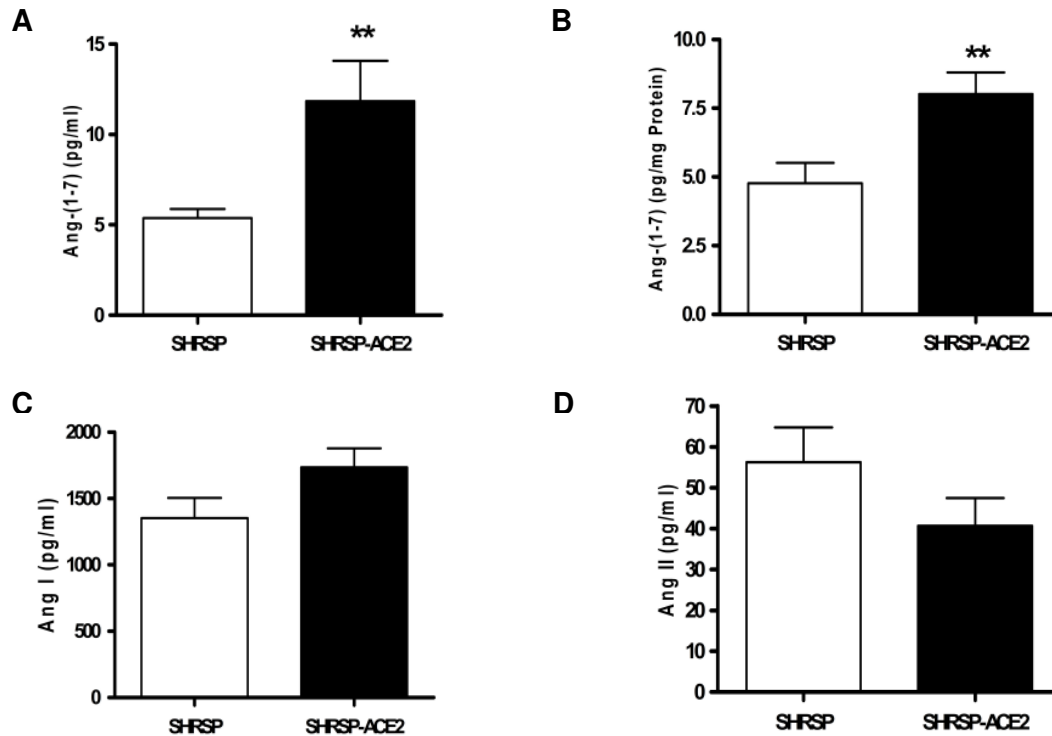


Abbildung 16: Messung der Peptidkonzentrationen mittels Radioimmunoassay.

Ang-(1-7) ist signifikant erhöht im Plasma (A) sowie im Aortenhomogenat (B) von SHRSP-ACE2 Ratten. Hingegen zeigt Ang I nur eine leichte Erhöhung (C) und Ang II eine leichte Erniedrigung (D) in den transgenen Tieren, wobei beide Level nicht signifikant verändert sind. Gezeigt sind die Daten mit dem Standardfehler des Mittelwertes. **P<0.01 (n = 7-12 Tiere pro Gruppe).

Anhand der Messergebnisse ist ersichtlich, dass eine ACE2 Überexpression vor allem die Produktion von Ang-(1-7) drastisch steigert (Abbildung 16). So weisen die transgenen Ratten, im Vergleich zu den SHRSP Kontrollen, eine ungefähr doppelt so hohe Ang-(1-7) Konzentration im Plasma ($11,8 \pm 2,2$ pg/ml SHRSP-ACE2 vs. $5,4 \pm 0,5$ pg/ml SHRSP) sowie in der Aorta auf ($8,0 \pm 0,8$ pg/mg Protein SHRSP-ACE2 vs. $4,8 \pm 0,7$ pg/mg Protein SHRSP). Außerdem trat eine allerdings nur leichte und nicht

signifikante Erniedrigung der Ang II Konzentration im Plasma der SHRSP-ACE2 Tiere auf $(40,7 \pm 6,8 \text{ pg/ml SHRSP-ACE2 vs. } 56,2 \pm 8,6 \text{ pg/ml SHRSP; } P=0,21)$. Des Weiteren wurde eine leichte, aber nicht signifikante, Erhöhung von Ang I in den transgenen Tieren festgestellt $(1734 \pm 144,2 \text{ pg/ml SHRSP-ACE2 vs. } 1352 \pm 151,9 \text{ pg/ml; } P=0,08)$.

3.1.6. Bestimmung der Reninaktivität und -konzentration

Überdies wurde auch die Reninaktivität sowie dessen Konzentration bestimmt. Dabei traten keine signifikanten Unterschiede auf, aber sowohl Konzentration $(5,3 \pm 1,3 \text{ ng/ml/h SHRSP-ACE2 vs. } 3,1 \pm 0,8 \text{ ng/ml/h SHRSP; } P=0,20)$ als auch Aktivität $(2428 \pm 280,8 \text{ pg/ml/h SHRSP-ACE2 vs. } 2223 \pm 250,5 \text{ pg/ml/h SHRSP; } P=0,59)$ waren in den transgenen SHRSP-ACE2 Tieren im Vergleich zu den Kontrollen tendenziell höher (Abbildung 17).

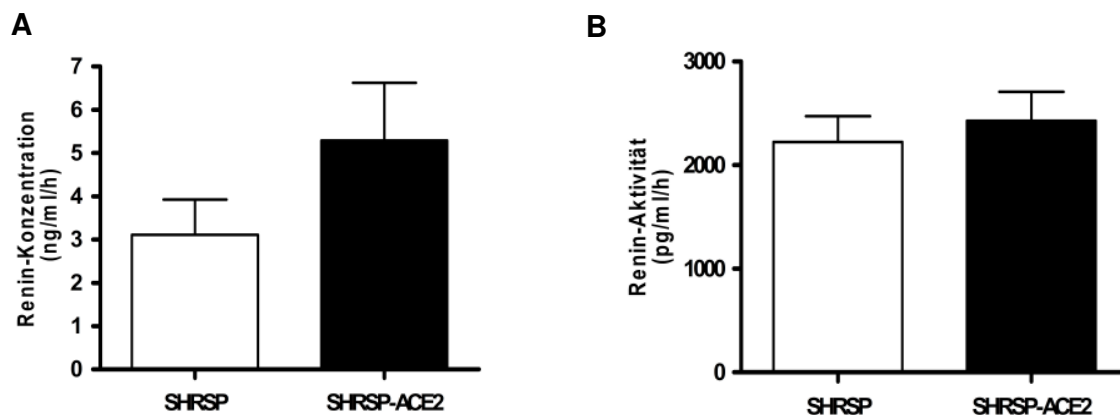


Abbildung 17: Messung der Reninkonzentration und Aktivität.

Die Reninkonzentration (A) und die Reninaktivität (B) sind leicht, aber nicht signifikant, erhöht in den SHRSP-ACE2 Tieren. Gezeigt sind die Daten mit dem Standardfehler des Mittelwertes. (n = 7-12 Tiere pro Gruppe).

3.1.7. Peptidkonzentrationen sowie Reninwerte in den SD-ACE2 Ratten

Es wurden auch die Peptidkonzentrationen in Plasmaproben von SD-ACE2 Ratten sowie SD Kontrollen gemessen (Abbildung 18). Dabei zeigten sich im Vergleich zu den SHRSP-ACE2 Ratten und deren Kontrollen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Interessanterweise konnte man hier keinen Unterschied in der Ang-(1-7) Konzentration zwischen den transgenen Tieren und den Kontrollen finden $(4,05 \pm 0,27 \text{ pg/ml SD-}$

ACE2 vs. $5,14 \pm 0,53$ pg/ml SD; $P= 0,14$). Hingegen wiesen die SD-ACE2 Tiere aber eine signifikante Reduktion von Ang I auf ($898,5 \pm 162,7$ pg/ml SD-ACE2 vs. $1508 \pm 157,2$ pg/ml SD) und sie zeigten ferner eine leichte, aber nicht signifikante, Reduktion von Ang II im Vergleich zu den Kontrollen ($34,13 \pm 6,9$ pg/ml SD-ACE2 vs. $42,28 \pm 15,66$ pg/ml SD; $P=0,58$).

Somit scheint es, dass in diesem normotensiven Background ACE2 vorwiegend Ang I spaltet. Folglich kann sich auch die Ang II Konzentration tendenziell verringern, aber nicht da es zu Ang-(1-7) abgebaut wird, sondern da für ACE weniger Substrat zur Verfügung steht.

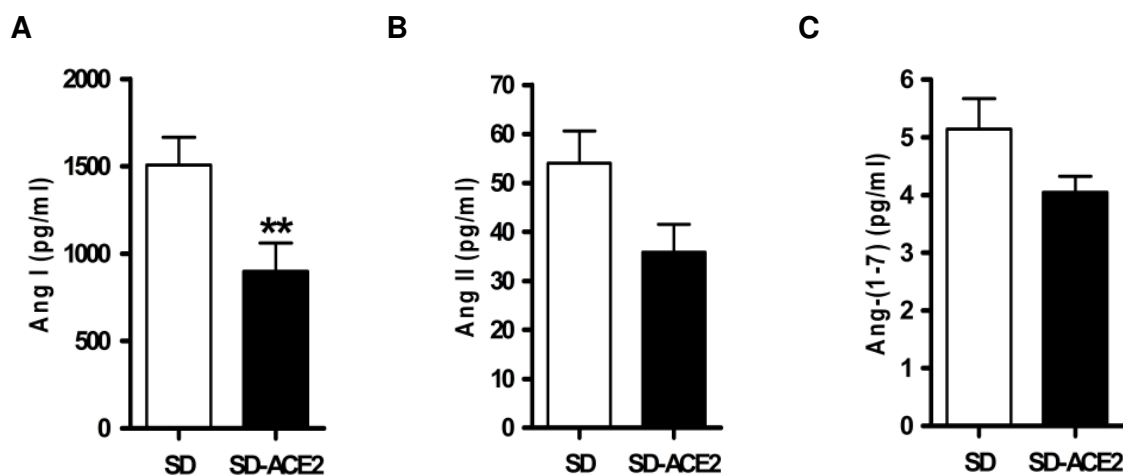


Abbildung 18: Messung der Peptidkonzentrationen mittels Radioimmunoassay.

Messung der (A) Ang I Konzentration, (B) der Ang II Konzentration und (C) der Ang-(1-7) Konzentration im Plasma von SD und SD-ACE2 Ratten. Dargestellt sind die Daten mit dem Standardfehler des Mittelwertes. ** $P < 0,01$ ($n = 8-11$ Tiere pro Gruppe).

Auch der Vergleich der Reninkonzentration ($10,66 \pm 3,2$ ng/ml/h SD-ACE2 vs. $17,8 \pm 2,1$ ng/ml/h SD) und Aktivität ($1188 \pm 237,4$ pg/ml/h SD-ACE2 vs. $2490 \pm 315,4$ pg/ml/h SD) zwischen SD-ACE2 und SD Kontrollen erbrachte sehr unterschiedliche Resultate verglichen mit dem Verhältnis zwischen SHRSP-ACE2 und deren Kontrollen. Hierbei zeigte sich in beiden Messungen eine signifikante Reduktion in den transgenen SD-ACE2 Ratten verglichen mit den SD Kontrollen (Abbildung 19).

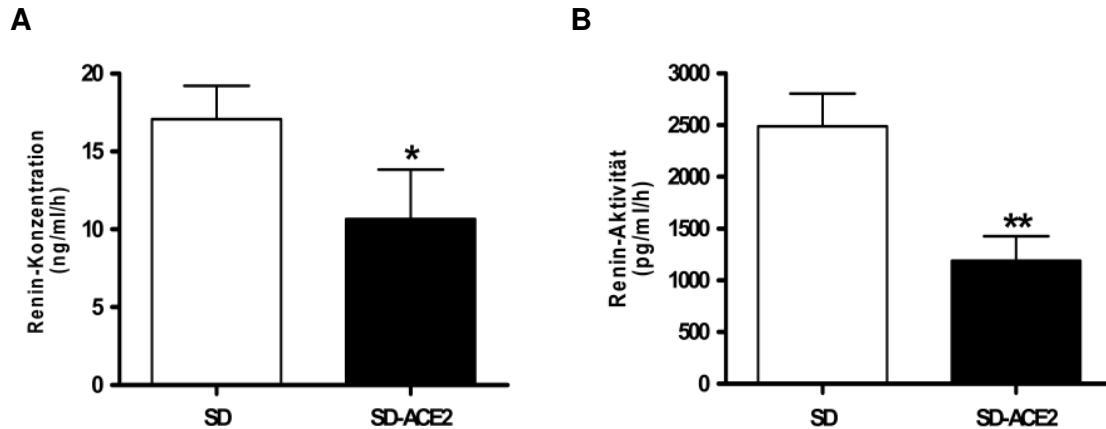


Abbildung 19: Messung der Reninkonzentration und Aktivität im Plasma von SD-ACE2 und SD Ratten. Die Reninkonzentration (A) und die Reninaktivität (B) sind signifikant reduziert in den SD-ACE2 Ratten im Vergleich zu den SD Ratten. Dargestellt sind die Daten mit dem Standardfehler des Mittelwertes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n = 7-11$ Tiere pro Gruppe).

Abschließend ist noch hinzuzufügen, dass in der vorliegenden Arbeit immer nur die Verhältnisse der transgenen Tiere zu deren Kontrollen betrachtet wurden. Die Werte der Peptidkonzentrationen sowie die Renindaten sind nicht direkt vergleichbar zwischen den Ratten mit SHRSP - Hintergrund und denen mit SD - Hintergrund, da diese nicht zur gleichen Zeit durchgeführt wurden. Die für die Messungen verwendeten Radioimmunoassays sind an den Gebrauch von radioaktiven Isotopen gebunden und die erhaltenen Daten sind daher stark abhängig vom Zustand der benutzten Radioaktivität.

3.1.8. Blutdruckmessung

Ang II ist einer der bedeutendsten Vasokonstriktoren und Ang-(1-7) wird eine vasodilatatorische Funktion zugeschrieben. Daher war zu erwarten, dass Veränderungen der Peptidlevel im Plasma auch Veränderungen des Blutdrucks bewirken. Demzufolge wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) in wachen Tieren mittels eines intraarteriellen Katheters gemessen. Dabei wurde ein signifikant erniedrigter Blutdruck in den SHRSP-ACE2 Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt (Tabelle 1 und Abbildung 20). Im Vergleich dazu zeigte sich zwischen den SD-ACE2 Tieren und deren Kontrollen kein signifikanter Unterschied im MAP. Allerdings war der diastolische Blutdruck signifikant erniedrigt in den transgenen SD

Ratten. Ferner wurde sowohl in den SHRSP als auch in den SD Ratten kein Unterschied in der Herzfrequenz festgestellt.

	SHRSP	SHRSP-ACE2	SD	SD-ACE2
MAP (mmHg)	149 ± 3,3	135 ± 1,8 ***	121 ± 3,3	113 ± 2,1
SBP (mmHg)	188 ± 3,7	174 ± 2,7 **	154 ± 3,0	150 ± 3,4
DBP (mmHg)	129 ± 3,4	115 ± 1,4 ***	104 ± 3,5	94 ± 1,8 *
HR (BPM)	342 ± 7,2	344 ± 6,1	372 ± 9,3	371 ± 19,0

Tabelle 1: Blutdruckwerte und Herzfrequenz von SHRSP-ACE2 und SD-ACE2 Ratten sowie deren Kontrollen. MAP, mittlerer Blutdruck; SBP, systolischer Blutdruck; DBP, diastolischer Blutdruck; HR, Herzfrequenz. Die Daten sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes aufgelistet. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (n = 12-13 SHRSP / SHRSP-ACE2 bzw. n = 5-6 SD / SD-ACE2 Ratten).

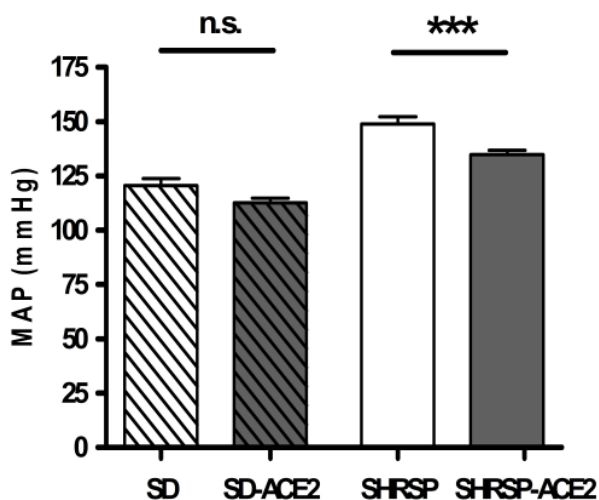


Abbildung 20: Basaler Blutdruck der SD-ACE2 und der SHRSP-ACE2 Ratten sowie deren Kontrollen.
n.s., nicht signifikant; ***P<0.001

3.1.9. Messung der vasokonstriktorischen Reaktion nach Ang II Gabe

Eine erhöhte ACE2 Expression sollte eine schnellere Degradation von Ang II und damit auch eine veränderte Vasokonstriktionsstärke nach sich ziehen. Um dies zu prüfen, wurde die Wirkung von Ang II in vivo gemessen. Dafür wurden 100 ng/kg Ang II intraarteriell injiziert und anschließend der Blutdruck bestimmt (Abbildung 21).

Im Vergleich zu den Kontrollen war die vasokonstriktorische Reaktion in den SHRSP-ACE2 Tieren signifikant vermindert ($13,1 \pm 1,9$ mmHg SHRSP-ACE2 vs. $26,8 \pm 2,9$ mmHg SHRSP). Um die Rolle der ACE2 Überexpression in Bezug auf diesen Effekt zu bestimmen, wurde dieses Experiment unter Benutzung eines spezifischen ACE2

Inhibitors (N-[2-(1-aziridinyl)ethyl]-1,2-ethanediamine; 100 µg/kg) wiederholt. Dabei zeigte sich, wie erwartet, dass die Hemmung der ACE2 Aktivität die eingeschränkte Vasokonstriktion auf Ang II rückgängig machte ($29,3 \pm 1,9$ mmHg vs. $13,1 \pm 1,9$ mmHg ohne Inhibitor-Behandlung). Hingegen konnte in den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied in der Vasokonstriktionsstärke nach der Inhibitor-Behandlung festgestellt werden ($31,8 \pm 5,4$ mmHg vs. $26,8 \pm 2,9$ mmHg ohne Inhibitor-Behandlung).

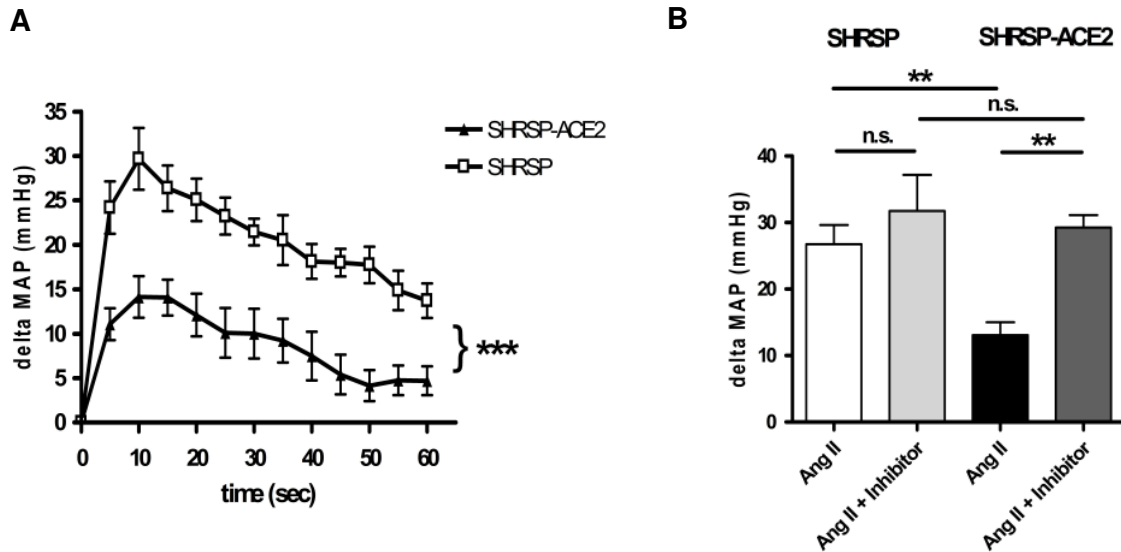


Abbildung 21: Messung der Blutdruckveränderung als Reaktion auf eine Ang II Gabe.

(A) Zeitabhängige Vasokonstriktion der SHRSP-ACE2 Ratten sowie deren Kontrollen nach einer Ang II Gabe (100 ng/kg) mittels einem intraarteriellen Katheter. (B) Diese Grafik stellt die ersten 15 Sekunden der Reaktion auf Ang II dar, wobei die Daten mit und ohne Vorbehandlung mit einem ACE2 Hemmer (100 µg/kg) gezeigt werden. Die Daten sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. **P<0.01 (n = 3-9 Tiere je Gruppe).

Diese vasokonstriktive Reaktion auf Ang II wurde auch bei den SD Tieren bestimmt, wobei hier die Verabreichung intravenös erfolgte. Wie in der Abbildung 22 zu sehen ist, konnte auch hier eine Herabsetzung der Vasokonstriktion in den transgenen SD-ACE2 Ratten im Vergleich zu den SD Kontrollen beobachtet werden ($24,9 \pm 2,5$ mmHg SD-ACE2 vs. $39,2 \pm 1,1$ mmHg SD). Des Weiteren war auffällig, dass die normotensiven SD Ratten eine wesentlich stärkere Reaktion auf Ang II zeigten als die hypertensiven SHRSP Ratten. Eine mögliche Begründung dafür könnte der bereits bestehende höhere Gefäßtonus in den SHRSP Ratten sein, was letztendlich die Blutdruckänderung nach Ang II Gabe in diesen Tieren verglichen mit den SD Ratten geringer ausfallen lässt.

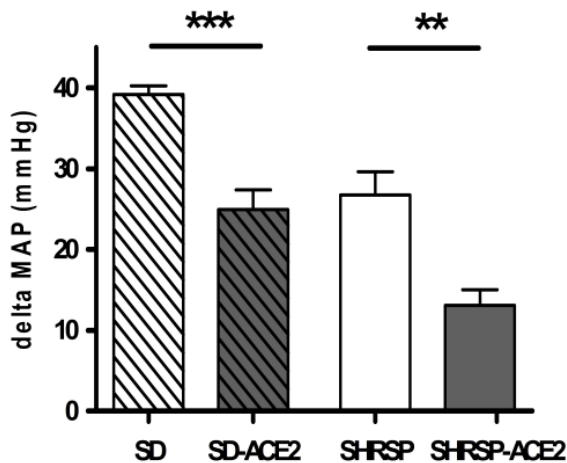


Abbildung 22: Die Auswirkung der ACE2 Überexpression auf die Wirkung einer Ang II Gabe. Die Grafik zeigt die Blutdruckänderung nach Ang II Gabe bei SD-ACE2 und SHRSP-ACE2 Ratten sowie den entsprechenden Kontrollen. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Vasokonstriktion in den transgenen Ratten. Die Ergebnisse sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. **P = 0,01; ***P = 0,001 (n = 3-9 SHRSP / SHRSP-ACE2 bzw. n = 5-6 SD / SD-ACE2 Ratten).

Um aufzuklären, inwiefern die erhöhte Ang-(1-7) Produktion an der Blutdruckregulation der transgenen SHRSP Ratten sowie an der vasokonstriktorischen Reaktion nach Ang II Gabe beteiligt ist, wurde der Ang-(1-7) Rezeptor Mas geblockt. Dafür wurde eine einwöchige Infusion des Ang-(1-7)-Antagonisten A-779 (100 ng/kg/min) mittels osmotischer Minipumpen durchgeführt. Nach dieser Woche wurde dann der Blutdruck mittels eines intraarteriellen Katheters gemessen sowie die durch Ang II Gabe ausgelöste Vasokonstriktion bestimmt (Abbildung 23).

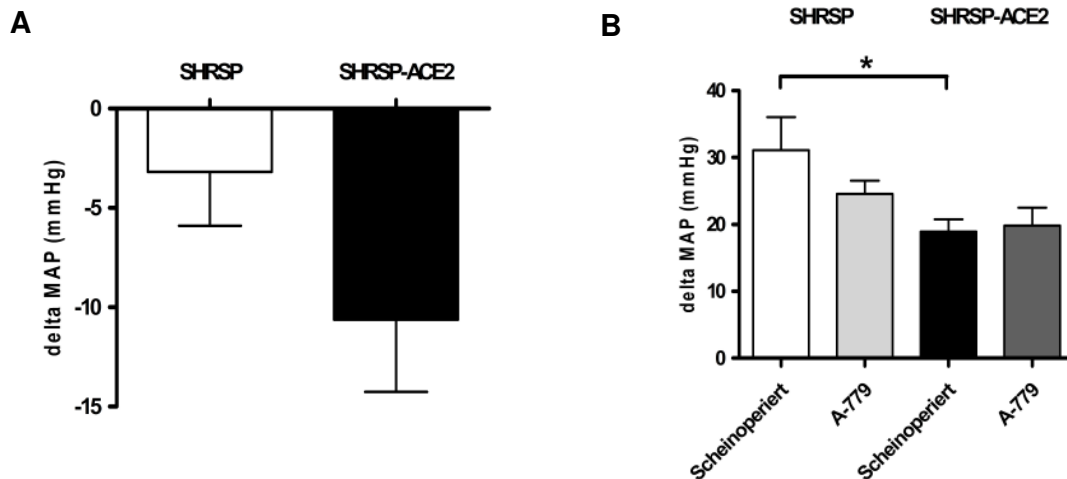


Abbildung 23: Wirkung einer chronischen Gabe des Ang-(1-7)-Antagonisten A-779.

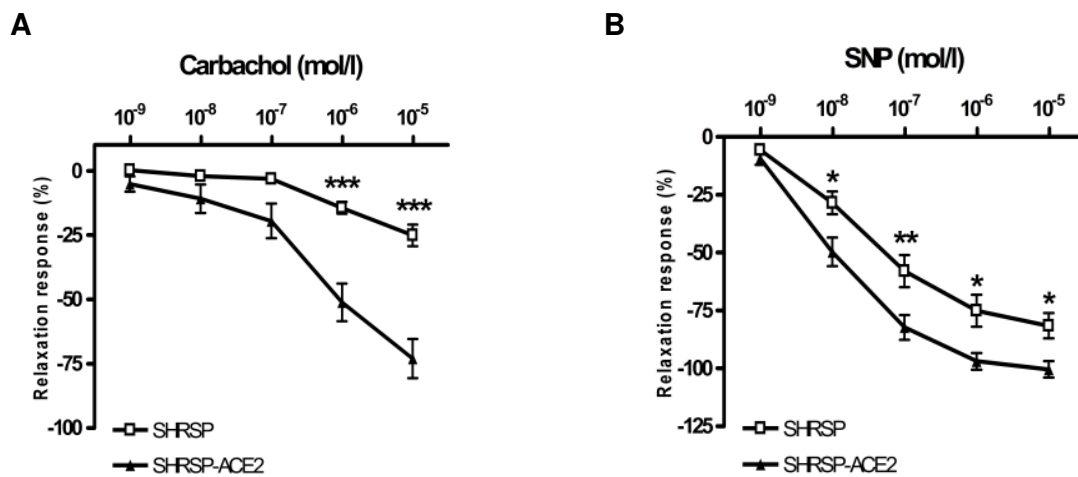
(A) Auswirkung auf den Blutdruck. Dargestellt ist die Veränderung des Blutdrucks nach einer einwöchigen Infusion von A-779 (100 ng/kg/min) mittels osmotischer Minipumpen. Dafür wurde vom gemittelten Blutdruckwert der A-779 behandelten Tiere der der Scheinoperierten abgezogen. (B) Auswirkung auf die Vasokonstriktion nach Ang II Gabe. Dafür wurden 100 ng/kg Ang II intraarteriell injiziert und nachfolgend der Blutdruck gemessen. *P = 0,05 (n = 5 Tiere je Gruppe).

Die Gabe des Antagonisten führte weder zu einer signifikanten Blutdruckerhöhung noch zu einer veränderten vasokonstriktorischen Reaktion auf Ang II Gabe. Somit scheint es, dass die Degradierung von Ang II wichtiger als die Produktion von Ang-(1-7) ist, zumindest für die Regulation des Blutdrucks.

3.1.10. Messungen der Endothelfunktion

SHRSP Ratten entwickeln sehr früh eine endotheliale Dysfunktion. Diese zeichnet sich vor allem durch eine gestörte endothelabhängige Vasodilatation aus, wobei als Ursache vor allem eine verminderte NO-Aktivität oder NO-Verfügbarkeit vermutet wird.

Um die Rolle von ACE2 in diesen Prozess zu ermitteln, wurde die vaskuläre Reaktivität der Aorta gemessen. Dafür wurden Organbad-Präparationen mit Segmenten der thorakalen Aorta durchgeführt (Abbildung 24). Dabei zeigte sich bei Gabe des endothelabhängigen Vasodilatators Carbachol eine stärkere Relaxation in den transgenen Tieren im Vergleich zu den Kontrollen. Die endothelunabhängige Relaxation auf SNP war dagegen nur geringfügig in den SHRSP-ACE2 Ratten erniedrigt. Um schließlich die Endothelfunktion zu ermitteln, wurden die durch Carbachol erhaltenen Daten mit denen von SNP normalisiert. Die dadurch erhaltene Endothelfunktion ist in den transgenen Tieren signifikant verbessert und somit scheint durch die Überexpression von ACE2 die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion minimiert zu sein.



C

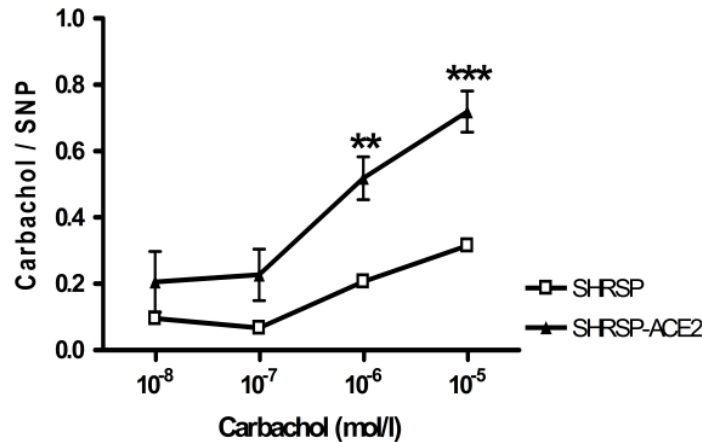


Abbildung 24: Messung der Endothelfunktion in vitro.

Konzentrationsabhängige Relaxationsreaktion von Segmenten der thorakalen Aorta auf den endothelabhängigen Vasodilatator Carbachol (A) und auf den endothelunabhängigen Vasodilatator SNP (B). Die Segmente wurden zuvor mit Phenylephrin (1 µmol/L) kontrahiert. Auf dem Plateau der Kontraktion gab man kumulative Konzentrationen von Carbachol oder SNP (1 nmol/L - 10 µmol/L) dazu und die Vasorelaxation zu jeder Konzentration des Vasodilatators wurde prozentual zur maximalen Vasokonstriktion kalkuliert. (C) Gezeigt ist die vaskuläre Reaktion auf Carbachol normalisiert durch SNP, was die eigentliche Endothelfunktion darstellt. Die Daten sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes gezeigt. **P<0.01, ***P<0.001 (n = 7-8 Tiere je Gruppe).

Um diese in vitro Daten zu bestätigen, wurde die Endothelfunktion auch in vivo bestimmt (Abbildung 25). Dafür wurden die Veränderungen des Blutdrucks, welche durch die Gabe des endothelunabhängigen Vasodilatators SNP sowie des endothelabhängigen Vasodilatators Acetylcholin (ACh) hervorrufen wurden, gemessen. Diese Substanzen wurden in die absteigende thorakale Aorta mittels eines Katheters injiziert, welcher über die Karotis eingeführt wurde. Dabei verursachte die direkte Verabreichung von ACh in das arterielle System keinen direkten kardialen Effekt (Abbildung 25D). Das zuvor befürchtete Auftreten einer Bradykardie wurde offensichtlich durch die schnelle Degradation von ACh verhindert. Hingegen konnte sogar eine leichte, durch den Baroreflex induzierte, Tachykardie beobachtet werden.

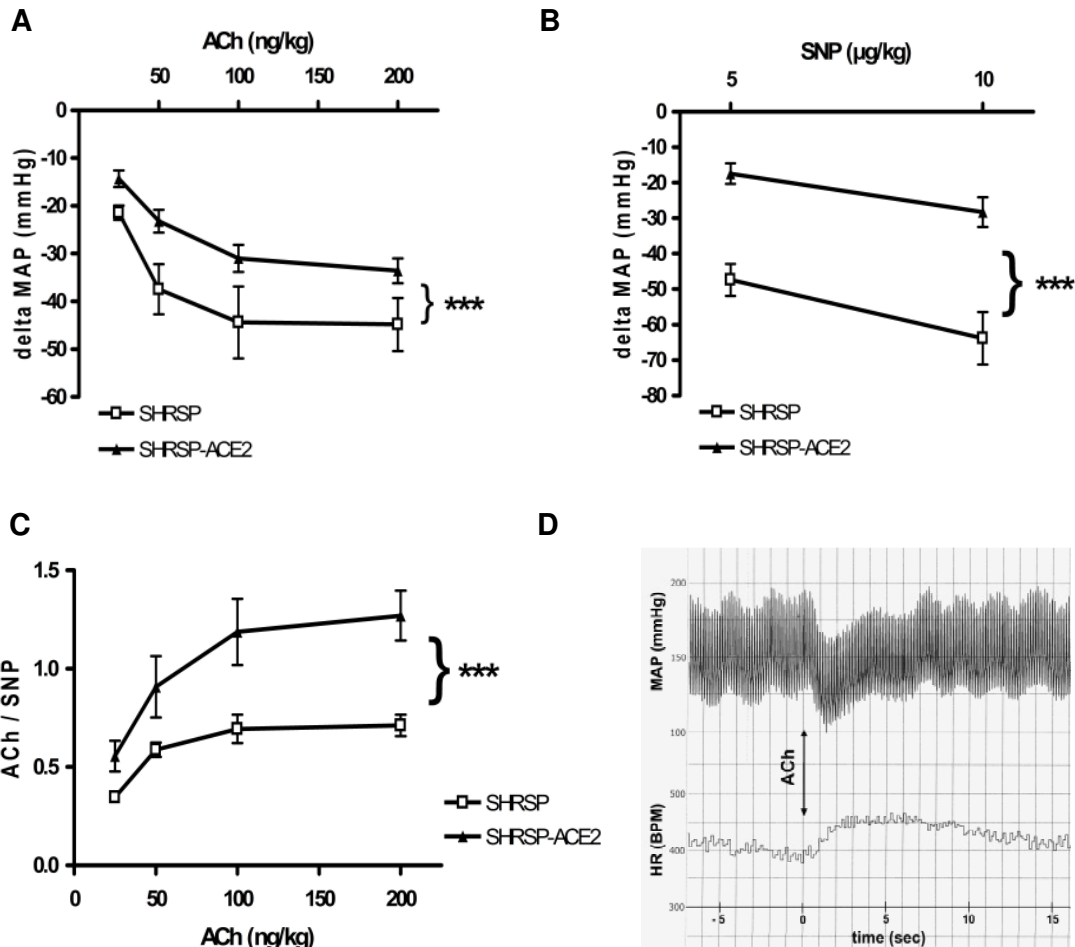


Abbildung 25: In vivo Bestimmung der Endothelfunktion in SHRSP Ratten.

Die vasodilatatorische Reaktion auf kumulative Konzentrationen des endothelabhängigen Vasodilators ACh (25 – 200 ng/kg) (B) und des endothelunabhängigen Vasodilators SNP (5 und 10 µg/kg). (C) Zeigt die resultierende Endothelfunktion (EF), welche mit der folgenden Formel berechnet wurde: $EF = \Delta MAP(ACh) / \Delta MAP(SNP)$. Dabei wurden die Werte der 10 µg/µl SNP Gabe genutzt. (D) Originalausschnitt der Messdaten, den mittleren Blutdruck (MAP) und Herzfrequenz (HR) nach der Gabe von ACh zeigend. Dabei wurde keine Bradykardie, aber eine kurze, Baroreflex induzierte, Tachykardie beobachtet. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler von 6 Ratten in jeder Gruppe dar. ***P ≤ 0.001.

In den Abbildungen 25A und B sind die vasodilatatorischen Reaktionen auf SNP und ACh Gabe dargestellt. Dabei konnte in den SHRSP Kontrollen eine stärkere Reaktion auf beide Substanzen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist der bereits verminderte Tonus der glatten Gefäßmuskulatur in den transgenen Tieren, welcher sich auch in dem verringerten MAP dieser Tiere widerspiegelt. Um nun auch hierbei den tatsächlichen vasodilatatorischen Effekt zu erhalten, wurde ebenfalls die Endothelfunktion (EF) ermittelt, wobei folgende Formel verwendet wurde: $EF = \Delta MAP$

(ACh) / Δ MAP (SNP). Darüber konnten die durch ACh erhaltenen Daten mit denen von SNP normalisiert werden. Die berechnete Endothelfunktion offenbarte eine signifikante Verbesserung in den transgenen Ratten im Vergleich zu den Kontrollen. Dies stimmte ferner überein mit den erhaltenen Daten der in vitro Analyse der vaskulären Reaktivität. Des Weiteren wurde noch die Endothelfunktion in Reaktion auf den Vasodilatator BK bestimmt, wobei ähnliche Ergebnisse beobachtet wurden (Abbildung 26).

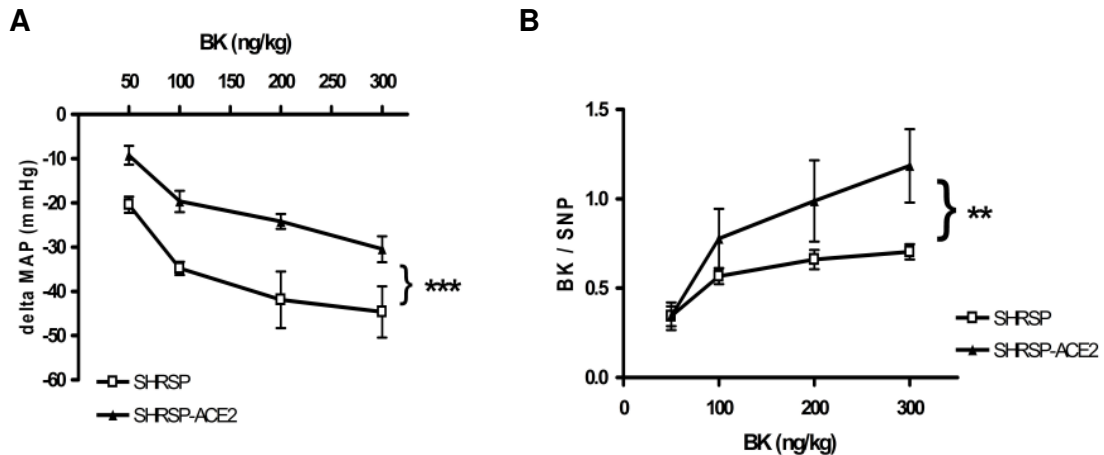


Abbildung 26: Ermittlung der Endothelfunktion mithilfe von BK.

(A) Die vasodilatatorische Reaktion auf kumulative Konzentrationen des endothelabhängigen Vasodilatators BK (50-300 ng/kg). (B) Die Endothelfunktion berechnet via $EF = \Delta MAP (BK) / \Delta MAP (SNP)$, wobei die Werte nach Gabe von 10 μ g/ μ l SNP benutzt wurden. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler dar (n = 6 Tiere pro Gruppe). **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001.

Auch in den transgenen SD-ACE2 Tieren wurde die Endothelfunktion in vivo bestimmt (Abbildung 27). Hierbei konnte aber in den transgenen Ratten im Vergleich zu den SD Kontrollen eine stärkere Vasodilatation in Reaktion auf eine ACh Gabe beobachtet werden. Die Reaktionen auf SNP waren hingegen bei diesen Rattenlinien sehr ähnlich. Interessanterweise konnte zwischen den SD-ACE2 Tieren und ihren Kontrollen kein signifikanter Unterschied im MAP gefunden werden (Abschnitt 3.1.8.). Das bedeutet, dass diese Ratten in der Gefäßmuskulatur den gleichen Grundtonus aufweisen wie deren SD Kontrollen. Daher ist die verbesserte Endothelfunktion bereits schon ohne Normalisierung mittels der SNP Daten zu sehen.

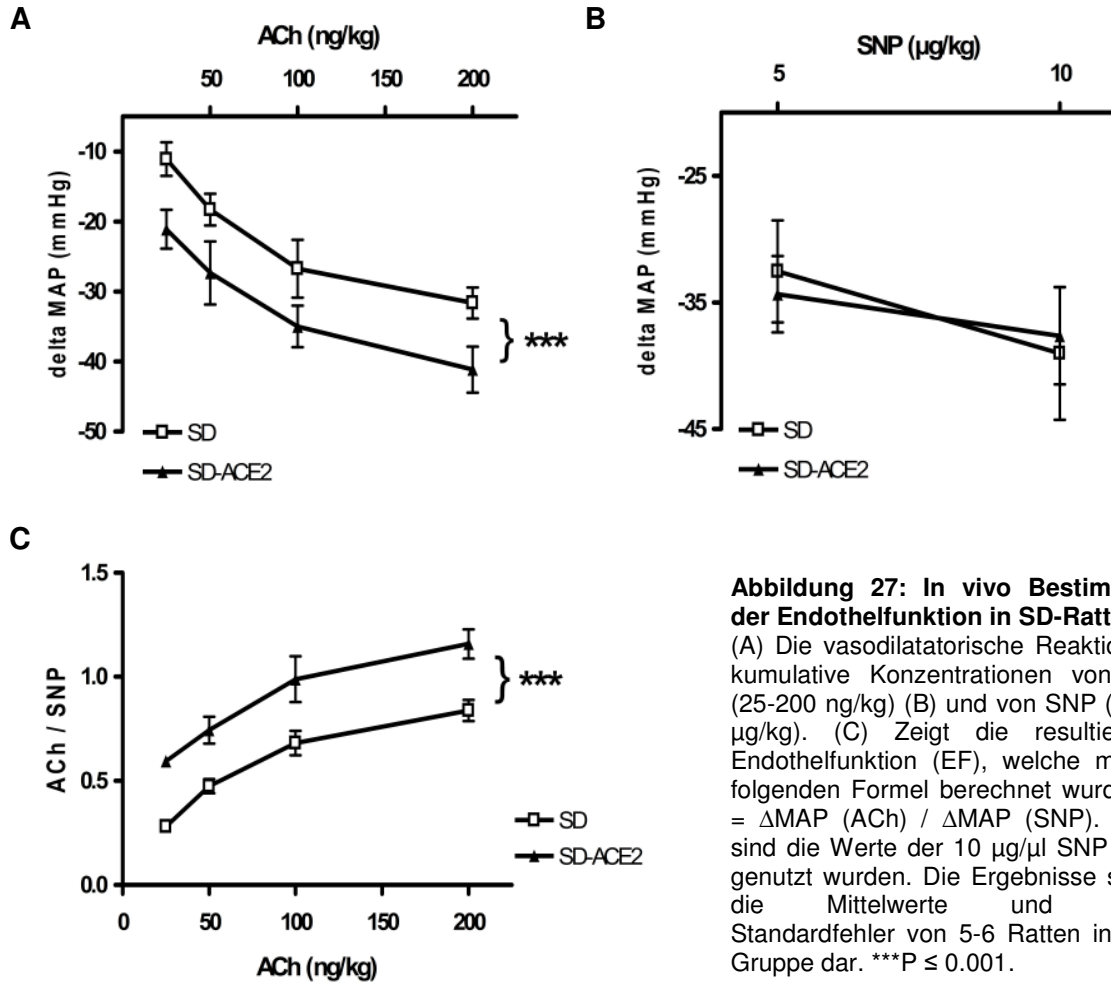


Abbildung 27: In vivo Bestimmung der Endothelfunktion in SD-Ratten.

(A) Die vasodilatatorische Reaktion auf kumulative Konzentrationen von ACh (25-200 ng/kg) (B) und von SNP (5 / 10 µg/kg). (C) Zeigt die resultierende Endothelfunktion (EF), welche mit der folgenden Formel berechnet wurde: $EF = \Delta MAP (ACh) / \Delta MAP (SNP)$. Dabei sind die Werte der 10 µg/µl SNP Gabe genutzt wurden. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler von 5-6 Ratten in jeder Gruppe dar. ***P ≤ 0.001.

3.1.11. Messung von NO sowie von den reaktiven Sauerstoffspezies

NO, dass aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird, stellt den bedeutendsten Vasodilatator des Körpers dar. Des Weiteren ist es beteiligt an der Hemmung der Adhäsion der Thrombozyten und Monozyten an der Gefäßwand sowie der Hemmung der Proliferation der glatten Muskelzellen. Ist dessen Verfügbarkeit minimiert, entweder durch eine verringerte Produktion oder durch den Abbau von NO durch reaktive Sauerstoffspezies, wie Superoxid oder Wasserstoffperoxid, wird die endothelabhängige Vasodilatation gestört und es entwickelt sich eine endotheliale Dysfunktion.

Da die transgenen SHRSP-ACE2 Ratten im Vergleich zu den Kontrollen eine verbesserte Endothelfunktion aufweisen, sollte auch ein Unterschied in der NO-Verfügbarkeit nachzuweisen sein. Um dies zu überprüfen, wurde den Ratten der NO-Synthase Inhibitor L-NAME intravenös verabreicht (30 mg/kg) und anschließend der

Blutdruck gemessen. Dieser Inhibitor hemmt die NO Produktion, was letztendlich in den Ratten zu einer Vasokonstriktion führt. Dabei sollte die hervorgerufene Blutdruckänderung größer in Tieren mit einer besseren NO-Verfügbarkeit bzw. einem niedrigeren Gefäßtonus sein.

In der Abbildung 28 ist die Änderung des Blutdrucks dargestellt, welche durch die L-NAME Gabe hervorgerufen wurde. Die transgenen SHRSP-ACE2 Ratten zeigten hierbei, verglichen mit den SHRSP Kontrollen, einen größeren Blutdruckanstieg ($46,55 \pm 2,49$ mmHg SHRSP-ACE2 vs. $27,68 \pm 5,15$ mmHg SHRSP). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in den transgenen Ratten mehr NO bereitgestellt wird. Überdies stimmt das überein mit den erniedrigten MAP in diesen Tieren. Ferner bestätigt es die Annahme, dass die schwächere vasodilatatorische Reaktion der SHRSP-ACE2 Ratten in Bezug auf die ACh Gabe auf einem bereits verminderten Tonus der glatten Gefäßmuskulatur beruht.

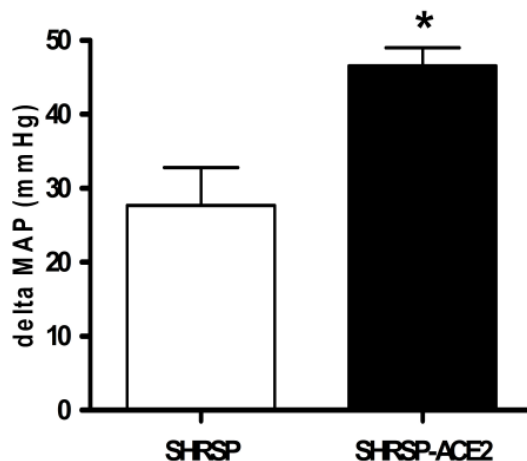


Abbildung 28: Auswirkung der Gabe von L-NAME auf den Blutdruck.

L-NAME, ein NO-Synthase Inhibitor, wurde den SHRSP-ACE2 Ratten sowie deren Kontrollen intravenös verabreicht. Dabei zeigte sich eine signifikantere Blutdruckerhöhung in den transgenen Tieren. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler dar. * $P \leq 0.05$ (n = 4 Ratten pro Gruppe).

Des Weiteren wurde untersucht, ob die scheinbar verbesserte Verfügbarkeit von NO in den transgenen Ratten mit einer erhöhten Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zusammenhängt, wobei eine Real-time PCR anhand der cDNA von Aortenhomogenaten durchgeführt wurde (Abbildung 29A). Überdies wurde die NO-Konzentration im Plasma sowie die Konzentration von cGMP im Aortenhomogenat bestimmt. Letzteres wurde gemessen, da NO über eine Aktivierung der Guanylatzyklase die cGMP-Konzentration erhöht, was wiederum eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und folglich eine Vasodilatation hervorruft.

Bei keiner dieser Messungen wurde eine signifikante Änderung festgestellt, aber bei der NO ($21,93 \pm 4,51 \mu\text{M}$ SHRSP-ACE2 vs. $11,62 \pm 2,0 \mu\text{M}$ SHRSP; $P=0,056$) sowie der cGMP ($222,4 \pm 28,92 \text{ fmol/ml}$ SHRSP-ACE2 vs. $176,1 \pm 22,08 \text{ fmol/ml}$ SHRSP; $P=0,25$) Bestimmung wurden tendenziell höhere Konzentrationen in den SHRSP-ACE2 Ratten gefunden.

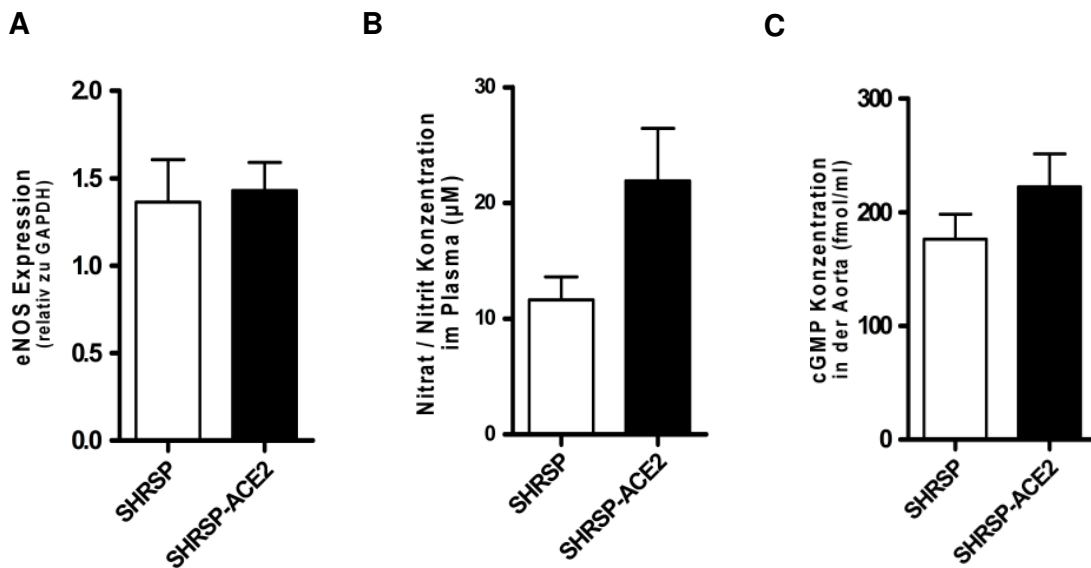


Abbildung 29: Bestimmung der eNOS – Expression sowie der NO- und cGMP- Konzentration von SHRSP-ACE2 Ratten und deren Kontrollen. (A) eNOS - Expression in der Aorta. Die Messung wurde mittels Real-time PCR durchgeführt, wobei die Expression von jeder Probe in Bezug auf die GAPDH mRNA, als Referenzgen, normalisiert wurde. ($n = 5$ Tiere pro Gruppe) (B) Ermittlung der NO - Konzentration im Plasma mittels eines Griess-Assays. Dabei wurden die physiologischen Endprodukte von NO, Nitrat und Nitrit, gemessen. ($n = 5$) (C) cGMP – Konzentration in Aortenhomogenaten ($n = 7-9$). Die angegebenen Daten stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler dar.

Eine weitere Erklärung für die verbesserte endotheliale Funktion der transgenen Tiere könnte in der Verringerung der oxidativen Inaktivierung von NO liegen. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde daher begonnen, die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies zu untersuchen. Dafür wurde zum einen die Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) und zum anderen die Lipidperoxidation bestimmt (Abbildung 30). Letztere stellt ein Indiz für einen oxidativen Stress in Zellen bzw. im Gewebe dar und kann mithilfe des TBAR Assays, bei dem man ein natürlich vorkommendes Produkt dieser Lipidperoxidation misst, bestimmt werden. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied in den SHRSP-ACE2 Ratten im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt.

Dagegen konnte bei der Bestimmung der Aktivität der SOD, ein Enzym, welches die Zellen vor der reaktiven Sauerstoffverbindung Superoxid schützt, indem es dieses weiter abbaut, kein Unterschied zwischen den transgenen Tieren und den Kontrollen gefunden werden. Um letztendlich eine eindeutige Aussage treffen zu können, müssen aber noch mehr Komponenten, wie die Katalase oder O_2^- , bestimmt werden.

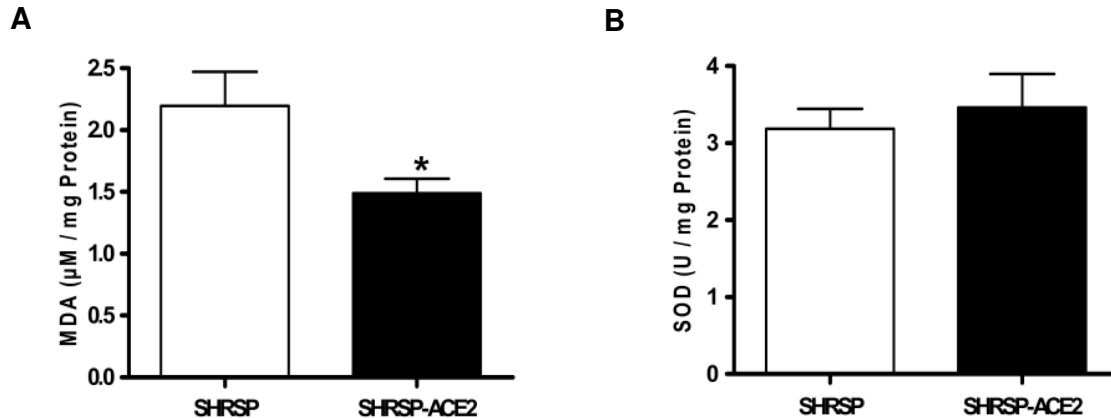


Abbildung 30: Lipidperoxidation und SOD-Aktivität in den SHRSP-ACE2 Ratten und deren Kontrollen. (A) Messung der Lipidperoxidation in Plasmaproben mittels des TBAR Assays, in dem ein natürlich vorkommendes Produkt, Malondialdehyd, bestimmt wurde. (n=7 Tiere je Gruppe) (B) Bestimmung der SOD-Aktivität in Aortahomogenaten (n= 6 Tiere je Gruppe). Die angegebenen Daten stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler dar. *P ≤ 0.05

3.1.12. Kardiale Veränderungen in den SHRSP-ACE2 Ratten

Im Vergleich zu normotensiven Ratten weisen SHRSP Ratten sehr früh strukturelle Veränderungen im Herzen auf. So kann eine chronische Druck- oder Volumenbelastung eine kardiale Hypertrophie hervorrufen, welche sich durch eine Zunahme der Masse des Herzmuskels auszeichnet. Davon betroffen ist vor allem der linke Ventrikel, da dieser versucht, die infolge einer Nachlasterrhöhung gesteigerte Wandspannung zu senken und die Pumpfunktion aufrechtzuerhalten.

Um den Einfluss einer ACE2 Überexpression auf dieses sogenannte „Remodeling“ zu ermitteln, wurde die kardiale Hypertrophie sowie der Fibrosestatus bestimmt. Dabei erfolgte die Detektion einer Hypertrophie durch die Messung der Herzkammerngewichte, wobei die Herzkammern von 5 Monaten alten Ratten analysiert wurden. Da das Körpergewicht von den transgenen Tieren im Vergleich zu gleich alten Kontrolltieren aber signifikant erhöht war ($388 \pm 11,9$ g SHRSP-ACE2 vs. 283 g \pm 4,2 g SHRSP;

***P<0.001), wurden diese Gewichte in Relation zum Körpergewicht gesetzt. So wurde das Verhältnisses von Herzgewicht (HG) zu Körpergewicht (KG) sowie das Gewicht des linken Ventrikels (LV) und des rechten Ventrikels (RV) zum Körpergewicht berechnet (Abbildung 31).

Dabei zeigte sich, dass das relative Herzgewicht in den SHRSP-ACE2 Ratten um 16% erniedrigt war ($3,1 \pm 0,08$ mg/g SHRSP-ACE2 vs. $3,7 \pm 0,03$ mg/g SHRSP). Ausschlaggebend schien dabei vor allem die geringere Zunahme des linken Ventrikelgewichts, welches durch das signifikant herabgesetzte Verhältnis von LV zu KG in diesen Tieren erkennbar war ($2,4 \pm 0,08$ mg/g SHRSP-ACE2 vs. $3,0 \pm 0,03$ mg/g SHRSP) Im Gegensatz dazu zeigte aber das relative Gewicht des RV keinen Unterschied zwischen transgenen Ratten und Kontrolltieren ($0,67 \pm 0,03$ mg/g SHRSP-ACE2 vs. $0,67 \pm 0,02$ mg/g SHRSP). Dies deutet eindeutig auf eine Entwicklung einer kardialen Hypertrophie bei den SHRSP Kontrolltieren hin und auf eine Einschränkung dieses Effekts in den Ratten mit ACE2 Überexpression.

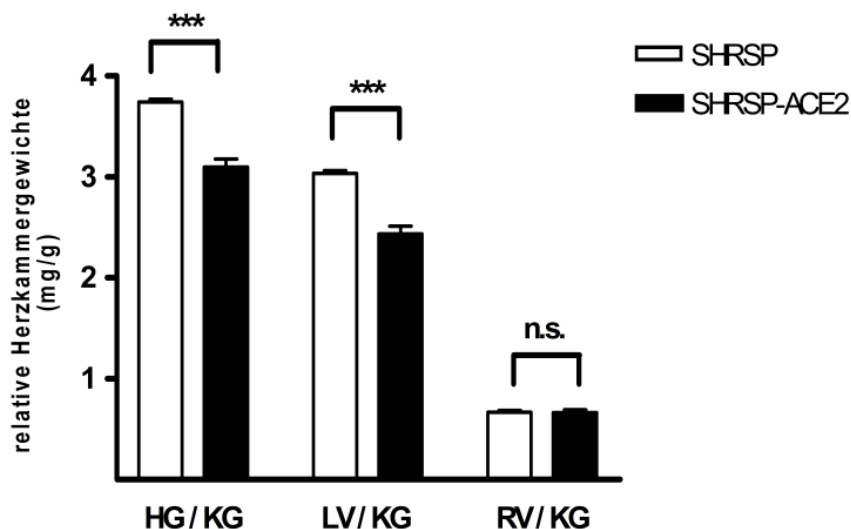


Abbildung 31: Graphische Darstellung der relativen Herzkammengewichte in den SHRSP-ACE2 Ratten im Vergleich zu den SHRSP Kontrollen. Berechnet wurde das Verhältnis von Herzgewicht (HG) zu Körpergewicht (KG) sowie vom Gewicht des linken Ventrikels (LV) und des rechten Ventrikels (RV) zum Körpergewicht. Die Daten sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. ***P<0.001 (n = 11-12 Tiere je Gruppe).

Ferner wurde eine histologische Untersuchung des Herzgewebes durchgeführt, um die Bildung von Fibrose in den SHRSP-ACE2 Ratten mit den SHRSP Kontrollen zu vergleichen (Abbildung 32).

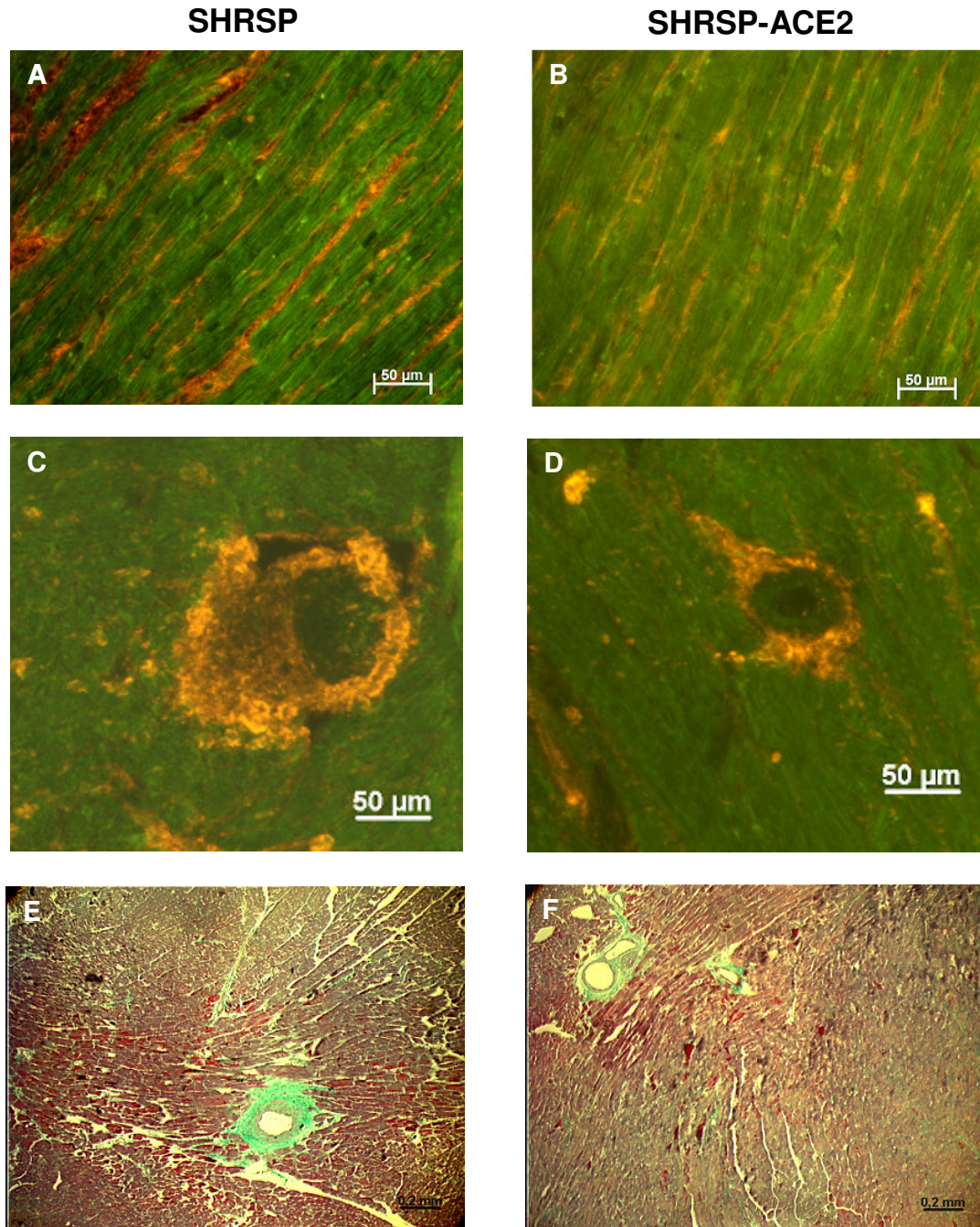


Abbildung 32: Histologische Untersuchung des Herzens.

A+B) Färbung des Fibronektins, einem Markerprotein für Fibroblasten, welches das interstitielle Bindegewebe anzeigt. C+D) Collagen I Färbung, dient der Sichtbarmachung des perivaskulären Bindegewebes. E+F) Masson - Goldner Trichromfärbung, in den Muskelfasern, Kollagenfasern, Fibrin und Erythrozyten selektiv dargestellt werden. Grün erscheint das kollagenhaltige Bindegewebe.

Dabei deuteten alle verwendeten Färbungen auf eine Abnahme der Fibrosebildung in den transgenen Ratten im Vergleich zu den SHRSP Tieren hin. Vor allem schien aber die perivaskuläre Fibrose in den SHRSP-ACE2 Tieren reduziert zu sein.

3.1.13. Messung der Nierenfunktion

Die renale Funktion wurde durch die Bilanzierung von Trinkmenge und Diurese sowie durch die Bestimmung von Kreatininclearance und Albuminkonzentration im 24h Sammelurin untersucht. Ferner wurde die Osmolarität des Urins bestimmt.

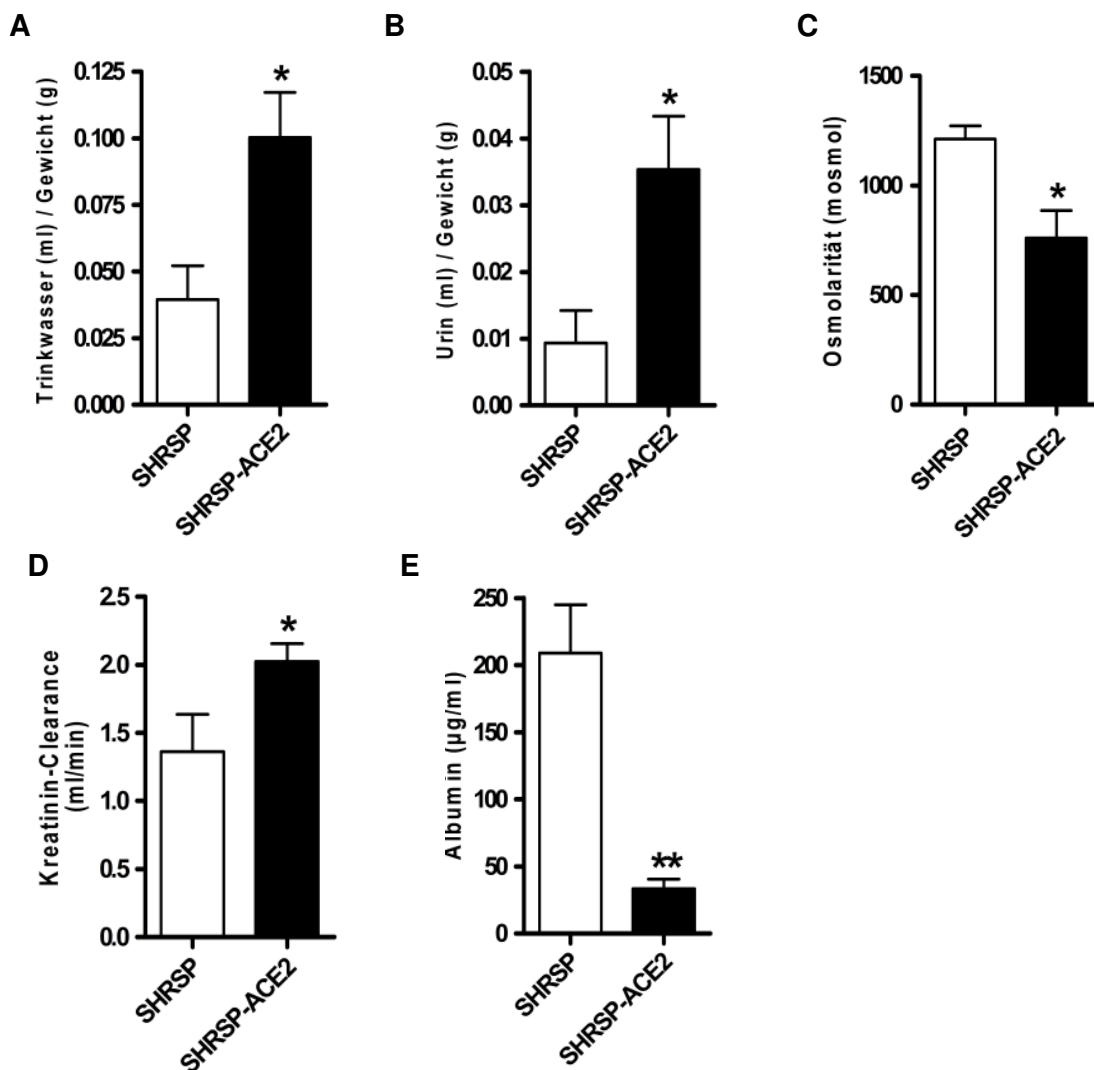


Abbildung 33: Messung verschiedener Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion von 5 Monate alten SHRSP-ACE2 Ratten und deren Kontrollen. Messung (A) des Trinkwassers von 24h normalisiert durch das Körpergewicht, (B) des Urinvolumens von 24h normalisiert durch das Körpergewicht und (C) der Osmolarität des 24h Sammelurins. Ferner die Bestimmung (D) der Kreatinin-Clearance sowie (E) der Albuminkonzentration im 24 h Sammelurin. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler dar. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (n = 6-9 Ratten pro Gruppe).

Die SHRSP-ACE2 Tiere wiesen eine signifikant höhere Urinausscheidung auf, welches ferner mit einer höheren Trinkwasseraufnahme sowie einer niedrigeren Osmolarität des Sammelurins assoziiert war (Abbildung 33). Somit scheint die ACE2 Überexpression einen diuretischen Effekt auszuüben. Des Weiteren wurde die glomeruläre Filtrationsrate mithilfe der Messung der Kreatininclearance bestimmt. Die Clearance gibt dabei das Plasmavolumen an, das pro Zeiteinheit von einer bestimmten Substanz (z.B. Kreatinin) befreit wird. Hierbei zeigten die transgenen Tiere, verglichen mit den SHRSP-Kontrollen, eine signifikante Erhöhung und somit eine Verbesserung der glomerulären Filtration. Ferner wiesen die SHRSP-ACE2 Ratten eine signifikant erniedrigte Albuminkonzentration im Urin auf, was ebenfalls ein Zeichen für eine verbesserte Nierenfunktion ist. So geht eine Nephrosklerose, welche als Folge einer arteriellen Hypertonie entsteht, oft mit einer Proteinurie einher und kann zu einer Niereninsuffizienz führen.

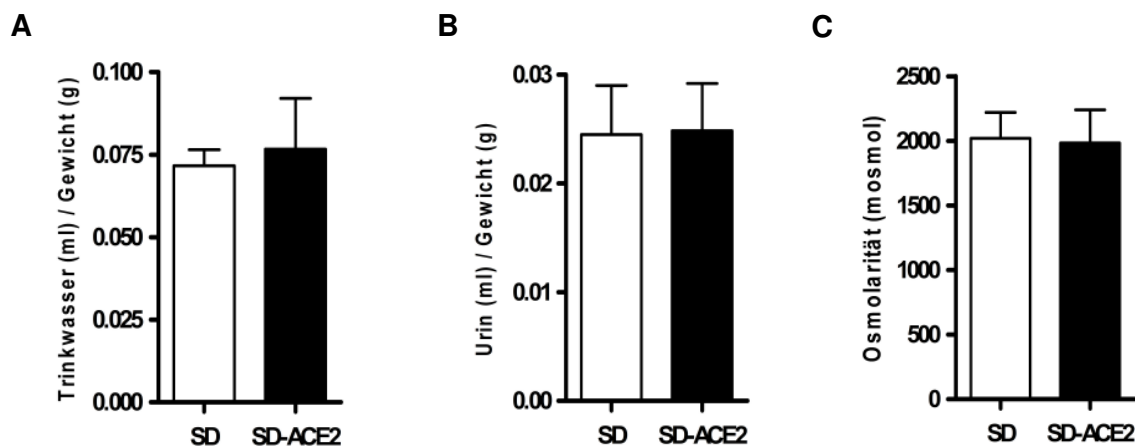


Abbildung 34: Messung verschiedener Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion von 5 Monate alten SD-ACE2 Ratten und deren Kontrollen. Bestimmung (A) der Trinkwassermenge von 24h normalisiert durch das Körpergewicht, (B) der Urinmenge von 24h normalisiert durch das Körpergewicht sowie (C) der Osmolarität des 24h Sammelurins. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler dar. (n = 4 Ratten pro Gruppe).

Im Vergleich zu den SHRSP-ACE2 Tieren wiesen die SD-ACE2 Ratten keinen erhöhten diuretischen Effekt auf. Im Alter von 5 Monaten war hier kein Unterschied im Urinvolumen oder in der Trinkwassermenge zwischen den transgenen und den Kontrollen zu beobachten (Abbildung 34).

3.2. Ang-(1-7) Überexpression

3.2.1. Klonierung des Transgenkonstrukts

Das Ziel war die Erzeugung von transgenen Ratten, in welchen die glatten Muskelzellen chronisch Ang-(1-7) sekretieren. Dafür wurde in das Genom der Tiere ein Ang-(1-7) produzierendes Fusionsprotein unter der Kontrolle des SMMHC (smooth muscle myosin heavy chain) -Promotors eingebracht. Dieses Fusionsprotein beinhaltet eine biologische Peptidpumpe, welche Ang-(1-7) befähigt in das endoplasmatische Retikulum transportiert und von dort aus der Zelle geschleust zu werden. Entwickelt wurde es in der Arbeitsgruppe von Timothy L. Reudelhuber (Clinical Research Institute of Montréal, Québec, Canada), welcher das Fusionsprotein für unsere Forschung zur Verfügung stellte (Methot *et al.*, 2001).

Die wichtigsten Komponenten dieser biologischen Peptidpumpe sind in der Abbildung 35 dargestellt. Dabei dient das Signalpeptid des humanen Prorenins der Einschleusung des Fusionsproteins in das endoplasmatische Retikulum. Auf das Signalpeptid folgt die Sequenz für die konstante Region der schweren Kette von IgG2b der Maus. Diese Komponente codiert das größte Segment des Fusionsproteins, welches wichtig für dessen Stabilität ist und einen vorzeitigen Abbau verhindert. Ferner kann die Expression des Transgens darüber detektiert werden. Das IgG2b-Fragment ist wiederum über einen sogenannten molekularen „spacer“ mit dem Peptid der Wahl, hier Ang-(1-7), gekoppelt. Dabei handelt es sich um einen Teil des humanen Prorenin-Prosegments, welches an seinem Carboxylende eine Schnittstelle für Furin enthält. Furin ist eine Protease, welche unter anderem im Golgi-Apparat Vorläuferproteine spaltet, um sie zu aktivieren. Somit kann das Peptid nach der Abspaltung über den sekretorischen Weg von der Zelle sekretiert werden.

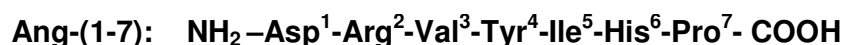


Abbildung 35: Fusionsprotein und sein freigesetztes Peptidprodukt.

Die strukturellen Komponenten des gentechnisch erzeugten Fusionsproteins sowie die Peptidstruktur von dem Heptapeptid Ang-(1-7).

Für die Klonierung des Transgenkonstrukts wurde der SMMHC-Promotor (~16 kb) verwendet, welcher eine Expression in den glatten Muskelzellen gewährleisten sollte. Dieser wurde in das pcDNA3.1 Expressionsplasmid der Firma Invitrogen, anstelle des CMV (Cytomegalievirus) -Promotors, kloniert. Der SMMHC-Promotor enthielt bereits ein Intron. Strangabwärts wurde nachfolgend das Fusionsprotein (870 bp), bestehend aus der biologischen Peptidpumpe und der Ang-(1-7) Peptidsequenz, eingebaut. Als Terminationssignal der Transkription wurde die bereits im Expressionsplasmid befindliche BGH (bovines Wachstumshormon) -Polyadenylierungssequenz (224 bp) benutzt. Anschließend konnte das resultierende 17,5 kb große Transgenfragment durch einen Verdau des Vektors (SMMHC-Ang7) mit den Enzymen *Nru I* und *Nae I*, einer anschließenden Auftrennung in einem Agarosegel sowie nachfolgender Gelextraktion isoliert werden.

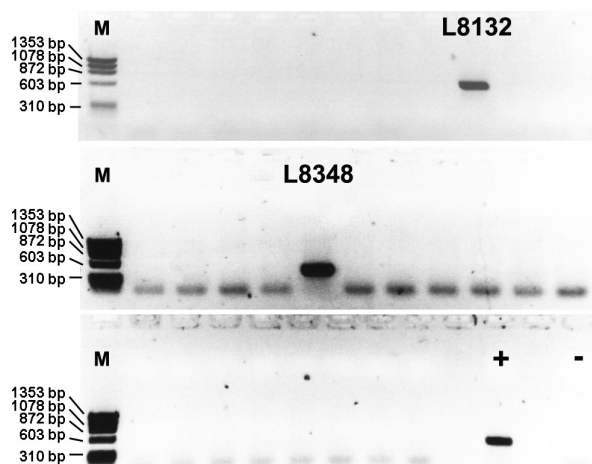


Abbildung 36: PCR zur Genotypisierung.

Die Identifizierung der Nachkommen erfolgte mittels PCR, wobei das entstehende PCR-Produkt eine Größe von 463 bp aufweisen musste. Das dargestellte Agarosegel-Bild zeigt das PCR-Ergebnis der Genotypisierung der Founderratten, L8132 und L8348. M, Marker; +, Positiv-Kontrolle; -, Negativ-Kontrolle.

Nach der Aufreinigung des Konstrukts erfolgte die pronukleäre Mikroinjektion in den männlichen Vorkern von Zygoten und die anschließende Reimplantation in scheinchwangere Ratten. Dabei wurden sowohl Zygoten von normotensiven SD wie auch von hypertensiven SHRSP Ratten verwendet. Mittels PCR wurden die Nachkommen auf die Integration des Transgens in das Genom überprüft. Dabei konnten bislang 2 Foundertiere, L8132 und L8348 (Abbildung 36), bei den SD Nachkommen identifiziert werden, aber noch keine bei den SHRSP Ratten.

Diese identifizierten Träger des Transgens wurden danach mit Wildtypieren verpaart, um heterozygote F1-Nachkommen zu erhalten. Derzeit erfolgt die Weiterverpaarung bis zur Homozygotie.

3.2.2. Nachweis der Expression

Um die Expression des Transgens festzustellen, wurde ein RPA mit verschiedenen Organen von Ratten beider transgener Linien sowie der SD Kontrollen durchgeführt. Dabei wurde die cDNA Sonde so gewählt, dass sie vollständig komplementär zur IgG2b mRNA des Transgenkonstrukts ist (Abbildung 37). Als interner Standard wurde das Housekeeping-Gen L32 detektiert.

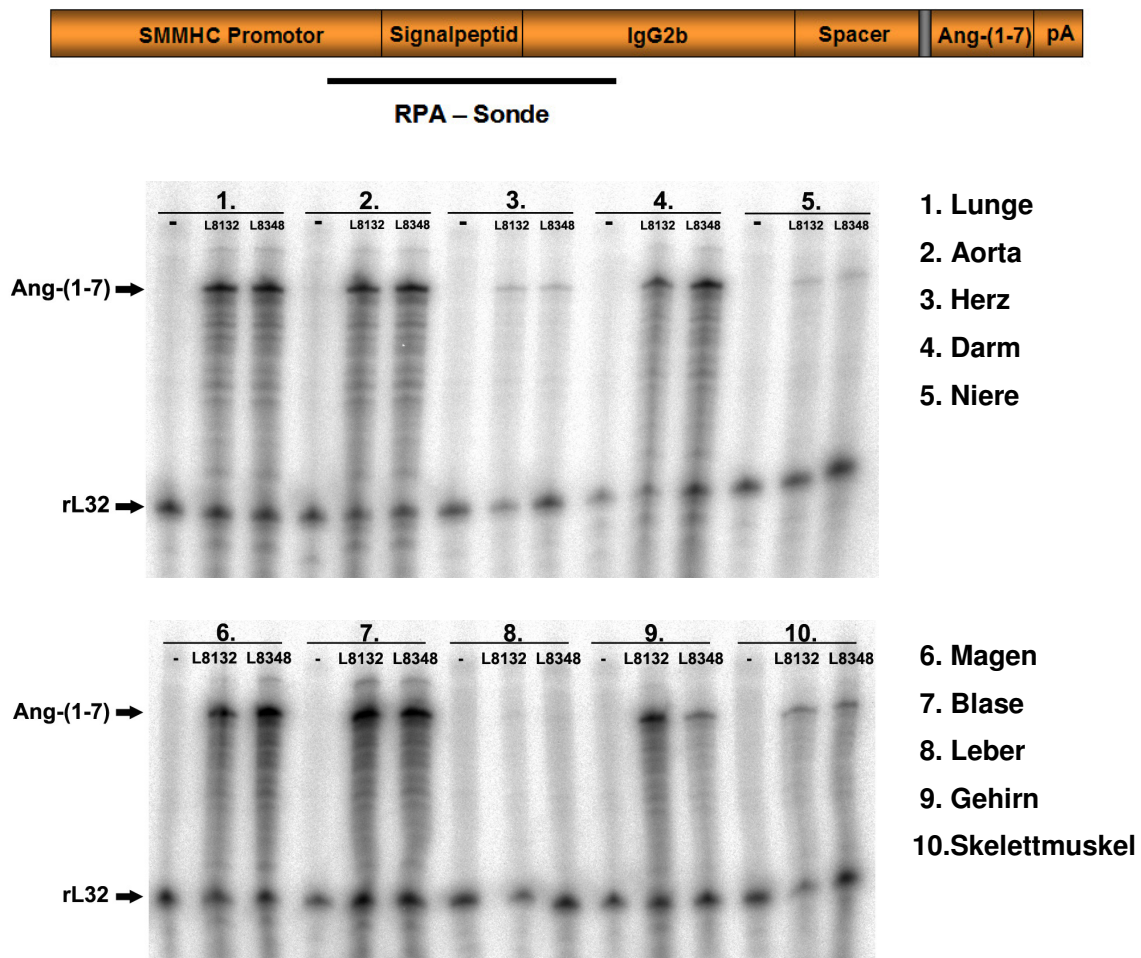


Abbildung 37: Expressionsnachweis des Transgenkonstrukts in verschiedenen Organen.

Für die Expressionsanalyse wurde eine spezifischen cDNA Sonde für die Transgen mRNA (Ang-(1-7); geschütztes Fragment: 227 bp; 80000 cpm) und eine cDNA Sonde für das Housekeeping-Gen L32 (rL32, geschütztes Fragment: 112 bp; 7500 cpm) benutzt. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Rattengewebe wurden für einen RPA eingesetzt. -, Negativ-Kontrolle; L8132 und L8348, Founderlinien mit dem SMMHC-Ang7 Konstrukt.

Bei den transgenen Ratten wurde in allen Organen, die einen großen Anteil an glatten Muskelzellen besitzen, wie Aorta, Lunge, Darm, Magen und Blase, eine starke Expression verzeichnet. In Herz, Niere und Skelettmuskel, konnte dagegen nur eine geringe Expression der Transgen mRNA festgestellt werden. Da eigentlich in diesen Organen keine Expression erwartet wurde, ist anzunehmen, dass die enthaltenen Gefäße diese verursachen. Ferner konnte auch eine Expression im Gehirn detektiert werden, wobei diese unterschiedlich stark zwischen den beiden transgenen Linien war.

3.2.3. Auswirkung der Ang-(1-7) Überexpression auf die anderen RAS Komponenten

SHRSP-ACE2 Ratten zeigten eine signifikante Erhöhung der Ang-(1-7) Konzentration, aber keine Veränderungen in den Konzentrationen oder Aktivitäten von anderen RAS Komponenten. Hingegen wiesen die SD-ACE2 Tiere signifikante Veränderungen in der Reninkonzentration und -aktivität sowie Ang I Konzentration auf, wobei aber die Konzentration von Ang-(1-7) im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert war. Somit scheint es, dass eine Ang-(1-7) Sekretion bzw. dessen Effekte keine Auswirkung auf andere RAS Komponenten besitzt.

Um dies aber zu bestätigen, wurden von beiden transgenen Linien sowie den SD Kontrolltieren die Reninaktivität und -konzentration sowie die Ang I und Ang II Konzentration bestimmt (Abbildung 38). Dabei konnten aber keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es war nur die Tendenz einer Erniedrigung der Renin- sowie der Ang I Konzentration in den transgenen Tieren der Linie L8348, verglichen mit den Kontrollen, zu sehen. Obwohl kein Unterschied in der Expression des Transgenkonstrukts zwischen den zwei transgenen Linien ersichtlich war, könnte es doch Unterschiede in der Sekretionsstärke des Heptapeptids geben. Daher werden derzeit die Ang-(1-7) Konzentrationen von Plasmaproben und von Aortahomogenaten der transgenen Linien bestimmt.

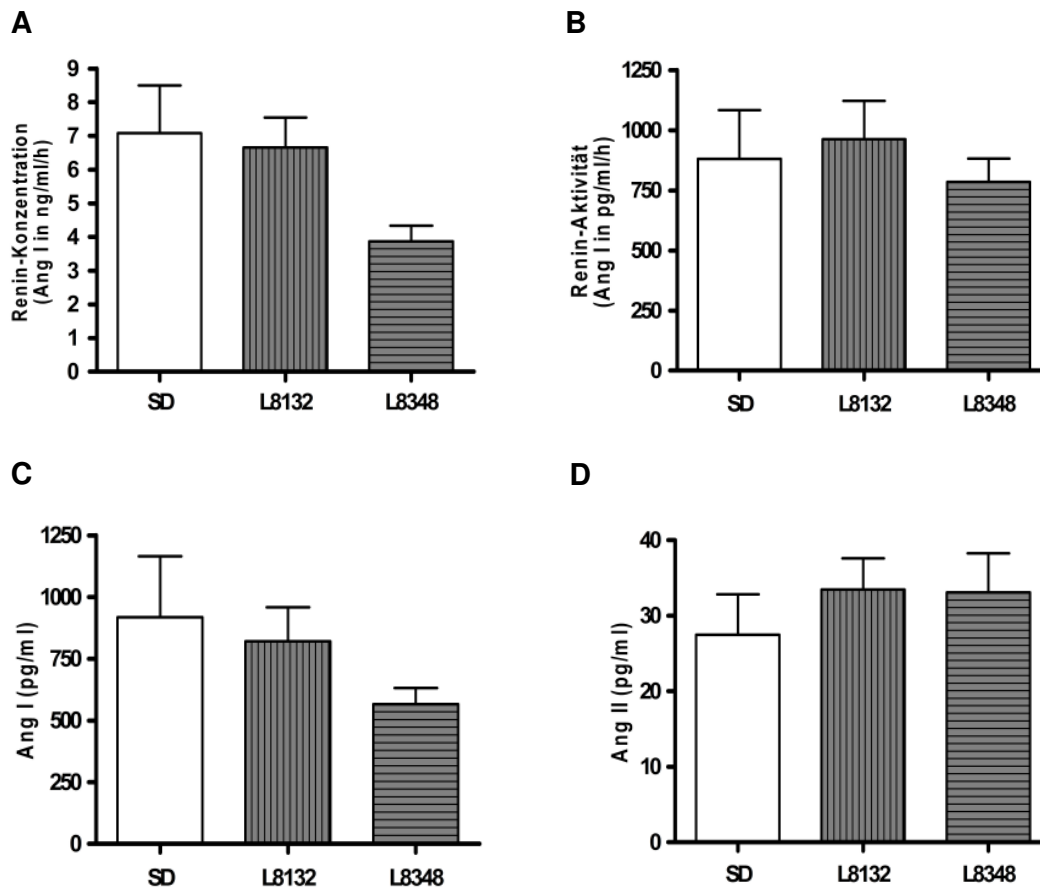


Abbildung 38: Bestimmung verschiedener RAS Komponenten mittels Radioimmunoassay. Die (A) Reninkonzentration, (B) die Reninaktivität, (C) Ang I Konzentration sowie die (D) Ang II Konzentration wurden von beiden transgenen Linien, L8132 und L8348, sowie den SD Kontrollen bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und deren Standardfehler dar. (n = 6-9 Ratten pro Gruppe).

3.2.4. Blutdruckmessung

Die Meinungen zur Wirkung von Ang-(1-7) auf den Blutdruck sind konträr. Viele Publikationen berichten, dass es eine vasodilatatorische Wirkung ausübt, andere Arbeitsgruppen konnten wiederum keine Effekte bezüglich des Blutdrucks detektieren. Um nun dies zu überprüfen, wurde bei diesen transgenen Tieren der Blutdruck zum einen mittels einer Blutdruckmanschette und zum anderen mittels Telemetrie gemessen. Für die Messung mittels Manschette wurden die Tiere narkotisiert, was wiederum Auswirkungen auf den Blutdruck hat. Deshalb wurde auch eine Messung mittels Telemetrie durchgeführt. Dabei wird den Tieren in einer Operation ein Sender implantiert. Erst zehn Tage nach der Operation begann die Blutdruckbestimmung und

diese wird in wachen Tieren durchgeführt. Bei beiden Messmethoden fand man keinen signifikanten Unterschied im Blutdruck (Abbildung 39).

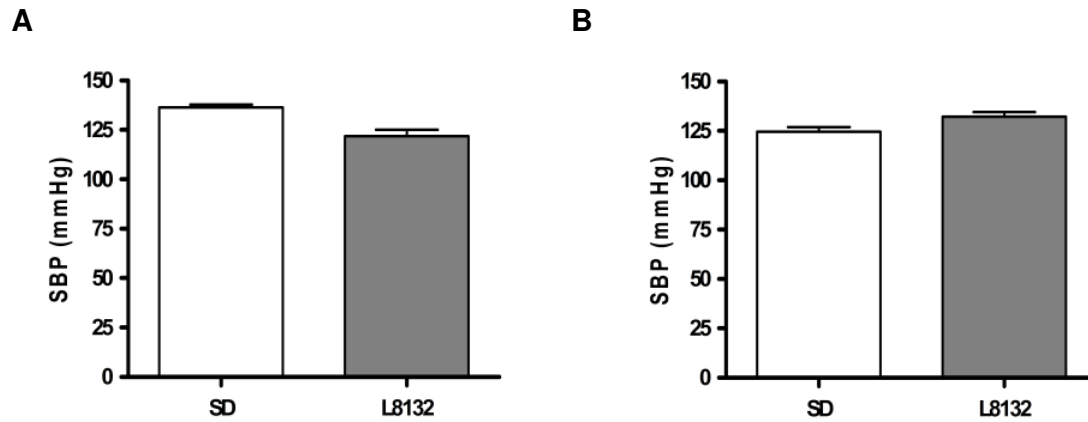


Abbildung 39: Messung des systolischen Blutdrucks.

(A) Blutdruckmessung mittels einer Druckmanschette am Schwanz. Die Ratten sind dabei im narkotisierten Zustand. (B) Blutdruckmessung mittels Telemetrie, wobei die Messung in wachen Ratten stattgefunden hat.

3.3. Überexpression eines Transgens mithilfe des Cre-loxP Systems

3.3.1. Die zugrundeliegende Strategie

Das Ziel dieses Projektes war die Etablierung einer Methode zur Verbesserung der Überexpression eines Transgens in den glatten Muskelzellen von Ratten.

Dieses Projekt beruht auf der Tatsache, dass eine gewebsspezifische Expression die Nutzung bestimmter Promotoren erfordert, welche aber oft den Nachteil einer geringen Expressionsstärke aufweisen. Um dieses Problem zu überbrücken, wurde bei der Erzeugung der transgenen Linien das Cre-loxP Rekombinase System benutzt. Bislang fand dieses vor allem Verwendung in der Herstellung von konditionellen knock-out Mäusen. Hierbei soll aber die Cre-Rekombinase genutzt werden, um die Expression des gewünschten Transgens gewebespezifisch anzuschalten, indem eine zwischen Promotor und codierenden Region liegenden Stoppssequenz herausgeschnitten wird (Abbildung 40).

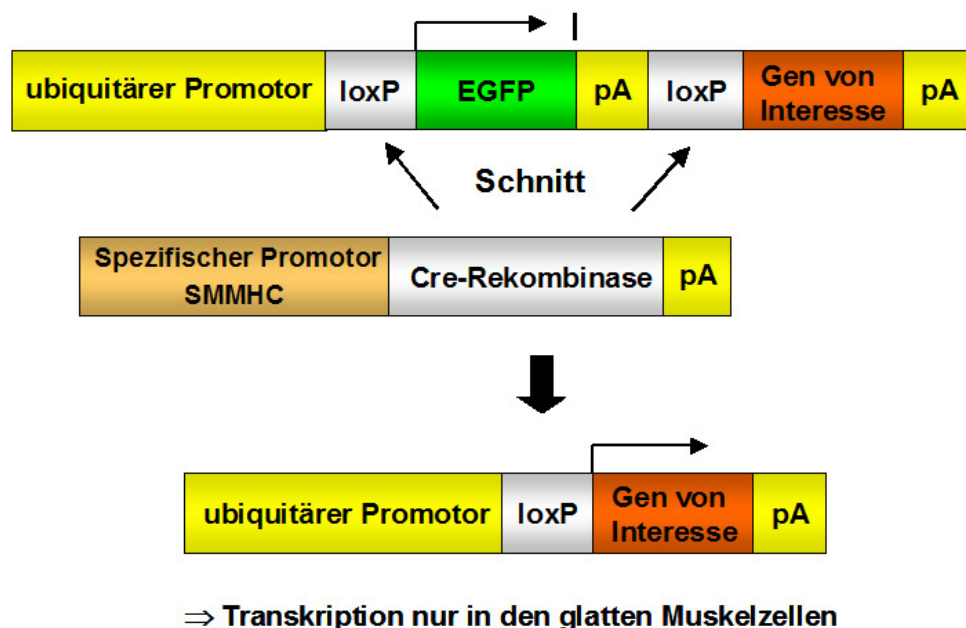


Abbildung 40: Strategie für eine stärkere Expression eines Transgens in den glatten Muskelzellen. Die Cre-Rekombinase schneidet spezifisch in den glatten Muskelzellen das gefloخته Reporter-gen und das Stoppcodon heraus, was wiederum eine Expression des Transgens in diesen Zellen auslöst.

Für die so erzeugte Überexpression eines Transgens ist die Herstellung von zwei Rattenlinien erforderlich. Eine muss die Cre-Rekombinase exprimieren, wobei diese unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors stehen sollte. Die zweite Rattenlinie muss die codierende Region des Transgens unter der Kontrolle eines ubiquitären, stark exprimierenden Promotors sowie die dazwischengeschaltete geflochte Stoppssequenz tragen. Nach der Verpaarung dieser beiden Rattenlinien sollte es in den Nachkommen zu einem gewebespezifischen Herausschneiden des Stoppsignals sowie zu einer starken Expression des Transgens kommen. Um einen besseren Nachweis für die Entfernung der geflochten Sequenz zu erhalten, kann zwischen die loxP Regionen noch die Sequenz eines Reportergens kloniert werden.

3.3.2. Erzeugung der transgenen Rattenlinien

Dieses Projekt entstand in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Stephen Schwartz (Seattle, Washington), wobei uns das Konstrukt von ihnen bereitgestellt wurde. Die Herstellung der transgenen Ratten sowie der funktionelle Nachweis der Methode war dagegen Teil der vorliegenden Doktorarbeit.

Bei dem zu exprimierenden Transgen handelte es sich um RGS5, einem Mitglied der RGS-Proteinfamilie (Regulators of G-Protein Signaling). Diese spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Signalübertragung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wobei von RGS5 angenommen wird, dass es eine Rolle in der kardiovaskulären Homöostase spielt.

Die Konstrukte sowie die Ergebnisse einer Genotypisierung sind in der Abbildung 41 zu sehen. Um eine ubiquitäre, starke Expression des Transgens zu erhalten, wurde der CX1-Promotor (~1,7 kb) verwendet, welcher eine Kombination aus dem β -Aktin-Promotor vom Huhn und dem CMV-Enhancer darstellt. An die Promotorsequenz schloss sich ferner ein β -Aktin Intron an. Als Reportergen wurde eGFP (enhanced green fluorescence protein; 723 bp) genutzt, wobei dieses zusammen mit einem Polyadenylierungssignal zwischen zwei loxP Stellen kloniert und strangabwärts vom Promotor in den Vektor (pBluescript II-KS+) eingefügt wurde. An das 3'-Ende des geflochten Reportergens schließt sich direkt die humanen RGS5 cDNA (546 bp) sowie ein weiteres Polyadenylierungssignal an. Ferner wurde noch eine weitere Version des Transgenkonstrukts hergestellt, wobei die RGS5 cDNA noch mit einer 3-maligen Wiederholung eines HA-Tags (Hämagglutinin-Tag, 84 bp) versehen wurde. Mit den

transgenen Ratten, die letzteres Konstrukt enthielten, (TGR(RGS5HAlox)), wurden die hierbei beschriebenen Versuche durchgeführt.

Die Expression der Cre-Rekombinase (~1,5 kb Fragment) wurde unter die Kontrolle des SMMHC Promotors (~16 kb) gesetzt, welcher eine spezifische Expression des Transgens in den glatten Muskelzellen hervorruft. Auch hier beinhaltete die Promotorsequenz bereits ein Intron.

Beide Konstrukte wurden durch einen Verdau und nachfolgende Gelextraktion isoliert. Für die Isolierung des RGS5HAlox Fragments (~3,6 kb) wurden die Enzyme *Sal I* und *Not I* und für das SMMHCCre Fragment (~17,5 kb) *Nru I* und *Nae I* verwendet.

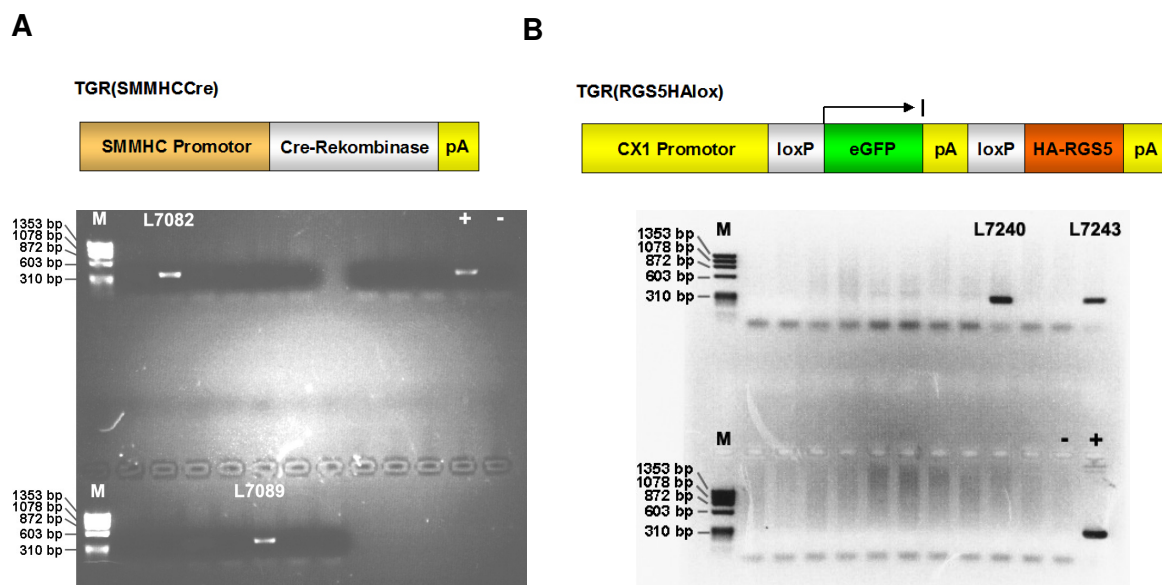


Abbildung 41: Transgenkonstrukte und deren PCR-Ergebnisse zur Genotypisierung.

(A) Konstrukt für die Expression der Cre-Rekombinase in den glatten Muskelzellen (SMMHCCre). Das PCR-Produkt der Genotypisierung besaß eine Größe von 345 bp. Das dazugehörige Agarosegel zeigt die Identifizierung der Founderratten, L7082 und L7089. (B) Konstrukt für die Überexpression des eigentlichen Transgens RGS5 (RGS5HAlox), welches das gefloخته Reporter-gen eGFP enthält. Das dargestellte Agarosegel zeigt die Identifizierung der Founderratten, L7240 und L7243. Das PCR-Produkt besaß eine Größe von 279 bp. M, Marker; +, Positiv-Kontrolle; -, Negativ-Kontrolle.

Nach der Aufreinigung erfolgte die pronukleäre Mikroinjektion sowie Reimplantation. Als Rattenstamm für die Erzeugung der transgenen Tiere wurden normotensive SD Ratten verwendet. Mittels PCR wurden die Nachkommen auf die Integration des Transgens in das Genom überprüft, wobei zwei Foundertiere, L7082 und L7089, für das SMMHCCre Konstrukt und zwei, L7240 und L7243, für das RGS5HAlox Konstrukt identifiziert werden konnten. Anschließend wurden die Foundertiere bis zur Homozygotie verpaart.

Um letztendlich die doppeltransgenen Nachkommen zu erhalten, wurden die homozygoten Tiere mit dem SMMHCCre Konstrukt mit den homozygoten Tieren der TGR(RGS5HAlox) Linie verpaart. Die Nachkommen dieser Kreuzung wurden dann auf die Funktionalität der Methode untersucht.

3.3.3. Expressionsnachweis in den TGR(SMMHCCre) und TGR(RGS5HAlox)

Ratten

Die Expressionsanalyse der TGR(SMMHCCre) Linie erfolgte mit einem RPA. Dafür wurde die RNA von verschiedenen Organen verwendet. Als interner Standard diente wieder das Housekeeping-Gen L32. Wie in Abbildung 42 zu sehen ist, konnte eine Expression des Transgens nur in Organen mit einem großen Anteil an glatten Muskelzellen, wie Magen, Darm, Aorta, Blase und Uterus detektiert werden. Somit bringen die TGR(SMMHCCre) Tiere eine gute Voraussetzung für eine gewebespezifische Überexpression eines gewünschten Transgens mit.

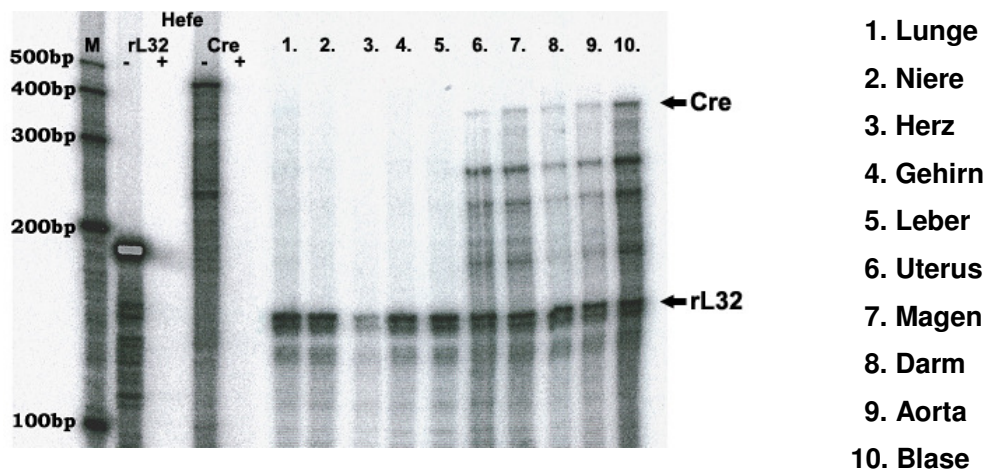


Abbildung 42: Expressionsnachweis der Cre-Rekombinase in verschiedenen Organen von TGR(SMMHCCre) Ratten. Für die Expressionsanalyse wurde eine spezifischen cDNA Sonde für die mRNA der Cre-Rekombinase (Cre; geschütztes Fragment: 392 bp; 60000 cpm) und eine cDNA Sonde für das Housekeeping-Gen L32 (rL32, geschütztes Fragment: 112 bp; 7500 cpm) benutzt. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Rattengewebe wurden für einen RPA eingesetzt. M, Marker; +, Hefe mit RNase-Verdau; -, Hefe ohne RNase-Verdau.

Des Weiteren wurde auch die Expression des Reportergens eGFP in den transgenen TGR(RGS5HAlox) Linien überprüft. In diesen sollte der starke CX1 Promotor eine

starke ubiquitäre Expression auslösen. Getestet wurde dies zum einen mittels RPA. Dabei konnte in allen verwendeten Organen eine gleich starke Expression des Reportergens detektiert werden (Abbildung 43).

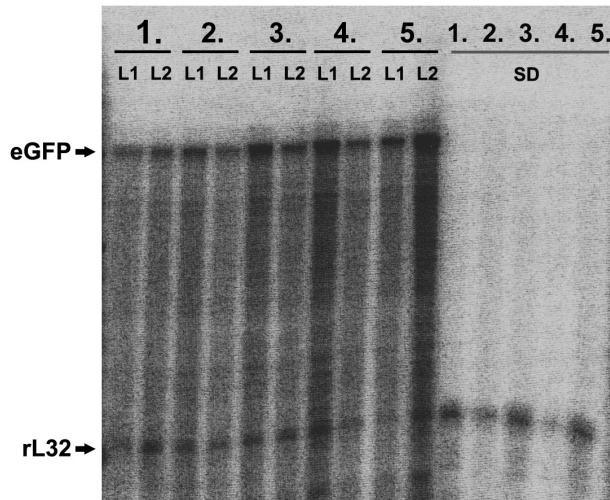


Abbildung 43: Nachweis der mRNA Expression von eGFP in verschiedenen Organen der TGR(RGS5HAlox) Ratten. Für die Expressionsanalyse wurde eine spezifischen cDNA Sonde für die Reporter gen mRNA (eGFP, geschütztes Fragment: 326 bp; 60000 cpm) und eine cDNA Sonde für das Housekeeping-Gen L32 (rL32, geschütztes Fragment: 112 bp; 5000 cpm) verwendet. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Ratten-gewebe wurden für einen RPA eingesetzt. Die geschützten Fragmente sind auf der linken Seite mit Pfeilen markiert. Die Laufspuren des Gels zeigen die RNA von: 1. Darm, 2. Magen, 3. Lunge, 4. Niere, 5. Skelettmuskel. L1, L7240; L2, L7243; SD, TGR(SMMHCCre) Ratte als Kontrolle.

Zum anderen wurde aber auch direkt durch Bestrahlung mit UV-Licht die eGFP Expression in den transgenen Tieren sichtbar gemacht. Dabei konnte die induzierte Fluoreszenz des Reporter gens in verschiedenen Entwicklungsstadien der Ratte gezeigt werden (Abbildung 44).

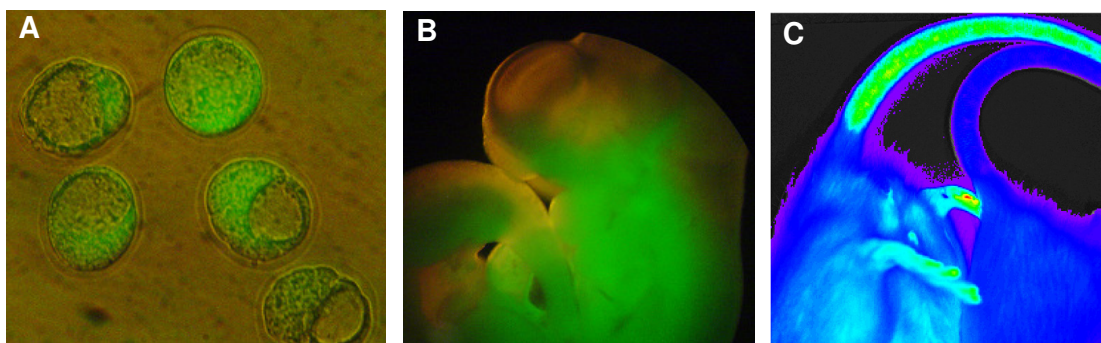


Abbildung 44: eGFP Expression in den transgenen TGR(RGS5HAlox) Linien. Mittels UV-Licht induzierte Fluoreszenz des Reporter gens eGFP in (A) Blastozysten, (B) im 15 Tage alten Embryo und (C) in der adulten Ratte im Vergleich zu einem Kontrolltier.

3.3.4. Charakterisierung der doppeltransgenen Ratten

In den doppeltransgenen Ratten wurde ein gewebespezifisches Ausschneiden des geflochtenen Bereichs durch die Cre-Rekombinase erwartet. Diese Elimination des Reportergens sollte daher auf DNA-Ebene zu einer Verkürzung der transgenen DNA, auf mRNA- und Proteinebene zu einem Verlust der eGFP Expression und phänotypisch zu einem Verlust der Fluoreszenz führen, wobei das nur in den glatten Muskelzellen stattfinden sollte.

Die Sequenzverkürzung wurde mittels PCR überprüft. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass durch den Verlust des Reportergens ein kleineres PCR-Produkt erzeugt wurde (Abbildung 45). In den doppeltransgenen Ratten fanden sich in Darm, Blase, Magen und Aorta, somit in Organen mit hohem Anteil an glatten Muskelzellen, nur die verkürzten PCR-Produkte von ~650 bp. In allen Organen der TGR(RGS5HAlox) Linien fand man hingegen nur eine ~2 kb große Bande, welche wegen ihrer Größe nicht immer zu amplifizieren war. In den doppeltransgenen Ratten zeigten sich ferner in den Organen mit geringerem Anteil an glatten Muskelzellen beide PCR-Banden, wobei die 2 kb Bande meist stärker war. So ist anzunehmen, dass die kleinere Bande das PCR-Produkt der glatten Muskelzellen der Blutgefäße darstellt.

A

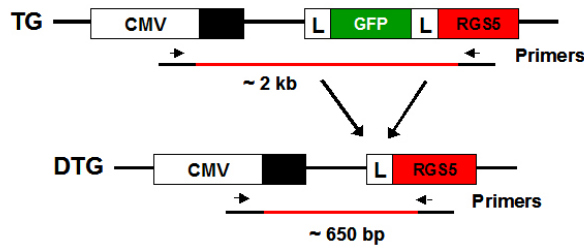
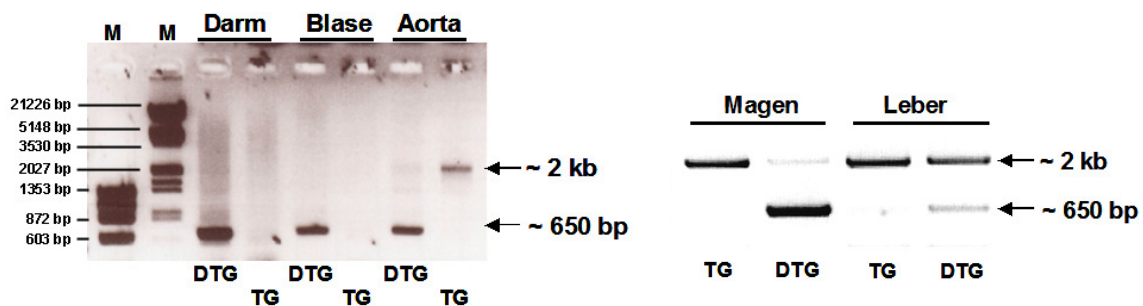


Abbildung 45: PCR Analyse des gewebespezifischen Verlusts von eGFP.

(A) Schematische Darstellung des PCR- Prinzips. Der Vorwärts-Primer ist komplementär zu einem Promotor-Bereich und der Rückwärts-Primer zur RGS5 Sequenz. (B) Agarosegelbilder der PCR - Ergebnisse. M, Marker, DTG, doppeltransgene Ratten; TG , TGR(RGS5HAlox) Linie.

B



Um den Verlust der eGFP Expression zu überprüfen, wurde sowohl dessen mRNA mittels RPA sowie dessen Proteinmenge mithilfe eines Western Blots untersucht (Abbildung 46). Ob auf mRNA- oder auf Proteinebene, man konnte bei den TGR(RGS5HAlox) sowie bei den doppeltransgenen Ratten ein Expressionssignal finden. Dieses war aber in den Organen der doppeltransgenen Tiere mit einem hohen Anteil an glatten Muskelzellen stark abgeschwächt. Ferner wurde bei den SD Kontrollen in beiden Methoden kein Signal detektiert.

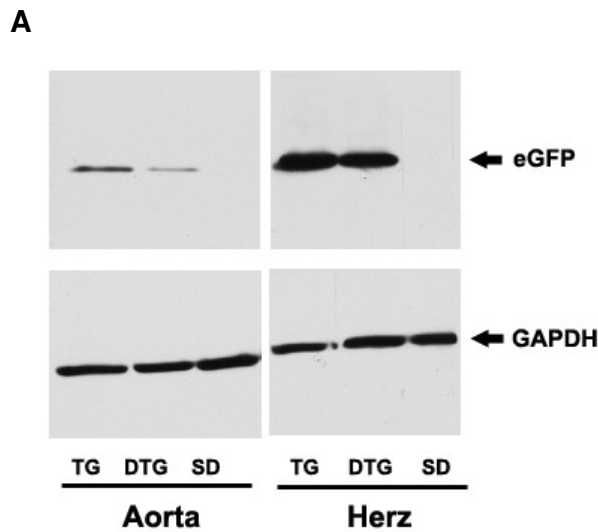
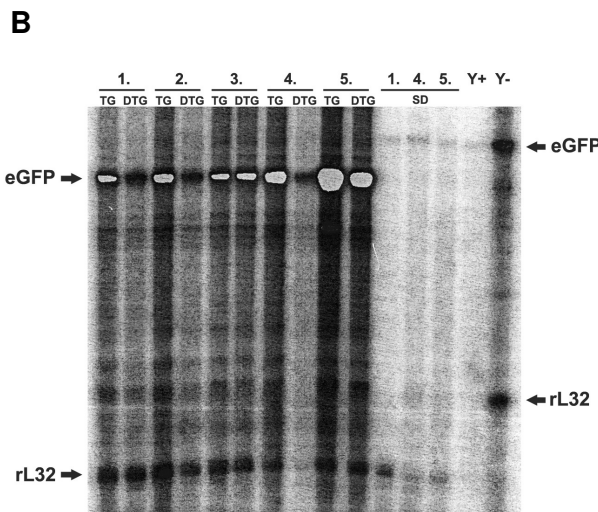


Abbildung 46: Expressionsanalyse des Reportergens eGFP bei TGR(RGS5HAlox) Ratten sowie doppeltransgenen Tieren.

(A) Western Blot zum Nachweis des eGFP Proteins (27 kDa). Als Proteinkontrolle wurde GAPDH nachgewiesen (37 kDa). (B) mRNA Nachweis von eGFP mittels RPA. Für die Expressionsanalyse wurde eine cDNA Sonde für die Reporter-gen mRNA (eGFP, geschütztes Fragment: 326 bp; 60000 cpm) und eine cDNA Sonde (~150 bp) für das Housekeeping-Gen L32 (rL32, geschütztes Fragment: 112 bp; 5000 cpm) verwendet. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Ratten-gewebe wurden für einen RPA eingesetzt. Die geschützten Fragmente sind auf der linken Seite und die unverdauten auf der rechten Seite mit Pfeilen markiert. TG, TGR(RGS5HAlox) Ratte; DTG, doppel-transgenes Tier mit dem SMMHCCre und dem RGS5HAlox Konstrukt; SD, TGR(SMMHCCre) Ratte als Kontrolle.



- 1. Darm
- 2. Magen
- 3. Niere
- 4. Lunge
- 5. Skelettmuskel

Y+ Hefe mit RNase-Verdau

Y- Hefe ohne RNase-Verdau

Ferner wurde der Verlust der Fluoreszenz anhand von Aorta-Querschnitten untersucht. Da in der Aorta die glatte Muskelzellschicht überwiegt, macht es sie zum geeignetsten Objekt für diese Untersuchung. Andere Organe sind weniger dienlich, da die eGFP-Expression der anderen Zelltypen den eigentlichen Verlust in den glatten Muskelzellen übertönen könnte (Abbildung 47).

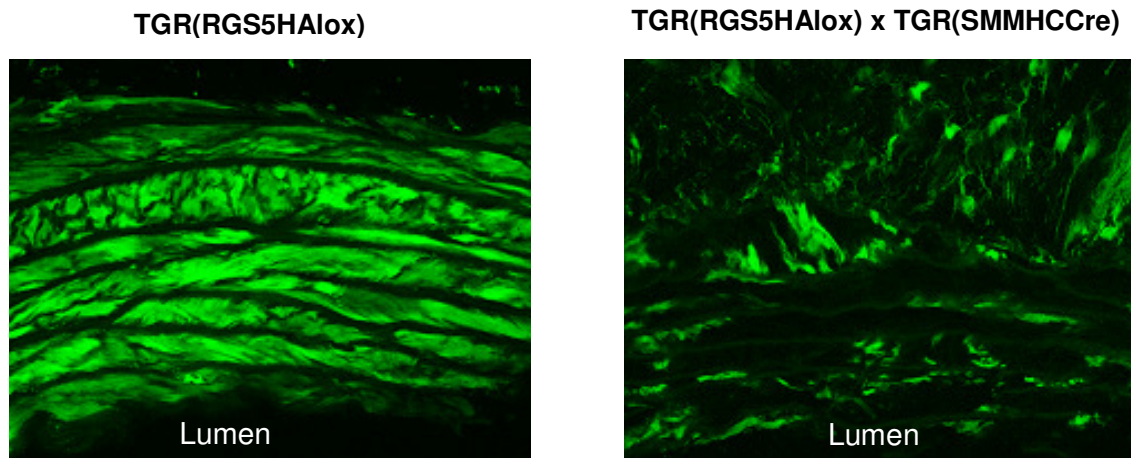


Abbildung 47: Überprüfung des Fluoreszenzverlusts anhand von Aorta-Querschnitten.
Die Aufnahmen erfolgten mittels konfokaler Mikroskopie.

Der direkteste Nachweis der Cre-loxP gesteuerten Überexpression eines Transgens stellt die Detektion der RGS5 Expression dar. Diese wurde mittels einer RT-PCR überprüft (Abbildung 48). Dabei wurde bei den Ratten der TGR(RGS5HAlox) Linie kein PCR-Produkt gefunden. Hingegen wiesen alle getesteten Organe der doppeltransgenen Ratten die RGS5 cDNA auf, wobei dessen Expression aber stärker in den Organen mit einem hohen Anteil an glatten Muskelzellen war. Die PCR-Produkte wurden ferner mittels Sequenzierung überprüft.

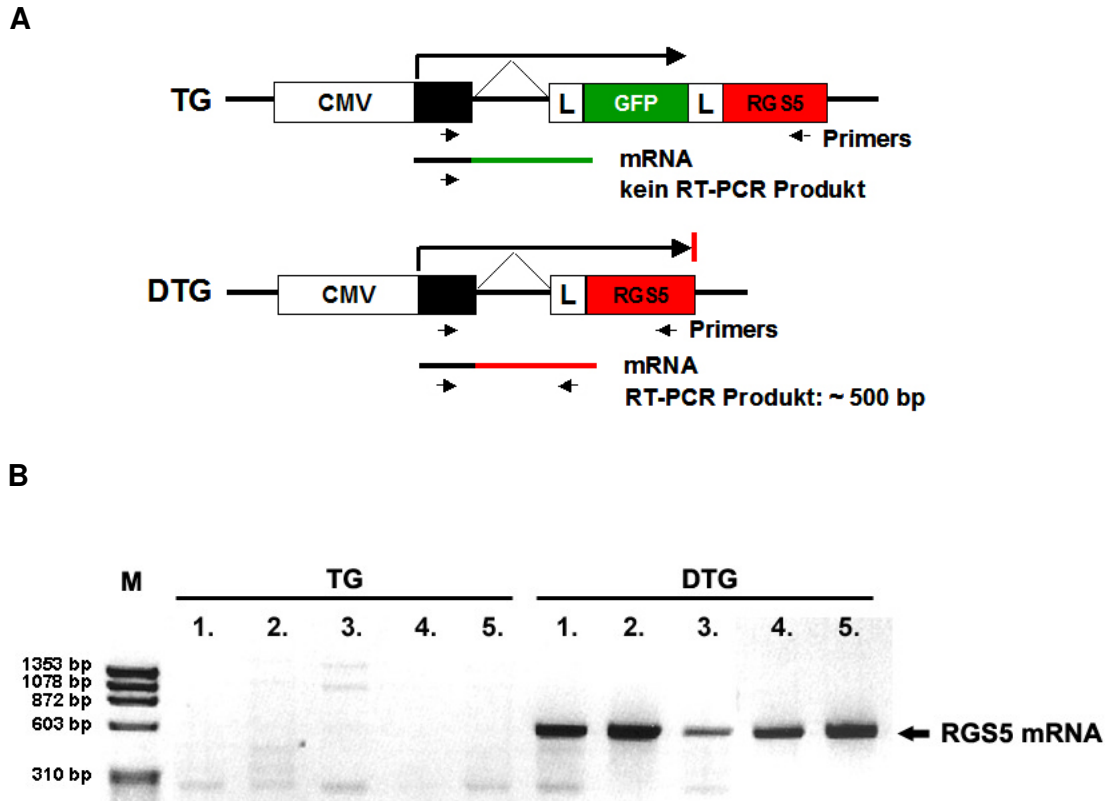


Abbildung 48: Expressionsanalyse von RGS5 via RT-PCR.

(A) Schematische Darstellung des RT-PCR Prinzips. Der Vorwärts-Primer war komplementär zu dem Exon, welches auf den Promotor folgte, und der Rückwärts-Primer zu der RGS5 cDNA. (B) Ergebnis der RT-PCR. 1. Magen, 2. Ileum, 3. Leber, 4. Skelettmuskel, 5. Lunge; DTG, doppeltransgene Ratten; TG, TGR(RGS5HAlox) Linie; M, Marker.

3.4. Analyse der Rezeptor-ähnlichen Funktion von ACE

Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit einer Doktorandin der Arbeitsgruppe von Dr. W.E. Siems des Leibniz - Instituts für Molekulare Pharmakologie in Berlin- Buch durchgeführt. Dieses Gemeinschaftsprojekt ist für die vorliegende Doktorarbeit aber nur von untergeordneter Bedeutung und soll nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Daher wird hier nur auf die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie eingegangen.

Dieses Projekt beruhte auf der neu entdeckten Funktion von ACE (Kohlstedt *et al.*, 2004). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, scheint dieses Enzym nicht nur als Carboxydipeptidase eine Wirkung auszuüben, sondern es besitzt außerdem eine Art Rezeptorfunktion. Dabei lösen ACE-Inhibitoren sowie das ACE-Substrat BK eine Signaltransduktionskaskade aus, in welcher über den zytoplasmatischen Teil von ACE die JNK-Kinase aktiviert wird. Bei diesem Projekt sollte nun untersucht werden, welche katalytische Domäne von ACE dabei involviert ist und ob noch andere ACE - assoziierte Substanzen diese Kaskade auslösen können. Bei Letzterem lag das Interesse besonders in Ang-(1-7), da es zum einen ein ACE-Substrat ist, welches durch dessen Wirkung inaktiviert wird, und zum anderen die Wirkung eines endogenen ACE-Inhibitors besitzen soll.

3.4.1. Herstellung der gezielt veränderten murinen ACE-Formen

Für die Mehrheit der Versuche wurden CHO Zellen verwendet, da diese Zellen weder BK- noch Angiotensin-Rezeptoren exprimieren, welche die Ergebnisse beeinflussen könnten. Diese Zellen wurden mit dem murinen Wildtyp-ACE oder mit mutierten Formen von ACE stabil transfiziert. Letztere wurden mittels gerichteter Mutagenese erzeugt, wobei man selektiv die aktiven Domänen des Enzyms inaktivierte (Abbildung 49).

Anschließend wurden die transfizierten Zellen mithilfe eines Aktivitätsassays überprüft. Dabei wurde das C-Domänen spezifische Substrat Hip-His-Leu, das ACE-Substrat Z-Phe-His-Leu, welches beide katalytischen Domänen von ACE gleichmäßig degradieren können, sowie das N-Domänen spezifische Substrat AcSDKP benutzt. Um die Funktion der Mutationen zu prüfen, wurde außerdem das Verhältnis der His-Leu Bildung aus Hip-His-Leu von der aus Z-Phe-His-Leu berechnet.

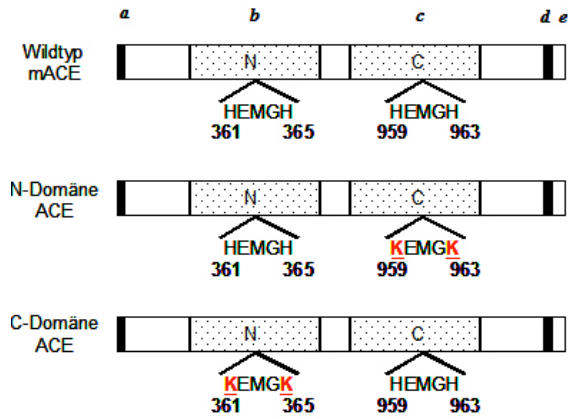


Abbildung 49: Schematische Darstellung der Wildtypform sowie der gezielt mutierten ACE-Formen.

Mithilfe gerichteter Mutagenese wurde die somatische murine ACE-Form mutiert, wobei die katalytischen Domänen selektiv inaktiviert wurden. Dafür ersetzt man die zwei Histidine der aktiven HEMGH-Gruppen von ACE durch Lysin. (a) N-Terminus, (b) katalytische N-Domäne, (c) katalytische C-Domäne, (d) transmembranäre Region, (e) C-Terminus, cytoplasmatischer Teil.

Bei dem ACE-Aktivitätsassay zeigten die nicht transfizierten CHO Zellen keine His-Leu Formation und somit keine ACE-Aktivität. Die Klone mit nur einer N-terminal oder nur einer C-terminal aktiven katalytischen Domäne wiesen dagegen das erwartete Degradationsverhalten auf (Abbildung 50). Letztendlich wurden die Zellklone mit den höchsten Aktivitäten, C9 und N37, für die weiteren Versuche verwendet.

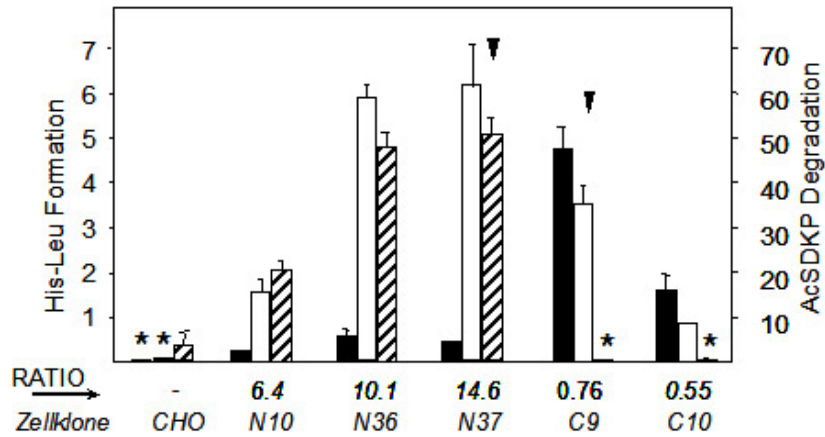


Abbildung 50: ACE Aktivität von verschiedenen Zellklonen.

Die transfizierten Zellen wurden mithilfe eines ACE-Aktivitätsassays überprüft, wobei die Substrate Hip-His-Leu (schwarz), Z-Phe-His-Leu (weiß) und AcSDKP (gestreift) verwendet wurden. Ferner wurden die Verhältnisse der His-Leu Bildung aus Hip-His-Leu von der aus Z-Phe-His-Leu berechnet, um die Funktion der Mutation zu prüfen. Die Pfeile zeigen die Klone mit den höchsten Aktivitäten und Verhältnissen. Diese Zellklone wurden für die folgenden Versuche verwendet. * markiert eine kaum detektierbare Degradation. Die Klone N10, N36 und N37 besitzen eine N-terminal aktive katalytische Domäne und die Klone C9 und C10 eine C-terminal aktive Domäne. Die Daten sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

Hierbei ist anzumerken, dass die Herstellung und Funktionsprüfung der Zelllinien schon im Vorfeld von der Arbeitsgruppe des FMP durchgeführt wurde.

3.4.2. Induktion der Signaltransduktion

Die CHO Zellen, welche das Wildtyp mACE exprimierten sowie die mit den mutierten ACE-Formen, wurden mit verschiedenen Substanzen und Inhibitoren stimuliert, um diese auf die Aktivierung des JNK Signalweges zu prüfen (Abbildung 51). Von den ACE-Inhibitoren wurde Ramiprilat und Lisinopril benutzt und zu den getesteten ACE-Substraten gehörte Ang I, BK, Ang-1-7 und AcSDKP. Ferner wurde auch Des-(Arg⁹)-Leu⁸-BK und Ang II getestet, wobei letzteres ein Produkt der ACE Wirkung ist.

JNK ist eine Stress-aktivierte Phosphokinase (auch SAPK genannt) und somit ist eine Grundstimulation in allen Zellen zu finden. Das macht eine Quantifizierung mittels Western Blot schwierig. Aus diesem Grund wurde das aktivierte JNK indirekt über das darüber phosphorylierte c-Jun bestimmt, da dies eine Signalverstärkung darstellt. Dafür wurde zuerst eine Immunpräzipitation durchgeführt, indem das phosphorylierte JNK mithilfe von c-Jun gekoppelten Beads aus den Zelllysaten isoliert wurde. Anschließend wurde ein in vitro Kinase - Assay verwendet, um eine Phosphorylierung von c-Jun zu bewirken. Nachgewiesen wurde dieses dann mithilfe eines Western Blots.

Die Gabe der ACE-Inhibitoren Ramiprilat und Lisinopril sowie der ACE-Substrate BK und Ang I führten in allen verwendeten CHO Zelllinien zu einer gesteigerten JNK-Aktivität (Abbildung 51). Auch bei der Stimulation mit Ang-(1-7) sowie mit dem Domänen-selektiven ACE-Substrat AcSDKP und dem nur schwachen Substrat Des-(Arg⁹)-Leu⁸-BK war eine Erhöhung der JNK-Aktivität sichtbar, wobei diese aber beschränkt auf die CHO Zelllinien mit den mutierten ACE-Formen war. Letzteres traf auch auf das ACE-Produkt Ang II zu. In den Zellen mit dem ACE Wildtyp-Konstrukt konnte man hingegen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den mit Medium stimulierten Kontrollen finden.

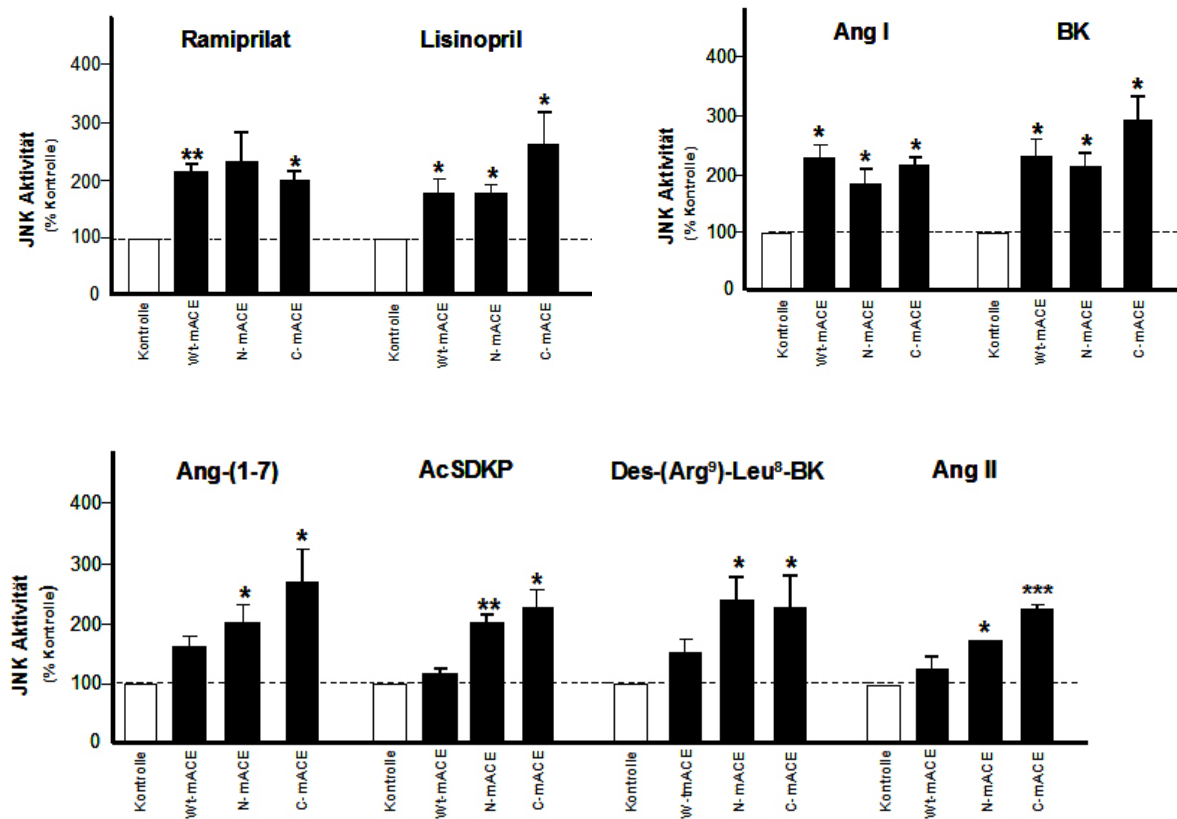


Abbildung 51: Induktion der JNK-Aktivität durch Stimulation des murinen ACE.

Vergleich der Effekte einer Stimulation mit den ACE-Inhibitoren Ramiprilat und Lisinopril, den ACE-Substraten BK und Ang I sowie mit Ang-(1-7), AcSDKP, Des-Arg⁹-Leu⁸-BK und dem ACE-Produkt Ang II auf die JNK-Aktivität von CHO Zellen. Als Kontrolle wurden diese Zellen mit Medium inkubiert. Die verwendeten Zelllinien waren mit dem Wildtyp mACE Konstrukt (wt-mACE) stabil transfiziert oder mit einer mutierten mACE Form, bei der entweder die N-terminale katalytische Domäne (C-mACE) oder die C-terminale Domäne (N-mACE) inaktiviert waren. Bei diesem Versuch wurden die Substanzen in einer Konzentration von 100 nmol/L eingesetzt und die Inkubation der Zellen dauerte 7 Minuten. Die Daten sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (n = 6 Experimente pro Gruppe).

Des Weiteren wurde in diesen drei verwendeten CHO Zelllinien überprüft, ob beim Auslösen der Signaltransduktionskaskade die Kinase CK2 involviert ist. Dafür wurden die Zellen vor der Stimulation mit dem CK2-Inhibitor DRB für 8 Stunden inkubiert. Wie in Abbildung 52 zu sehen ist, verhinderte dieser Inhibitor die Erhöhung der JNK-Aktivität in allen CHO Zelllinien und bei allen verwendeten Substraten. Daraus lässt sich schließen, dass CK2 auch bei der Signaltransduktion des murinen ACE bedeutend ist. Ferner bestätigt es die Daten von Kohlstedt *et al.* (Kohlstedt *et al.*, 2004; Kohlstedt *et al.*, 2005) welche die CK2 vermittelte Phosphorylierung des zytoplasmatischen Serin¹²⁷⁰ von ACE bereits in HUVEC Zellen darstellten. Dabei scheint es sich ferner um die Schlüsselrolle der Signaltransduktion zu handeln.

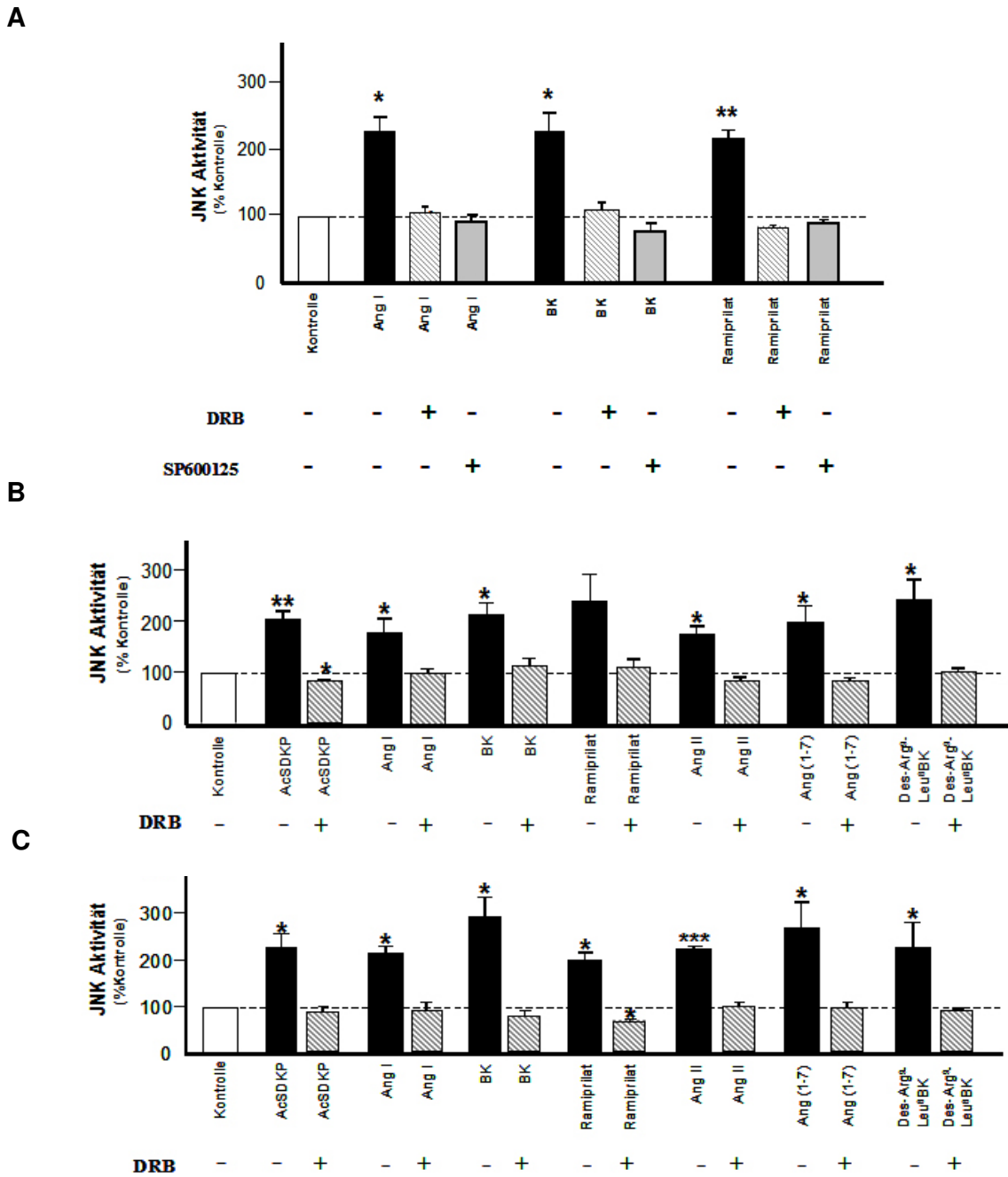


Abbildung 52: Auswirkung des CK2-Inhibitors DRB auf die Induktion der Signaltransduktionskaskade. Getestet wurden die CHO Zelllinien, welche A) das Wildtyp-mACE Konstrukt, B) das mACE mit der C-terminal inaktivierten Domäne oder C) das mACE mit der N-terminal inaktivierten Domäne exprimierten. Die Stimulation der Zellen mit den verschiedenen Substanzen wurde mit und ohne den Inhibitor DRB durchgeführt. Dieser wurde 8 Stunden vor der Stimulation zu den Zellen gegeben, wobei eine Konzentration von 100 µmol/l benutzt wurde. Ferner wurde auch der JNK-Inhibitor SP600125 (20 µmol/l, 1h Vorinkubation) getestet, welcher die Beteiligung von phosphorylierten JNK sowie die Spezifität des Assays bestätigte. Die Daten sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (n = 4-6 Experimente pro Gruppe).

3.4.3. Modulation der COX-2 Expression

Die über ACE ausgelöste Signaltransduktionskaskade führt überdies zu einer Veränderung der Expression von verschiedenen Genen (Kohlstedt *et al.*, 2005). Berichtet wurde insbesondere über eine Erhöhung der COX-2 Expression sowie der ACE mRNA selbst. Dieser Fakt wurde genutzt, um vor allem die Wirkung von Ang-(1-7) weiter zu untersuchen.

Mithilfe einer Real-time PCR wurde die COX-2 Expression in den CHO Zellen, welche das murine Wildtyp-Konstrukt exprimieren, analysiert (Abbildung 53). Die Stimulation der Zellen erfolgte mittels BK, Ramiprilat und Ang-(1-7) sowie mit Medium als Kontrolle. Den Beweis der Beteiligung der JNK-Signalkaskade an der Verstärkung der COX-2 Expression in den CHO Zellen konnte ferner mit der Hilfe des JNK-Inhibitors SP600125 erbracht werden.

Nach einer 24 Stunden dauernden Inkubation zeigte sich eine signifikante Erhöhung der COX-2 Expression bei den BK sowie Ramiprilat stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Dagegen konnte kein Unterschied der COX-2 Expression nach einer Stimulation von Ang-(1-7) erkannt werden. Dies stimmte überein mit den Daten der JNK-Aktivierung. Auch da konnte keine signifikante Erhöhung in den CHO Zellen mit dem Wildtyp-mACE Konstrukt nach einer Stimulation mit dem Heptapeptid gefunden werden.

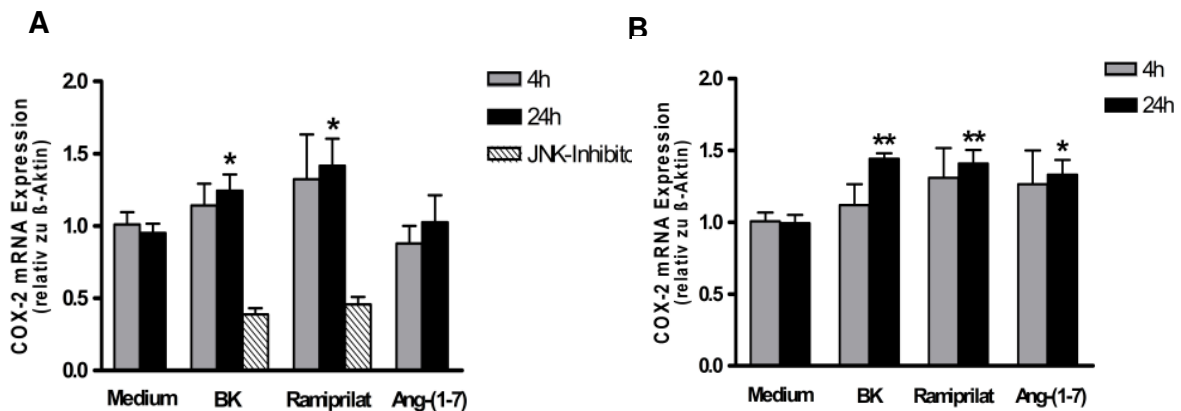


Abbildung 53: Expression von COX-2 in (A) CHO Zellen und (B) HUVEC Zellen mittels Real-time PCR. Stimulation der Zellen für 4 und 24 Stunden mit BK, Ramiprilat, Ang-(1-7) und mit Medium als Kontrolle. Die eingesetzte Konzentration der Substanzen entsprach 100 nmol/L. Ferner wurde auch eine Stimulation der CHO Zellen mit BK sowie mit Ramiprilat nach Inkubation mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (10 µmol/L) durchgeführt. Die Daten sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. *P<0.05, **P<0.01 (n = 3-7 Experimente pro Gruppe).

Kohlstedt *et al.* (Kohlstedt *et al.*, 2004, 2006) erbrachte den Großteil der Daten zur Signaltransduktion von ACE anhand von HUVEC Zellen, wobei humanes ACE untersucht wurde. Daher wurde die COX-2 Expression nach Stimulation von Ang-(1-7) sowie von BK und Ramiprilat nochmals in diesen Zellen untersucht. Interessanterweise zeigte sich hierbei eine signifikante Erhöhung der COX-2 Expression nach einer 24-stündigen Ang-(1-7) Stimulation (Abbildung 53). Somit scheint es, dass zwar in den CHO Zellen mit dem murinen ACE die Signaltransduktionskaskade mittels verschiedener Substanzen ausgelöst werden kann, aber die Effekte doch eindeutiger in den HUVEC Zellen zu beobachten sind. Des Weiteren lässt sich aus den Daten schließen, dass Ang-(1-7) auch die Signaltransduktion über ACE auslösen kann, diese Stimulation aber im Vergleich zu einer Ramiprilat und BK Stimulation eine wesentlich schwächere Auswirkung hat.

4. DISKUSSION

4.1. Untersuchung der transgenen Ratten mit Überexpression von ACE2

ACE2 spielt eine entscheidende Rolle innerhalb des RAS, wobei diese Carboxypeptidase vor allem an der Erhaltung des Gleichgewichts zwischen der vasokonstriktorischen Aktivität von Ang II und den vasoprotektiven Wirkungen von Ang-(1-7) involviert zu sein scheint (Oudit *et al.*, 2003; Chappel *et al.*, 2006; Ferrario and Strawn, 2006). Ferner wurde die Erniedrigung von ACE2 mit der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen und Hypertonie assoziiert (Crackower *et al.*, 2002). So konnte in verschiedenen hypertensiven Rattenmodellen ACE2 als Kandidatengen für einen QTL auf dem X-Chromosom ermittelt werden, welcher in einigen Tiermodellen mit dem Entstehen spontaner oder Diät-induzierter Hypertonie assoziiert wird (Crackower *et al.*, 2002). Diese Tiermodelle weisen ferner eine reduzierte ACE2 mRNA und Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (Crackower *et al.*, 2002). Überdies wurden Polymorphismen im ACE2-Gen mit der Entwicklung einer pathologischen Myokardhypertrophie sowie mit anderen Erkrankungen des Herzens assoziiert (Lieb *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Somit deuten viele Faktoren auf einen wesentlichen Einfluss von ACE2 in der kardiovaskulären Physiologie hin.

Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die physiologische Rolle von ACE2 insbesondere in Bezug auf die Pathogenese der Hypertonie im SHRSP Rattenmodell genauer untersucht. Dafür wurden transgene Ratten mit Überexpression von ACE2 in den vaskulären glatten Muskelzellen generiert und die phänotypischen Effekte charakterisiert.

4.1.1. Transgenexpression unter der Kontrolle des SM22 α Promotors

Um eine Expression des humanen ACE2 in den vaskulären glatten Muskelzellen zu erhalten, wurde der SM22 α Promotor verwendet. SM22 α ist ein Calponin-verwandtes Protein, welches ausschließlich in visceralen und vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert wird. Nur während der Embryonalphase kommt es auch zu einer vorübergehenden Expression im Herzen sowie im Skelettmuskel (Solway *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996). Interessanterweise findet man aber eine Transgenexpression unter Kontrolle dieses Promotors nur in den vaskulären glatten Muskelzellen (Moessler *et al.*, 1996; Akyurek *et al.*, 2000). Dies traf auch auf die transgenen SHRSP-ACE2 Ratten zu.

Hierbei wurde die ACE2 Überexpression spezifisch im vaskulären System hervorgerufen, wobei dies mittels RPA sowie einer Messung der enzymatischen Aktivität gezeigt werden konnte. Ferner offenbarten die Ergebnisse einer Real-time PCR, dass eine Expression nicht nur in der Aorta sondern auch in kleineren Gefäßen, wie den renalen und mesenterialen Arterien, auftrat. Dies ist insofern entscheidend, da an der Blutdruckregulation eher die Arteriolen beteiligt sind (Mulvany *et al.*, 1990). Diese modulieren durch Kontraktion oder Relaxation der glatten Gefäßmuskeln den peripheren Widerstand und somit auch den Blutdruck. Daher werden die Arteriolen auch allgemein als Widerstandsgefäße bezeichnet. Da diese Gefäße aber zu klein sind für eine Isolierung bzw. für die Gewinnung von genügend Material für eine Expressionsanalyse wurden dazu kleinere Arterien genutzt. Diese zeigten eine eindeutige ACE2 mRNA Überexpression im Vergleich zu den Kontrollen, so dass man davon ausgehen kann, dass dies auch auf die noch kleineren Arteriolen zutrifft.

Im RPA konnte außerdem eine Expression von humanem ACE2 in der Lunge gefunden werden, die aber zum einen nicht immer zu sehen und zum anderen, verglichen mit der Aorta, schwächer war. Es scheint, dass diese im Zusammenhang mit dem Gefäßanteil des benutzten Gewebes steht und weniger auf eine unspezifische Expression des Transgens in den glatten Muskelzellen der Lunge zurückzuführen ist. Wenn letzteres zutreffen würde, müsste die erhaltene Expression aufgrund der Anzahl dieser Muskelzellen stärker und immer nachweisbar sein. Daher wurde angenommen, dass vor allem die Anwesenheit der größeren Pulmonararterie in einigen Lungenpräparationen der Grund für die detektierte Expression war.

Eine vergleichbare Expression des humanen ACE2 wurde auch bei den transgenen SD-ACE2 Tieren gefunden. Dies bestätigt somit das Expressionsergebnis der SHRSP-ACE2 Ratten und die Spezifität des SM22 α Promotors.

Des Weiteren wurde mittels RPA die Expression der endogenen ACE2 mRNA der Ratte untersucht. Mit der cDNA Sonde für das humane ACE2 war es außerdem möglich kürzere Bereiche der endogenen ACE2 mRNA zu erkennen. Hierbei konnte aber ein Signal nur im Darm gefunden werden, welches bekanntlich das Organ mit der stärksten ACE2 Expression ist (Hamming *et al.*, 2004; Gembardt *et al.*, 2005). Bei einem RPA mit einer spezifischen Sonde für das endogene ACE2 zeigte sich eine ähnlich starke Expression im Darm sowie eine schwache Expression in der Lunge. Ferner schien die Expression im Darm der SHRSP Kontrollen stärker als in den transgenen Ratten zu sein. Hierbei könnte eine Regulation der ACE2 Expression durch die verbesserte

Pathologie der SHRSP-ACE2 Tiere eine Rolle spielen. Eine derartige Expressionskontrolle von ACE2 findet beispielsweise auch bei Erkrankungen des Herzens statt, wie dem Myokardinfarkt, wobei es zu einer Hochregulation der Expression von ACE2 kommt (Zisman *et al.*, 2003; Burrell *et al.*, 2005).

Eine weitere Möglichkeit zur Einschätzung der ACE2 Überexpression bestand in der Messung der Enzymaktivität. Dabei konnte nur in der Aorta ein Unterschied registriert werden, wobei die SHRSP-ACE2 Tiere im Vergleich zu den Kontrollen einen signifikanten Anstieg aufwiesen. Des Weiteren konnte noch im Darm sowie in der Lunge eine starke Aktivität festgestellt werden. In diesen Organen scheint es sich aber um die endogene ACE2 Aktivität der Ratten zu handeln, da kein Unterschied zwischen SHRSP-ACE2 Tieren und deren Kontrollen zu finden war. Die Enzymaktivität in der Aorta basierte hingegen fast ausschließlich auf der Transgen-Expression. Diese Daten stimmen folglich mit den Expressionsergebnissen überein, wobei aber im Darm keine Erniedrigung der Aktivität in den transgenen Tieren zu finden war.

4.1.2. Einfluss der ACE2 Überexpression auf verschiedene RAS Komponenten

Die transgenen SHRSP-ACE2 Ratten wiesen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Ang-(1-7) Level sowie eine tendenziell, aber nicht signifikant, erniedrigte Ang II Konzentration auf. Des Weiteren wurde kein signifikanter Unterschied in der Ang I Konzentration gemessen. Somit scheint in den SHRSP-ACE2 Ratten Ang-(1-7) mehr über Ang II als über Ang I gebildet zu werden. Überdies könnte die leichte, aber nicht signifikante Erhöhung von Ang I eine kompensatorisch angepasste Bereitstellung des Substrats für die Ang II Produktion sowie der Grund für das Fehlen einer signifikanten Reduktion von Ang II darstellen. Ferner konnten auch bei der Reninaktivität sowie -konzentration keine signifikanten Unterschiede zwischen den SHRSP-ACE2 Tieren und deren Kontrollen gefunden werden.

Die erhaltenen Ergebnisse der transgenen SHRSP-ACE2 Tiere stehen im Gegensatz zu denen der SD-ACE2 Ratten und deren Kontrollen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Ang I Level sowie der Reninaktivität und -konzentration in den transgenen Tieren. Kein Unterschied war hingegen bei der Ang-(1-7) sowie der Ang II Konzentration zu detektieren. Daher kann vermutet werden, dass in diesen normotensiven Hintergrund eher Ang I als bevorzugtes Substrat von ACE2 in Frage kommt. Vickers *et al.* konnte zwar eine 400-fach größere Effizienz von ACE2 für Ang II detektieren (Vickers *et al.*, 2002), aber eine Studie von Li *et al.* wiederum zeigte, dass

es dadurch nicht immer das bevorzugte Substrat sein muss (Li *et al.*, 2005a). So konnte diese Arbeitsgruppe in den proximalen Tubuli der Niere von SD Ratten Ang I als bevorzugtes Substrat der ACE2 Hydrolyse identifizieren. Ferner zeigten sie, dass Ang II nur eine untergeordnete Rolle in der Ang-(1-7) Produktion in diesen Nierensegmenten spielt.

Ang I wird ferner nicht direkt zu Ang-(1-7) sondern zu Ang-(1-9) abgebaut. Letzteres kann dann durch ACE oder andere Endopeptidasen, wie Nephilysin, weiter zum Heptapeptid umgewandelt werden (Donoghue *et al.*, 2000; Tschöpe *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005a). Dieser Zwischenschritt könnte möglicherweise eine Erklärung für die nicht erhaltene Zunahme der Ang-(1-7) Konzentration in SD-ACE2 Ratten darstellen. Überdies wurde auch von Ang-(1-9) berichtet, die Freisetzung von Arachidonsäure und BK zu erhöhen sowie die Resensitivierung des B2-Rezeptors zu fördern (Marcic *et al.*, 1999). Somit könnte auch Ang-(1-9) eine Potenzierung der BK-Effekte bewirken.

4.1.3. Akute Auswirkung der ACE2 Überexpression

Eine beobachtete akute Wirkung der ACE2 Überexpression war eine reduzierte vasokonstriktorische Reaktion nach Gabe von Ang II. Hierbei war die Aktivität von ACE2 ausschlaggebend, da durch einen spezifischen ACE2 Inhibitor die Unterschiede in der Vasokonstriktion zwischen den transgenen Ratten und deren SHRSP Kontrollen aufgehoben werden konnten. Der gleiche Effekt konnte auch bei den SD-ACE2 Tieren entdeckt werden, wobei hier die Reaktion auf Ang II stärker ausfiel als bei den hypertensiven SHRSP Ratten. Eine mögliche Erklärung hierfür, ist der bereits bestehenden höheren Gefäßtonus in SHRSP Tieren im Vergleich zu den SD Ratten.

Diese durch ACE2 ausgelöste verminderte vasokonstriktorische Reaktion könnte entweder durch die schnellere Degradierung von Ang II und/oder durch die erhöhte Erzeugung des Vasodilatators Ang-(1-7) hervorgerufen werden. Um die Beteiligung von Ang-(1-7) in der Wirkung von ACE2 zu prüfen, wurde die vasokonstriktorische Reaktion auf Ang II nach einer Langzeitinfusion von A-779 untersucht. A-779, auch D-Ala⁷-Ang-(1-7) genannt, ist ein potenter und selektiver Ang-(1-7) Antagonist. Dieser kann die Bindung des Heptapeptids an seinen Rezeptor Mas unterbinden und dadurch unter anderem den vasodilatatorischen Effekt von Ang-(1-7) aufheben (Santos *et al.*, 1994; Ren *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2007). In den SHRSP-ACE2 Ratten konnte A-779 aber keinen Effekt vorweisen. So wurde weder eine Erhöhung der vasokonstriktorischen Reaktion auf Ang II Gabe noch eine Veränderung des Blutdrucks

in den transgenen Tieren festgestellt. Folglich scheint hier die akute Degradation von Ang II wichtiger für die Reduktion des vasokonstriktorisches Effekts als die Erhöhung von Ang-(1-7) zu sein. Dies würde überdies auch die gleiche Wirkung in den SD-ACE2 Ratten erklären, in welchen die ACE2 Überexpression keine Auswirkung auf die Ang-(1-7) Konzentration im Plasma zeigte. Es könnten aber auch andere Mechanismen eine Rolle spielen. So könnte eine mögliche Erklärung in einer ACE2 abhängigen Modulation der AT₁-Rezeptor Expression liegen. Igase *et al.* berichtete bereits über eine Assoziation zwischen AT₁-Rezeptoren und ACE2 Expression. Dabei wurde gezeigt, dass die Gabe eines AT₁-Antagonisten die Expression von ACE2 erhöhte (Igase *et al.*, 2005). Überdies wurde auch eine AT₁-Rezeptor Erniedrigung nach einer Überexpression von ACE2 im Subfornicalem Organ von Mäusen beschrieben, welches unter anderem in der Regulation des Blutdrucks, der Na-Sekretion, des Durstgefühls sowie der Vasopressin Sekretion involviert ist (Feng *et al.*, 2008). Somit könnte auch eine chronische ACE2 Erhöhung in den glatten Muskelzellen eine Modulation der AT₁-Rezeptor Expression bewirken, wobei dessen Erniedrigung eine verminderte Effektivität von Ang II auslösen würde. Des Weiteren könnte aber auch eine Erhöhung der AT₂-Rezeptor Expression eine Rolle spielen. Mehrere Studien belegen, dass die durch Aktivierung der AT₂-Rezeptoren hervorgerufenen Effekte entgegengesetzt zu denen von AT₁-Rezeptoren sind (Ardailou, 1999; de Gasparo *et al.*, 1999). So kann dessen Aktivierung unter anderem eine Vasodilatation, Apoptose und anti-proliferative Effekte hervorrufen. Ferner konnte von Goto *et al.* gezeigt werden, dass dieser Rezeptortyp in der Niere von SHRSP Ratten erniedrigt ist (Goto *et al.*, 2002).

Überdies muss erwähnt werden, dass in einer Publikation von Silva *et al.* gezeigt wurde, dass der vasodilatatorische Effekt von Ang-(1-7) in deren *in vitro* Studie nur durch die Gabe des Mas Antagonisten D-Pro⁷-Ang-(1-7) gehemmt werden konnte, aber nicht durch A-779 (Silva *et al.*, 2007). Das deutet die Existenz eines weiteren Ang-(1-7) Rezeptors an und würde die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich der A-779 Gabe erklären.

4.1.4. ACE2 Wirkung auf den Blutdruck und die Endothelfunktion

In den SHRSP-ACE2 Ratten wirkte sich die ACE2 Überexpression positiv auf den Blutdruck aus. Verglichen mit den SHRSP Kontrollen war der mittlere Blutdruck in den transgenen Tieren signifikant erniedrigt. Im Vergleich dazu, fand man in den transgenen Tieren mit dem normotensiven SD-Hintergrund keine signifikante Erniedrigung des

mittleren arteriellen Blutdrucks, sondern nur des diastolischen Blutdrucks. Letzterer ist ein Maß für die Elastizität der Arterien bzw. Arteriolen, welche den Widerstand, der dem Blutfluss entgegensteht, über eine Dilatation regeln. Somit sinkt der diastolische Blutdruck, wenn die Fähigkeit zur Dilatation verbessert ist und somit der Widerstand geringer wird. So findet man auch in den SHRSP-ACE2 Tieren, verglichen mit den Kontrollen, einen deutlicheren Unterschied im diastolischen als im systolischen Blutdruck. Somit deuten die Werte beider transgenen Tierlinien auf eine verbesserte Endothelfunktion hin.

Eine bedeutende Folgeerscheinung einer Hypertonie ist die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion, deren Entwicklung auch in den SHRSP Ratten sowie in anderen Tiermodellen mit Hypertonie nachgewiesen werden konnte (Fennell *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2004). Das Schlüsselmerkmal in diesen Prozess ist die Unfähigkeit der Arterien und Arteriolen auf einen Reiz adäquat zu dilatieren und resultiert in einem Ausfall von vasoaktiven, gerinnungshemmenden und anti-inflammatorischen Effekten im Endothel (Boulanger, 1999). Ferner ist die endotheliale Dysfunktion meist der erste Schritt bei der Entwicklung vieler kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Arteriosklerose, Diabetes oder Herzinsuffizienz (Shimokawa, 1999; De Vriese *et al.*, 2000; Landmesser *et al.*, 2002). Daher war die wahrscheinlich wichtigste Beobachtung dieser Studie, dass die Überexpression von ACE2 einen protektiven Effekt in Bezug auf die Gefäßwand auszuüben scheint. Dieser Effekt konnte zum einen mittels einer *in vitro* Studie demonstriert werden, in der die Vasorelaxation von Aortaringen auf die Gabe des endothelabhängigen Vasodilatators Carbachol untersucht wurde. Dabei wurde eine eindeutige Verbesserung der Vasodilatation in den transgenen Tieren im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Dieses Ergebnis konnte ferner durch die Bestimmung der Endothelfunktion *in vivo* bestätigt werden. Interessanterweise war diese aber in den transgenen Tieren nicht direkt an einer verbesserten Vasodilatation in Reaktion auf eine ACh oder BK Gabe sichtbar, sondern erst nach der Normalisierung der ACh- bzw. BK- Werte über die SNP-Werte.

Diese Diskrepanz in der vasodilatatorischen Reaktion auf Carbachol zwischen den beiden Messmethoden kann durch den Unterschied im Grundtonus der Gefäße erklärt werden. So wird bei der *in vitro* Methode für alle Gefäße der gleiche Grundtonus eingestellt. Im Vergleich dazu ist bei der *in vivo* Methode dieser von dem jeweilig herrschenden Blutdruck abhängig. Somit erwartet man in den SHRSP-ACE2 Tieren, welche einen signifikant erniedrigten Blutdruck im Vergleich zu den Kontrollen

aufweisen, einen geringeren Gefäßtonus und damit eine geringere Blutdruckänderung in Reaktion auf einen Vasodilatator. Diese Hypothese wird auch durch die in vivo Ergebnisse der Endothelfunktionsmessung in den transgenen SD-ACE2 Ratten bestätigt, welche keinen mit den SHRSP-ACE2 Ratten vergleichbaren Blutdruckunterschied zu den Kontrollen aufwiesen. So zeigten die transgenen Ratten, verglichen mit den SD Kontrollen, bereits eine bessere Vasodilatation in Reaktion auf eine ACh Gabe sowie keinen Unterschied in der endothelunabhängigen Reaktion auf SNP. Somit waren diese Daten mit den in vitro Ergebnissen der SHRSP-ACE2 Ratten vergleichbar.

Die hier für SHRSP Ratten beschriebene endotheliale Dysfunktion wurde auch in Mas knock-out Mäusen beobachtet (Peiro *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Mas, neben einem erhöhten Blutdruck, auch zu einem Ungleichgewicht zwischen NO und reaktiven Sauerstoffspezies führt (Xu *et al.*, 2008), welches ausschlaggebend für die Entstehung dieser Dysfunktion sein könnte. Somit ist es denkbar, dass die erhöhte Ang-(1-7) Konzentration in den SHRSP-ACE2 Tieren eine entscheidende Rolle in der Verbesserung der Endothelfunktion spielt. So wurde bereits gezeigt, dass Ang-(1-7) über Mas den potenziell schädlichen Effekten von Ang II in Endothelzellen entgegenwirken kann, in dem es die AT1-Rezeptor -aktivierte Signaltransduktionskaskade negativ moduliert (Sampaio *et al.*, 2007). Überdies könnte bei der Wirkung von Ang-(1-7) auch eine Stimulation der Prostaglandin Synthese, AT₂-Rezeptor-abhängige Mechanismen sowie eine BK-Potenzierung involviert sein (Brosnihan *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Muthalif *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 2001). Da aber auch bei den SD-ACE2 Tieren, welche keine erhöhten Ang-(1-7) Konzentrationen im Plasma aufwiesen, eine verbesserte Endothelfunktion nachgewiesen wurde, scheinen noch andere Mechanismen eine Rolle zu spielen.

4.1.5. Einfluss von ACE2 auf die Bildung von NO und ROS

Das vaskuläre Endothel spielt eine bedeutende Rolle in der Erhaltung der Gefäßspannung und des Blutdrucks durch die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen, wie NO, Prostaglandine, Endothelin oder reaktiven Sauerstoffspezies (Bayraktutan, 2002). Unter pathologischen Konditionen ändern sich die Eigenschaften des Endothels und führen zu der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion (Boulanger, 1999). Diese wird entweder durch eine erhöhte Inaktivierung von NO (Ma *et al.*, 2001) oder durch eine erniedrigte NOS-Aktivität verursacht (Matsuoka *et al.*, 1997).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von ACE2 auf die NO-Produktion sowie die Entstehung radikaler Sauerstoffspezies genauer untersucht.

Die NO-Verfügbarkeit wurde nachgeprüft, indem den Tieren der NO-Synthase Inhibitor L-NAME injiziert und daraufhin die Veränderung des Blutdrucks gemessen wurde. Dabei zeigten die SHRSP-ACE2 Tiere eine größere Blutdruckänderung als die Kontrollen, was eine bessere NO-Bereitstellung für diese Tiere andeutet. Folglich wurde die eNOS Expression, die NO-Konzentration im Plasma sowie die Konzentration von cGMP im Aortenhomogenat bestimmt. Dabei konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen Ratten und den Kontrollen festgestellt werden. Bereits mehrfach wurde gezeigt, dass auch eine übermäßige vaskuläre NO-Produktion sowie ein erniedrigter Metabolismus der reaktiven Sauerstoffspezies mit der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion assoziiert sind (Kerr *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001; Ulker *et al.*, 2003). Um die Rolle von ROS in diesem transgenen Tiermodell zu untersuchen, wurde die Aktivität der Superoxid-Dismutase sowie die Lipidperoxidation ermittelt.

Die Lipidperoxidation, welche ein Zeichen für oxidativen Stress in Zellen darstellt, zeigte eine signifikante Erniedrigung in den SHRSP-ACE2 Ratten. Dagegen konnte bei der Bestimmung der Aktivität der SOD, ein Enzym, welches die Zellen vor der reaktiven Sauerstoffverbindung Superoxid schützt, indem es dieses weiter abbaut, kein Unterschied zwischen den transgenen Tieren und den Kontrollen gefunden werden. Somit scheinen andere ROS Komponenten eine Rolle zu spielen. Unter anderem könnte gebildetes Wasserstoffperoxid, welches durch den Abbau von Superoxid entsteht, eine schädliche Wirkung in den SHRSP Tieren ausüben. So konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Katalase, welche für den Abbau von Wasserstoffperoxid verantwortlich ist, die endothelabhängige Relaxation in SHR Ratten verbessert wurde (Ulker *et al.*, 2003). Außerdem ist Wasserstoffperoxid stabiler als sein Vorläufer Superoxid und kann die glatte Muskelzellmembran sehr leicht durchqueren. Dort treibt es die Ausbildung einer Hypertrophie voran und aktiviert verschiedene Enzyme, wie z.B. Matrix-Metalloproteasen (Griendling *et al.*, 1997).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ang II viele seiner (patho)physiologischen Effekte durch eine Stimulation der ROS-Produktion auslöst, wobei vor allem die NADPH Oxidase involviert ist (Touyz *et al.*, 2005; An *et al.*, 2007; Oudit *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008). Dieses Enzym produziert aus Sauerstoff und NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) das reaktive Superoxid O_2^- . Eine

Beteiligung dieses Enzyms wurde ferner bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion in den Mas Rezeptor knock-out Mäusen diskutiert (Xu *et al.*, 2008).

4.1.6. Auswirkung der ACE2 Überexpression auf die Endorganschäden von SHRSP Ratten

Hypertonie ist ein Hauptrisikofaktor für verschiedene Arten von vaskulären Ereignissen und fortschreitender Endorganschädigung, wie Schlaganfall, kardiale Hypertrophie, Nephrosklerose und Arteriosklerose. In SHRSP Ratten stellen daher eine frühe Entwicklung einer kardialen Hypertrophie sowie die Ausbildung einer myokardialen Fibrose typische Kennzeichen der Erkrankung dar (Devlin *et al.*, 1995; Shimamura *et al.*, 1999). Daher wurde im Rahmen dieser Studie die Auswirkung einer ACE2 Überexpression auf die Herzmorphologie untersucht.

Dabei konnte eine eindeutig herabgesetzte Schädigung des Herzens in den transgenen Tieren festgestellt werden. So zeigten die SHRSP-ACE2 Ratten eine verminderte Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie, welches an einem geringeren relativen Gewicht des linken Ventrikels, verglichen mit den Kontrollen, erkennbar war. Des Weiteren wurde anhand von histologischen Schnitten des Herzens die Ausbildung einer Fibrose überprüft. So reduzierte die ACE2 Überexpression insbesondere die perivaskuläre Fibrose.

Anzunehmen ist, dass diese Effekte auf den erniedrigten Blutdruck und folglich auf die reduzierte Herzfüllung in den transgenen Ratten zurückzuführen sind. Eine weitere Erklärung hierfür könnte aber auch in der erhöhten Menge von zirkulierenden Ang-(1-7) liegen, welches seinerseits eine direkte Auswirkung auf die Herzleistung haben könnte. So weisen mehrere Studien auf einen direkten Einfluss der ACE2 / Ang-(1-7) / Mas Achse auf die Herzfunktion hin (Loot *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2005; Benter *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Trask *et al.*, 2007). In transgenen Ratten mit einer erhöhten Konzentration von zirkulierenden Ang-(1-7) konnte eine Isoproterenol-induzierte Myokardhypertrophie schlechter induziert werden und die Tiere zeigten reduzierte Reperfusion-Arrhythmien sowie eine verbesserte postischämische Funktion (Santos *et al.*, 2004). Überdies wiesen auch Mas knock-out Mäuse eine beeinflusste Herzfunktion auf, was wiederum die funktionelle Rolle dieses Rezeptors und seines Liganden im Herzen widerspiegelt (Santos *et al.*, 2006). Dabei wiesen diese knock-out Mäuse unter anderem eine Blutdruck-unabhängige Fibrosebildung im Herzen auf. Auch eine neuere Studie von Ferreira *et al.*, bei der Ratten mit einer Ang-(1-7) Überexpression im Herzen

generiert und untersucht wurden, demonstrierte einen antifibrotischen Effekt dieses Peptids im Herzen, welcher ebenfalls Blutdruck-unabhängig war (Ferreira et al., 2008, eingereicht).

Eine weitere Untersuchung betraf die Wirkung der ACE2 Überexpression in der Nierenfunktion der SHRSP Ratten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die exkretorische Funktion der Niere mittels metabolischer Käfige bestimmt, wobei der Urin von 24 h gesammelt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die ACE2 Überexpression eine diuretische Wirkung ausübt, welche mit einer erhöhten Trinkwassermenge und einer erniedrigten Osmolarität einherging. Im Gegensatz dazu waren keine Unterschiede in der Urinmenge bei gleichaltrigen SD-ACE2 Ratten und deren Kontrollen festzustellen.

Da die SHRSP-ACE2 Ratten in Gegensatz zu den SD-ACE2 Ratten eine erhöhte Ang-(1-7) Konzentration aufweisen, könnte dieses Peptid eine entscheidende Rolle in dem beobachteten diuretischen Effekt spielen. Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der renalen Funktion des Heptapeptids sind aber sehr widersprüchlich. So wurde dem Peptid eine diuretische (DelliPizzi et al., 1994; Handa et al., 1996) sowie antidiuretische Wirkung (Santos et al., 1992; Baracho et al., 1998) nachgesagt. Neuere Studien mit transgenen Ratten, welche eine erhöhte zirkulierende Ang-(1-7) Konzentration aufwiesen, zeigten ein leicht verringertes Urinvolumen mit höherer Osmolalität (Ferreira et al., 2006). Dieser Befund deutete auf eine antidiuretische Wirkung des Heptapeptids hin. Wiederum demonstrierte eine erst kürzlich publizierte Studie, dass Ang-(1-7) unter bestimmten Umständen eine Diurese hervorrufen kann. So induzierte dieses Peptid einen diuretischen Effekt in der späten Phase der Schwangerschaft von Ratten, welcher ferner mit einer Erniedrigung von Aquaporin-1 sowie einer erhöhten Trinkwasseraufnahme verbunden war (Joyner et al., 2008).

Abgesehen von den sekretorischen Effekten von ACE2 bzw. Ang-(1-7) in der Niere, konnte auch eine pathophysiologische Funktion dieser Carboxypeptidase beschrieben werden. So präsentierte Oudit et al. eine positive Auswirkung von ACE2 in Bezug auf die Nierenfunktion anhand von ACE2 knock-out Mäusen (Oudit et al., 2006). Diese zeigten die Ausbildung einer Ang II abhängigen Glomerulosklerose, wobei die fortschreitende Nierenschädigung mit einer angestiegenen Ablagerung von Kollagen I, Kollagen III sowie Fibronectin in den Glomeruli und einer höheren Albuminexkretion im Urin assoziiert war. So konnte in den ACE2 knock-out Mäusen auch eine verstärkte diabetische Nephropathie nachgewiesen werden (Wong et al., 2007). Ferner zeigten diabetische (db/db) Mäuse eine reduzierte glomeruläre ACE2 Expression sowie eine

verstärkte Nierenschädigung nach der Behandlung mit einem ACE2 Hemmer (Ye *et al.*, 2006).

Die ACE2 Überexpression in den SHRSP Ratten ging mit einer signifikant erhöhten Kreatinin-Clearance sowie einer signifikant erniedrigten Albumin-Ausscheidung einher. Die Kreatinin-Clearance ist ein Zeichen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und stellt für die Abschätzung der Nierenfunktion die wichtigste Größe dar. Dabei bedeutet eine verminderte Clearance, eine verringerte glomeruläre Filtration und ist somit ein Zeichen für eine Nierenschädigung. Auch die vermehrte Ausscheidung von Albumin ist dafür ein deutliches Anzeichen. Somit weisen die Daten von den transgenen SHRSP-ACE2 Ratten auf eine verminderte Nierenschädigung hin, was die bisherigen Daten zur renalen ACE2 Funktion bestätigte.

In der bereits erwähnten Studie von Oudit *et al.* konnten die strukturellen und funktionellen Veränderungen in den ACE2 knock-out Mäusen durch die Gabe eines AT₁-Rezeptor-Antagonisten verhindert werden. Folglich scheint die positive Wirkung von ACE2 auf der Degradation von Ang II zu beruhen. Neben ACE2 könnte aber auch Ang-(1-7) wichtig sein, da in diesen knock-out Mäusen, neben einem verringerten Abbau von Ang II, auch eine verminderte Bildung von Ang-(1-7) zu finden war (Gurley *et al.*, 2006). Überdies konnte in proximalen tubulären Zellen eine Hemmung der durch Ang II ausgelösten Signaltransduktionskaskade verzeichnet werden (Su *et al.*, 2006). Somit scheinen beide RAS Komponenten eine pathophysiologische Rolle in der Niere zu spielen, wobei aber noch viele offene Fragen zu beantworten sind.

4.2. Überexpression von Ang-(1-7) in den glatten Muskelzellen von Ratten

Die ACE2 Überexpression in den SHRSP Ratten führte neben vielen protektiven Effekten auch zu einer signifikanten Erhöhung der Ang-(1-7) Konzentration. Der Mas Rezeptor Antagonist A-779 konnte aber weder beim Blutdruck noch in der vasokonstriktorischen Reaktion auf Ang II eine Wirkung hervorrufen. Ferner führte die Überexpression von ACE2 in den normotensiven SD-ACE2 Ratten nicht zu einem Anstieg der Ang-(1-7) Konzentration, zeigte aber eine verbesserte Endothelfunktion sowie eine Verringerung des diastolischen Blutdrucks. Somit konnte noch keine Aussage über die direkte Wirkung von Ang-(1-7), welche vor allem in der Pathogenese der SHRSP Ratten von Interesse wäre, getroffen werden. Daher sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit transgene Ratten generiert werden, welche eine chronische Ang-(1-7) Überexpression in den glatten Muskelzellen aufweisen. Dafür sollten sowohl

normotensive SD Ratten als auch hypertensive SHRSP Tiere benutzt werden. Bisher konnten aber nur transgene SD Ratten generiert und grob charakterisiert werden.

Um eine Expression des Heptapeptids zu ermöglichen, wurde eine Art Fusionsprotein verwendet, welches zwischen die Promotor- und die Peptidsequenz kloniert wurde. Dieses Fusionsprotein stellte eine biologische Peptidpumpe dar, welche das Transgen befähigt das Peptid in einem spezifischen Gewebe oder Zelltyp freizusetzen. Dabei spielt ferner die Wirkung des in der Zelle konstitutiv exprimierten Enzyms *Furin* eine Rolle, welches fähig ist, das Peptid vom Fusionsprotein zu spalten. Der größte Vorteil dieser Technik ist somit die Sekretion eines Peptids ohne die Beteiligung der klassischen Komponenten der RAS Kaskade. Diese Strategie wurde von Methot *et al.* entwickelt (Methot *et al.*, 2001) und fand danach Anwendung in der Produktion von transgenen Mäusen mit Überexpression von Ang II im Herzen (van Kats *et al.*, 2001) und im Gehirn (Lochard *et al.*, 2003).

Des Weiteren wurden bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Bader transgene Ratten mit Überexpression von Ang-(1-7) im Hoden (Santos *et al.*, 2004) sowie im Herzen (Ferreira *et al.*, 2008, eingereicht) generiert, wobei unter anderem die züchterische Betreuung dieser Linien im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurde. Anhand dieser transgenen Linien konnte bereits der Nachweis für das Funktionieren des Fusionsproteins erbracht werden. So konnte in beiden Linien eine signifikant erhöhte Ang-(1-7) Konzentration im jeweiligen Expressionsgewebe sowie im Plasma detektiert werden (Santos *et al.*, 2004). Interessanterweise verursachte diese Erhöhung aber keine Veränderung im Blutdruck. In den Ratten, welche eine Überexpression im Hoden aufwiesen, rief der Anstieg der zirkulierenden Heptapeptid-Konzentration kardioprotektive Effekte hervor, wie eine verminderte Entwicklung einer kardialen Hypertrophie, reduzierte Reperfusions-Arrhythmien und eine verbesserte postischämische Funktion (Santos *et al.*, 2004). Ferner präsentierten die transgenen Tiere, im Vergleich zu den Kontrollen, einen erniedrigten peripheren Widerstand in verschiedenen Organen. Daher wurde vermutet, dass eine physiologische Funktion von Ang-(1-7) in der Modulation des Gefäßtonus der regionalen Blutgefäße besteht (Bothelo-Santos *et al.*, 2007). Überdies bewirkte das zirkulierende Heptapeptid bezüglich der Niere eine antidiuretische Wirkung (Ferreira *et al.*, 2006).

Die hier erzeugten transgenen Ratten sollten eine Überexpression des Heptapeptids in den glatten Muskelzellen aufweisen. Dafür wurde die Ang-(1-7) Sequenz unter die Kontrolle des SMMHC Promotors gebracht. Die Wahl fiel auf diesen Promotor, da der

für die Überexpression von ACE2 verwendete SM22 α Promotor zwar eine gewebsspezifische, aber doch sehr schwache Expression induzierte. Hingegen konnte bereits in vielen Tiermodellen gezeigt werden, dass der SMMHC-Promotor eine starke Expression in den glatten Muskelzellen hervorruft, wobei diese aber nicht nur auf die vaskulären glatten Muskelzellen beschränkt ist (Regan *et al.*, 2000)

Die Expressionsanalyse des Transgens wurde mittels RPA durchgeführt. Die verwendete RPA-Sonde war dabei komplementär zum IgG2b Segment, welches ein Teil des Fusionsproteins darstellte. So wurde in allen Organen, die einen großen Anteil an glatten Muskelzellen besitzen, wie Aorta, Lunge, Darm, Magen und Blase, eine starke Expression nachgewiesen. Der Radioimmunoassay zum Nachweis der Ang-(1-7) Peptidkonzentration konnte aber leider noch nicht durchgeführt werden. Allerdings wurde der Einfluss der erhöhten Ang-(1-7) Expression auf andere RAS Komponenten, wie Ang I-, Ang II- und Reninkonzentration sowie dessen Aktivität bestimmt. Hierbei konnten aber keine Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und den Kontrollen gefunden werden. Ferner wurde der Blutdruck bestimmt, wobei auch keine Erniedrigung in den transgenen Tieren beobachtet wurde. Dies stimmt aber überein mit den Daten der anderen transgenen Rattenlinien mit Überexpression von Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2006). Somit scheint dieses Peptid keinen direkten vasodilatatorischen Effekt zu haben. Eine definitive Aussage kann darüber aber erst nach Bestimmung der Heptapeptid-Konzentration sowie der Erzeugung und Charakterisierung der transgenen SHRSP Ratten getroffen werden. Letztere sollten durch den hypertensiven Hintergrund wesentlich aussagekräftiger sein. Somit steht die Untersuchung der Ang-(1-7) Funktion in diesem Tiermodell noch am Anfang. Zukünftig kann es aber helfen, die durch die Überexpression von ACE2 ausgelösten Effekte besser zu verstehen.

4.3. Nutzung der Cre-loxP Technologie für die Überexpression eines Transgens

Viele Promotoren, die eine gewebespezifische Expression hervorrufen, haben oft den Nachteil einer geringen Expressionsstärke. Dies war unter anderem auch bei der Überexpression von ACE2 mithilfe des SM22 α Promotors der Fall. Daher war das Ziel dieses Projektes die Etablierung einer Methode zur Verbesserung einer Transgenexpression in den glatten Muskelzellen von Ratten.

Um dieses Problem zu lösen, wurde bei der Erzeugung der transgenen Linien die Cre-loxP Technologie benutzt. Diese stellt ein bedeutendes Werkzeug für die Manipulation

der Genexpression in Mäusen und Ratten dar, da eine Zelltyp-spezifische Aktivierung oder Inaktivierung von Genen durchgeführt werden kann. Bekannt wurde diese Technologie, vor allem bei der Erzeugung von konditionellen knock-out Mäusen (Lakso *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1993; Kuhn *et al.*, 1995; Ventura *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006). In den letzten Jahren fand das Cre-loxP System aber auch eine zunehmende Verwendung bei der Aktivierung von Genen. Das bekannteste Beispiel dafür ist die ROSA26 Cre-Reporter Mauslinie. Das Konstrukt hierbei ermöglichte neben der Deletion eines Gens auch die Kontrolle der Effizienz der Cre-Rekombinase (Soriano, 1999). Dabei wird nach der Deletion eines Gens durch die Rekombinase die Transkription des *lacZ* Gens angeschaltet, welches nachfolgend mittels einer Färbung nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde das gleiche Prinzip wie bei den ROSA26 Mäusen ausgenutzt, nur dass hier das Reportergen deletiert und dadurch die Transkription des Gens von Interesse angeschaltet wurde.

Angestrebt wurde eine Expressionsaktivierung in den glatten Muskelzellen. Ein Hauptproblem bei der gezielten Cre-Expression in den glatten Muskelzellen ist der Fakt, dass viele hierfür spezifischen Promotoren während der Entwicklung vorübergehend auch in anderen Zelltypen, wie im Herzen, exprimiert sein können (Li *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 1999). Diese vorübergehende Expression der Rekombinase würde somit eine Inaktivierung des Reportergens bzw. eine Aktivierung des Zielgens in diesen Geweben zur Folge haben. Somit war die Wahl des Promotors ausschlaggebend. Diese fiel deshalb auf den SMMHC-Promotor, da er fast ausschließlich in glatten Muskelzellen angeschaltet wird (Miano *et al.*, 1994; Owens, 1995; Regan *et al.*, 2000). Der SM22 α Promotor hingegen, würde sich zwar wegen seiner spezifischen Expression in den vaskulären glatten Muskelzellen eignen, zeigt aber, wie bereits erwähnt, während der Embryonalphase eine vorübergehende Expression im Herzen sowie im Skelettmuskel (Solway *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996).

Die Verwendung der Cre-loxP Technologie erforderte die vorherige Erzeugung von zwei transgenen Rattenlinien. Eine Rattenlinie enthielt das SMMHCCre Konstrukt, welches die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des glatten Muskelzell-spezifischen Promotors beinhaltete. Die andere generierte Rattenlinie mit dem RGS5HAlox Konstrukt wiederum trug das gefloxtete Reportergen unter der Kontrolle des ubiquitären CX1 Promotors sowie strangabwärts das zu aktivierende Gen, hier RGS5. Diese beiden Linien mussten zuerst bis zur Homozygotie gezüchtet werden, um sie dann miteinander kreuzen zu können. Der größte Nachteil bei der Verwendung des Cre-loxP

Rekombinasesystems ist somit der enorme Zeitaufwand. Allerdings bietet es bei einer späteren Anwendung auf andere Gene den Vorteil, dass nur noch das zu aktivierende Gen ausgetauscht werden muss, was den üblichen Klonierungsaufwand minimiert.

Nach der Generierung der transgenen Rattenlinien wurden die jeweiligen Expressionen untersucht. Dabei wurde die Cre-Expression nur in Organen mit großen Muskelzellanteil detektiert. Die TGR(RGS5HAlox) Ratten hingegen wiesen die erwartete ubiquitäre eGFP Expression auf (Okabe *et al.*, 1997). Nach der Kreuzung dieser beiden transgenen Linien wurden die Nachkommen, welche beide Konstrukte enthielten, auf die Expression von eGFP sowie von RGS5 untersucht. Dabei konnte ein Verlust oder zumindest eine Verringerung von eGFP in den glatten Muskelzellen auf DNA-Ebene mittels PCR, auf RNA-Ebene mittels RPA sowie auf Protein-Ebene mittels Western Blot oder anhand von Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Da alle Zellen das Konstrukt enthalten und exprimieren können ist es aber schwer einzuschätzen, wie effektiv die Cre-Rekombinase arbeitet. So wurden bei allen hier verwendeten Nachweismethoden verschiedene Organe getestet, welche eine Kombination verschiedener Zellen darstellen. Dennoch zeigten Organe mit einem großen Anteil an glatten Muskelzellen, wie Darm, Magen, Aorta oder Blase, eindeutig eine Reduktion der Reporterexpression.

Des Weiteren wurde versucht, die Expression von RGS5 zu detektieren. Diese konnte aber vorerst nur mithilfe einer RT-PCR nachgewiesen werden. Die Proben der Kontrollen, bei denen es sich um transgene Ratten mit dem RGS5HAlox Konstrukt handelte, zeigten dabei kein PCR-Produkt. In den Organen der doppeltransgenen Ratten hingegen konnte eine Expression von RGS5 detektiert werden. Allerdings zeigte diese sich in allen getesteten Organen, wobei die mit einem höheren Anteil an glatten Muskelzellen eine stärkere PCR-Bande aufwiesen. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den PCR-Produkten wirklich um RGS5 cDNA handelte, wurden diese noch sequenziert. Die Expression von RGS5 in Organen, wie Leber oder Skelettmuskel, könnte ferner auf die enthaltenen glatten Muskelzellen der Gefäße zurückzuführen sein. So ist die PCR ein sehr sensibles Verfahren, welche schon geringe Konzentrationen an cDNA erkennt und amplifiziert. Daher muss die RGS5 Expression noch genauer untersucht werden. So wurde bereits versucht mittels RPA und Western Blot die RGS5 Expression nachzuweisen, wobei das bis jetzt noch keine Ergebnisse erbracht hat. Dies begründete sich aber eher auf technischen Problemen, wie eine fehlende Spezifität der verwendeten Antikörper.

Der funktionelle Nachweis dieser Methode zur Aktivierung von Genen konnte aber bereits in Mäusen gezeigt werden (Dikalova *et al.*, 2005). Auch hier wurde eine glatte Muskelzell-spezifische Expression via SMMHC Promotor ausgelöst. Überdies zeigte diese Methode die gleiche Effektivität in der Expression von Genen in anderen Geweben, wie dem Nervensystem (Zhang *et al.*, 2007).

4.4. Nähere Charakterisierung der Rezeptor-ähnlichen Funktion von ACE

ACE ist eine transmembranäre Carboxydipeptidase, welche mit zirkulierenden Substraten und Inhibitoren interagiert, was wiederum eine Konformationsänderung bewirkt (Natesh *et al.*, 2003). Kohlstedt *et al.* zeigten ferner, dass nach einer solchen Interaktion des humanen ACE mit den ACE-Inhibitoren Ramiprilat und Perindoprilat sowie mit dem Substrat BK eine Signaltransduktion ausgelöst wird (Kohlstedt *et al.*, 2004; Kohlstedt *et al.*, 2005; Kohlstedt *et al.*, 2006). Dieser Prozess beinhaltete eine Dimerisierung, eine CK2-vermittelte Serin-Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne, eine Phosphorylierung von c-Jun via JNK sowie eine nukleäre Translokation des aktivierten c-Jun. Diese Signaltransduktionskaskade resultierte ferner in einer Modulation der Genexpression, wobei derzeit nur der Anstieg der Expression von ACE selbst sowie von COX-2 nachgewiesen wurde.

Das Ziel meiner Studie war nun die Beurteilung der zwei katalytischen Domänen von ACE in Bezug auf die Auslösung dieser Signaltransduktion sowie die Analyse weiterer involvierter Substrate, wie z.B. Ang-(1-7). Dieses Heptapeptid ist besonders interessant, da es ähnliche physiologische Effekte wie ein ACE-Inhibitor auslöst.

Für die Versuche wurden hierbei CHO Zellen verwendet, da diese keine endogene ACE Expression aufweisen. Daher wurden diese Zellen schon oft für eine Überexpression sowie Untersuchung der ACE Funktion genutzt (Wei *et al.*, 1991; Woodman *et al.*, 2005; Sabatini *et al.*, 2007). Ferner konnte bei diesen Zellen ausgeschlossen werden, dass die detektierten Ergebnisse durch eine Bindung der verwendeten Substanzen an colokalisierte Rezeptoren, wie dem AT₁- oder dem B₂-Rezeptor, oder durch eine Interaktion zwischen ACE und diesen Rezeptoren hervorgerufen wurden. Verschiedene Publikationen bestätigen, dass CHO Zellen weder AT₁- oder B₂- Rezeptoren (abu Alla *et al.*, 1996; Giles *et al.*, 1999) noch ACE2 (Donoghue *et al.*, 2000) oder Mas (Santos *et al.*, 2003) exprimieren. Somit spielt auch die Angiotensin Degradierung durch ACE2 bei den beobachteten Resultaten keine Rolle.

Diese CHO Zellen wurden hierbei mit dem Maus-ACE stabil transfiziert. Dieses unterscheidet sich in der zytoplasmatischen Domäne leicht von dem humanen ACE (Natesh *et al.*, 2003; Bernstein *et al.*, 2005). Die erhaltenen Ergebnisse zeigten aber, dass auch das mACE befähigt ist diese intrazelluläre Signalkaskade auszulösen. Das ist insofern bedeutend, da Mäuse ein wichtiges Tiermodell in der kardiovaskulären Forschung darstellen und diese Rezeptor-ähnliche Funktion von ACE eine entscheidende Rolle bei der Interpretation der Daten spielen kann.

4.4.1. Wirkung verschiedener Substrate

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur das ACE-Substrat BK sowie die Inhibitoren Ramiprilat und Lisinopril eine signifikante Stimulation der JNK-Aktivität in den Wildtyp-mACE transfizierten CHO Zellen auslösen können, sondern auch das Substrat Ang I. Dies steht im Gegensatz zu den publizierten Daten von Kohlstedt *et al.* (Kohlstedt *et al.*, 2004), welche keine Aktivierung der Signaltransduktion nach der Verwendung mit Ang I finden konnten. Die Verwendung eines CK2-Inhibitors führte ferner zu einer Hemmung dieser JNK-Aktivierung. Das entspricht der beschriebenen Rolle dieser Kinase bei der Induktion des Signalweges von ACE und es bestätigt die Spezifität des Signals nach einer Ang I Stimulation.

Die Domänen-selektiven Substrate Ang-(1-7) und AcSDKP sowie Des-(Arg⁹)-Leu⁸-BK und Ang II zeigten hingegen keinen Unterschied in der JNK-Aktivierung im Vergleich zu den Kontrollen. Auch bei der Messung der COX-2 mRNA Expression konnte nach einer Stimulation mit dem Heptapeptid keine Veränderung zu den Kontrollen beobachtet werden. Interessanterweise führte aber die Stimulation von HUVEC Zellen mit Ang-(1-7) zu einem signifikanten Anstieg der COX2 mRNA Expression. Verglichen mit dem durch BK und Ramiprilat ausgelösten Anstieg war dieser jedoch geringer. Somit scheint es, dass das transfizierte Maus-ACE, verglichen mit dem endogen exprimierten humanen ACE der HUVEC Zellen, eine geringere Aktivität in Bezug auf die Induktion dieser Signaltransduktionskaskade besitzt. Dies könnte mit den Sequenzunterschieden in der zytoplasmatischen Domäne von humanen und Maus ACE zusammenhängen.

4.4.2. Einfluss der zwei katalytischen Domänen

ACE ist ein Enzym mit zwei katalytischen Domänen, welche aus einer Tandem-Genduplikation hervorgegangen sind (Hubert *et al.*, 1991; Soubrier *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1994) und wobei jede Domäne eine Dipeptidyl-Carboxypeptidase

Aktivität und eine unterschiedliche Substratspezifität aufweist (Wei *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1992). So zeigen die beiden Domänen ähnliche katalytische Aktivitäten für Ang I und BK (Jaspard *et al.*, 1993). Das Substrat AcSDKP wiederum wird sehr selektiv von der katalytischen N-Domäne gespalten (Rousseau *et al.*, 1995). Ferner ist das Ang-(1-7) Peptid ein spezifisches Substrat für die N-Domäne, besitzt aber gleichzeitig einen inhibierenden Effekt auf die C-Domäne, wo es die Spaltung von Ang I zu Ang II hemmt (Deddish *et al.*, 1998). Ferner zeigen auch die ACE-Inhibitoren unterschiedliche Wirksamkeit bezüglich der beiden katalytischen Domänen von ACE. So zeigt Captopril eine größere Affinität für die N-Domäne und Lisinopril für die C-Domäne (Wei *et al.*, 1992; Dive *et al.*, 1999). Somit bot es sich an verschiedene Substanzen zu testen, um den Einfluss der Domänen bezüglich der Rezeptorfunktion von ACE zu deuten.

Des Weiteren wurden die CHO Zellen mit mACE Konstrukten, die nur eine aktive katalytische Domäne besaßen, stabil transfiziert. Interessanterweise zeigten in diesen beiden Zelllinien nicht nur die ACE-Inhibitoren, BK und Ang I eine signifikante Stimulation der JNK-Aktivität, sondern auch alle anderen verwendeten Substanzen. Dabei führten Ang-(1-7) und Des-(Arg⁹)-Leu⁸-BK zu einer ähnlichen Aktivierung über die katalytische C- sowie N-Domäne. AcSDKP hingegen löste eine stärkere Aktivierung über die N-Domäne aus, aber entgegen den Erwartungen, auch eine Aktivierung über die C-Domäne von mACE. Interessanterweise aktivierte auch Ang II, ein Produkt von ACE, diese Signaltransduktion in beiden Zelllinien, wobei aber die JNK-Aktivierung über die katalytische C-Domäne signifikant stärker war. So scheint, die bei der Umwandlung von Ang I zu Ang II auftretende kurzzeitige Bindung zwischen ACE und Ang II verantwortlich dafür zu sein. Daher wird vermutet, dass die alleinige Bindung einer Substanz schon ACE befähigt zur Induktion dieser Signaltransduktion.

Des Weiteren zeigten die erhaltenen Daten, dass in den Zellen mit dem Wildtyp mACE-Konstrukt kein kumulativer Effekt in der durch Ang I, BK oder den Inhibitoren ausgelösten JNK-Aktivität im Vergleich zu den Domänen-selektiven Mutanten sichtbar ist. Die Aktivität war hier vergleichbar stark. Das bedeutet, dass die Interaktion einer Substanz mit einer katalytischen Domäne völlig ausreichend für die Auslösung der Signaltransduktionskaskade ist.

Eine weitere Beobachtung, die bereits von Binevski *et al.* anhand von Rinder-ACE beschrieben wurde, ist das Auftreten einer negativen Kooperativität (Binevski *et al.*, 2003). Dabei behindern sich die Liganden gegenseitig. Dies würde den Fakt beschreiben, dass Substanzen, wie Ang-(1-7) oder AcSDKP, zwar eine signifikante

JNK-Aktivierung in den Zelllinien mit den Domänen-selektiven Mutanten auslösen, aber nicht in denen mit dem Wildtyp-Konstrukt, in welchem beide Domänen aktiv sind. So scheint es, dass sich bei der gleichzeitigen Bindung einer Substanz an beide Domänen von ACE eine Hemmung der Rezeptor-ähnlichen Funktion auftritt. Dies trifft aber nicht auf alle Substanzen zu und könnte unter anderem sterische Gründe haben. Diese negative Kooperativität der katalytischen Domänen von ACE wurden ferner bei der Degradierung von Ang I und Ang-(1-7) beschrieben (Woodman *et al.*, 2005).

Zusammenfassend weichen die hier erhaltenen Ergebnisse von den von Kohlstedt *et al.* publizierten Daten ab (Kohlstedt *et al.*, 2006). In deren Versuchen löste die katalytische N-Domäne keine ACE-Dimerisierung aus, welches ein entscheidender Schritt in der Induktion der Signaltransduktionskaskade darstellt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in Spezies-spezifischen Effekten liegen. So konnte auch eine Spezies-abhängige Substratselektivität für die katalytische C- und N-Domäne von ACE gezeigt werden (Jullien *et al.*, 2006).

Aus den hier erhaltenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass diese über ACE ausgelöste Signaltransduktion nicht nur auf den Menschen beschränkt ist, sondern auch bei Nagern eine Rolle spielt. Im Vergleich dieser Ergebnisse mit denen von Kohlstedt *et al.* existierten aber einige entscheidende Unterschiede. Diese könnten unter anderem Spezies-bedingte Unterschiede sein und daher sollte der Einfluss der verschiedenen verwendeten Substrate auch in HUVEC Zellen oder hACE transfizierten Zellen untersucht werden. Ferner sollte noch ermittelt werden, ob Ang I auch einen Anstieg der COX-2 Expression bewirkt. So wurde berichtet, dass der durch Ramiprilat-induzierte Anstieg der COX-2 Expression die Produktion der Vasodilatoren Prostacyclin und Prostaglandin E₂, aber nicht die des Vasokonstriktors Thromboxan A₂, erhöht (Kohlstedt *et al.*, 2005). Somit könnte Ang I möglicherweise eher an der Expressionsregulation anderer Gene beteiligt sein.

4.5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass ACE2 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der hypertensiven SHRSP Ratten spielt. So führte die ACE2 Überexpression in diesem Tiermodell zu einem signifikanten Ang-(1-7) Konzentrationsanstieg, zu einer Blutdruckerniedrigung, einer verminderten vasokonstriktorischen Reaktion auf Ang II sowie zu einer Abschwächung der verschiedensten Endorganschäden. Insbesondere die positive Wirkung von ACE2 bezüglich der Endothelfunktion könnte einen zentralen Mechanismus darstellen, durch welchen ACE2 seine protektiven, kardiovaskulären und renalen Effekte ausübt. So stellt das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion oft den Beginn einer Atherosklerose dar, die wiederum mit dem Auftreten von Herzinfarkt, Schlaganfall und Niereninsuffizienz assoziiert wird. Zusammengenommen deuten diese Daten an, dass die Aktivierung der ACE2 / Ang-(1-7) / Mas Achse als neue therapeutische Strategie bei der Bekämpfung von essentieller Hypertonie angestrebt werden sollte.

Die phänotypische Wirkung der ACE2 Überexpression in den normotensiven SD-ACE2 Ratten ist nicht direkt erkennbar, da diese Tiere keine mit den SHRSP Ratten vergleichbaren Endorganschäden aufweisen. Nur bei der Messung der Endothelfunktion wird sichtbar, dass auch hier die ACE2 Erhöhung protektiv wirkt. Im Gegensatz zu den SHRSP-ACE2 Ratten, erlaubt dieses Tiermodell aber die Beurteilung der Blutdruck-unabhängigen Wirkung einer ACE2 Überexpression. Überdies eignet es sich dieses Modell auch zukünftig für die Untersuchung der ACE2 Effekte auf die Induktion verschiedener Krankheiten, wie eine Isoproterenol-induzierte kardiale Hypertrophie oder eine durch Streptozocin ausgelöste Diabetes.

Des Weiteren können die hier erzeugten transgenen Ratten mit Überexpression von Ang-(1-7) helfen, die genaue Wirkweise von ACE2 besser aufzuklären. So sind die Meinungen zum Stellenwert der Degradation von Ang II und der Erzeugung von Ang-(1-7) bezüglich der protektiven Effekten von ACE2 sehr unterschiedlich.

Ferner konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit die von Kohlstedt *et al.* beschriebene Existenz einer Signaltransduktion über ACE bestätigt werden. Dabei traten aber einige Unterschiede zu deren Ergebnissen auf. So konnten hier nicht nur ACE-Inhibitoren und BK dieses sogenannte „outside-in signaling“ auslösen, sondern auch das Substrat Ang I. Die anderen verwendeten Substanzen, wie z.B. Ang-(1-7), konnten dagegen nur bei ACE-Formen mit einer aktiven katalytischen Domäne eine JNK-Aktivierung auslösen. Die gleichzeitige Aktivierung beider Domänen mit diesen Substanzen schien

die JNK-Aktivierung eher zu inhibieren. Somit verbleiben bezüglich dieses Themas noch viele offene Fragen, unter anderem hinsichtlich der eigentlichen Funktion dieser Signaltransduktionskaskade. Ferner wäre auch interessant das ACE Homolog ACE2 im Hinblick auf eine derartige Funktion zu untersuchen.

Weiterhin konnte eine Methode für eine starke Überexpression eines Transgens in den glatten Muskelzellen von Ratten etabliert werden. Diese kann zukünftig helfen, effizientere transgene Ratten zu generieren.

LITERATURVERZEICHNIS

- abu Alla, S., U. Quitterer, S. Grigoriev, et al. (1996). "Extracellular domains of the bradykinin B2 receptor involved in ligand binding and agonist sensing defined by anti-peptide antibodies." *J Biol Chem* 271(3): 1748-55.
- Akpinar, P., S. Kuwajima, J. Krutzfeldt, et al. (2005). "Tmem27: a cleaved and shed plasma membrane protein that stimulates pancreatic beta cell proliferation." *Cell Metab* 2(6): 385-97.
- Akyurek, L. M., Z. Y. Yang, K. Aoki, et al. (2000). "SM22alpha promoter targets gene expression to vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo." *Mol Med* 6(11): 983-91.
- Almeida, A. P., B. C. Frabregas, M. M. Madureira, et al. (2000). "Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart." *Braz J Med Biol Res* 33(6): 709-13.
- An, S. J., R. Boyd, M. Zhu, et al. (2007). "NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts." *Cardiovasc Res* 75(4): 702-9.
- Ardailou, R. (1999). "Angiotensin II receptors." *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S30-9.
- Baracho, N. C., A. C. Simoes-e-Silva, M. C. Khosla, et al. (1998). "Effect of selective angiotensin antagonists on the antidiuresis produced by angiotensin-(1-7) in water-loaded rats." *Braz J Med Biol Res* 31(9): 1221-7.
- Bayraktutan, U. (2002). "Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction." *Diabetes Obes Metab* 4(4): 224-38.
- Ben-Ishay, D., R. Saliternik and A. Welner (1972). "Separation of two strains of rats with inbred dissimilar sensitivity to Doca-salt hypertension." *Experientia* 28(11): 1321-2.
- Benter, I. F., M. H. Yousif, J. T. Anim, et al. (2006). "Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(2): H684-91.
- Benzing, T., I. Fleming, A. Blaukat, et al. (1999). "Angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat interferes with the sequestration of the B2 kinin receptor within the plasma membrane of native endothelial cells." *Circulation* 99(15): 2034-40.
- Bernstein, K. E., H. D. Xiao, K. Frenzel, et al. (2005). "Six truisms concerning ACE and the renin-angiotensin system deduced from the genetic analysis of mice." *Circ Res* 96(11): 1135-44.
- Binevski, P. V., E. A. Sizova, V. F. Pozdnev, et al. (2003). "Evidence for the negative cooperativity of the two active sites within bovine somatic angiotensin-converting enzyme." *FEBS Lett* 550(1-3): 84-8.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.
- Boulanger, C. M. (1999). "Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure." *J Mol Cell Cardiol* 31(1): 39-49.

- Brenner, B. M., M. E. Cooper, D. de Zeeuw, et al. (2001). "Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy." *N Engl J Med* 345(12): 861-9.
- Brosnihan, K. B., P. Li and C. M. Ferrario (1996). "Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide." *Hypertension* 27(3 Pt 2): 523-8.
- Brosnihan, K. B., P. Li, E. A. Tallant, et al. (1998). "Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation." *Biol Res* 31(3): 227-34.
- Brosnihan, K. B., L. A. Neves, J. Joyner, et al. (2003). "Enhanced renal immunocytochemical expression of ANG-(1-7) and ACE2 during pregnancy." *Hypertension* 42(4): 749-53.
- Burnier, M. (2000). "Selective Ang II (AT1) receptor blockade: a rational approach to end-organ protection in hypertension." *Int J Clin Pract Suppl*(111): 9-13.
- Burrell, L. M., J. Risvanis, E. Kubota, et al. (2005). "Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans." *Eur Heart J* 26(4): 369-75; discussion 322-4.
- Burson, J. M., G. Aguilera, K. W. Gross, et al. (1994). "Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse." *Am J Physiol* 267(2 Pt 1): E260-7.
- Carey, R. M. (2005). "Update on the role of the AT2 receptor." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14(1): 67-71.
- Carey, R. M. and H. M. Siragy (2003). "Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation." *Endocr Rev* 24(3): 261-71.
- Castro, C. H., R. A. Santos, A. J. Ferreira, et al. (2005). "Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart." *Hypertension* 46(4): 937-42.
- Chappel, M. C. and C. M. Ferrario (2006). "ACE and ACE2: their role to balance the expression of angiotensin II and angiotensin-(1-7)." *Kidney Int* 70(1): 8-10.
- Choi, H., T. L. Leto, L. Hunyady, et al. (2008). "Mechanism of angiotensin II-induced superoxide production in cells reconstituted with angiotensin type 1 receptor and the components of NADPH oxidase." *J Biol Chem* 283(1): 255-67.
- Crackower, M. A., R. Sarao, G. Y. Oudit, et al. (2002). "Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function." *Nature* 417(6891): 822-8.
- Dahl, L. K., M. Heine and L. Tassinari (1962). "Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion." *Nature* 194: 480-2.
- Danilczyk, U., R. Sarao, C. Remy, et al. (2006). "Essential role for collectrin in renal amino acid transport." *Nature* 444(7122): 1088-91.
- Davie, A. P. and J. J. McMurray (1999). "Effect of angiotensin-(1-7) and bradykinin in patients with heart failure treated with an ACE inhibitor." *Hypertension* 34(3): 457-60.
- de Gasparo, M., K. J. Catt, T. Inagami, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors." *Pharmacol Rev* 52(3): 415-72.

- de Gasparo, M. and H. M. Siragy (1999). "The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy." *Regul Pept* 81(1-3): 11-24.
- De Vriese, A. S., J. Van de Voorde, H. J. Blom, et al. (2000). "The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin--induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate." *Diabetologia* 43(9): 1116-25.
- Deddish, P. A., B. Marcic, H. L. Jackman, et al. (1998). "N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE." *Hypertension* 31(4): 912-7.
- DelliPizzi, A. M., S. D. Hilchey and C. P. Bell-Quilley (1994). "Natriuretic action of angiotensin(1-7)." *Br J Pharmacol* 111(1): 1-3.
- Der Sarkissian, S., M. J. Huentelman, J. Stewart, et al. (2006). "ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases." *Prog Biophys Mol Biol* 91(1-2): 163-98.
- Devlin, A. M., J. F. Gordon, A. O. Davidson, et al. (1995). "The effects of perindopril on vascular smooth muscle polyploidy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *J Hypertens* 13(2): 211-8.
- Dikalova, A., R. Clempus, B. Lassegue, et al. (2005). "Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice." *Circulation* 112(17): 2668-76.
- Dive, V., J. Cotton, A. Yiotakis, et al. (1999). "RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4330-5.
- Donoghue, M., F. Hsieh, E. Baronas, et al. (2000). "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." *Circ Res* 87(5): E1-9.
- Donoghue, M., H. Wakimoto, C. T. Maguire, et al. (2003). "Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins." *J Mol Cell Cardiol* 35(9): 1043-53.
- Douglas, G. C., M. K. O'Bryan, M. P. Hedger, et al. (2004). "The novel angiotensin-converting enzyme (ACE) homolog, ACE2, is selectively expressed by adult Leydig cells of the testis." *Endocrinology* 145(10): 4703-11.
- Duka, I., E. Kintsurashvili, I. Gavras, et al. (2001). "Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension." *Circ Res* 88(3): 275-81.
- Dzau, V. J. and G. H. Gibbons (1987). "Autocrine-paracrine mechanisms of vascular myocytes in systemic hypertension." *Am J Cardiol* 60(17): 991-1031.
- Erdos, E. G., P. A. Deddish and B. M. Marcic (1999). "Potentiation of Bradykinin Actions by ACE Inhibitors." *Trends Endocrinol Metab* 10(6): 223-229.
- Feng, Y., X. Yue, H. Xia, et al. (2008). "Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in the subfornical organ prevents the angiotensin II-mediated pressor and drinking responses and is associated with angiotensin II type 1 receptor downregulation." *Circ Res* 102(6): 729-36.
- Fennell, J. P., M. J. Brosnan, A. J. Frater, et al. (2002). "Adenovirus-mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension." *Gene Ther* 9(2): 110-7.

- Fernandes, L., Z. B. Fortes, D. E. Casarini, et al. (2005). "Role of PGI₂ and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR." *Regul Pept* 127(1-3): 183-9.
- Fernandes, L., Z. B. Fortes, D. Nigro, et al. (2001). "Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo." *Hypertension* 37(2 Part 2): 703-9.
- Ferrario, C. M. (1990). "The renin-angiotensin system: importance in physiology and pathology." *J Cardiovasc Pharmacol* 15 Suppl 3: S1-5.
- Ferrario, C. M. (2005). "Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans." *Eur Heart J* 26(11): 1141; author reply 1141-3.
- Ferrario, C. M. and M. C. Chappell (2004). "Novel angiotensin peptides." *Cell Mol Life Sci* 61(21): 2720-7.
- Ferrario, C. M., M. C. Chappell, E. A. Tallant, et al. (1997). "Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)." *Hypertension* 30(3 Pt 2): 535-41.
- Ferrario, C. M., J. Jessup, M. C. Chappell, et al. (2005). "Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2." *Circulation* 111(20): 2605-10.
- Ferrario, C. M. and W. B. Strawn (2006). "Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease." *Am J Cardiol* 98(1): 121-8.
- Ferreira, A. J., B. A. Jacoby, C. A. Araujo, et al. (2007). "The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(2): H1113-9.
- Ferreira, A. J., S. V. Pinheiro, C. H. Castro, et al. (2006). "Renal function in transgenic rats expressing an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein." *Regul Pept* 137(3): 128-33.
- Ferreira, A. J. and R. A. Santos (2005). "Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7)." *Braz J Med Biol Res* 38(4): 499-507.
- Ferreira, A. J., R. A. Santos and A. P. Almeida (2001). "Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion." *Hypertension* 38(3 Pt 2): 665-8.
- Fleming, I. (2006). "Signaling by the angiotensin-converting enzyme." *Circ Res* 98(7): 887-96.
- Freeman, E. J., G. M. Chisolm, C. M. Ferrario, et al. (1996). "Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth." *Hypertension* 28(1): 104-8.
- Fukui, K., Q. Yang, Y. Cao, et al. (2005). "The HNF-1 target collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation." *Cell Metab* 2(6): 373-84.
- Gautret, B. and H. Schmitt (1985). "Central and peripheral sites for cardiovascular actions of dynorphin-(1-13) in rats." *Eur J Pharmacol* 111(2): 263-6.
- Gembardt, F., A. Sterner-Kock, H. Imboden, et al. (2005). "Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents." *Peptides* 26(7): 1270-7.

- Giles, M. E., R. T. Fernley, Y. Nakamura, et al. (1999). "Characterization of a specific antibody to the rat angiotensin II AT1 receptor." *J Histochem Cytochem* 47(4): 507-16.
- Goto, M., M. Mukoyama, A. Sugawara, et al. (2002). "Expression and role of angiotensin II type 2 receptor in the kidney and mesangial cells of spontaneously hypertensive rats." *Hypertens Res* 25(1): 125-33.
- Gottlieb, S. S., K. Dickstein, E. Fleck, et al. (1993). "Hemodynamic and neurohormonal effects of the angiotensin II antagonist losartan in patients with congestive heart failure." *Circulation* 88(4 Pt 1): 1602-9.
- Goulter, A. B., M. J. Goddard, J. C. Allen, et al. (2004). "ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart." *BMC Med* 2: 19.
- Graham, D., C. Hamilton, E. Beattie, et al. (2004). "Comparison of the effects of omapatrilat and irbesartan/hydrochlorothiazide on endothelial function and cardiac hypertrophy in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat: sex differences." *J Hypertens* 22(2): 329-37.
- Griendling, K. K. and R. W. Alexander (1997). "Oxidative stress and cardiovascular disease." *Circulation* 96(10): 3264-5.
- Grobe, J. L., A. P. Mecca, M. Lingis, et al. (2007). "Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7)." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(2): H736-42.
- Grobe, J. L., A. P. Mecca, H. Mao, et al. (2006). "Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(6): H2417-23.
- Gu, H., Y. R. Zou and K. Rajewsky (1993). "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting." *Cell* 73(6): 1155-64.
- Gurley, S. B., A. Allred, T. H. Le, et al. (2006). "Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice." *J Clin Invest* 116(8): 2218-25.
- Guy, J. L., R. M. Jackson, H. A. Jensen, et al. (2005). "Identification of critical active-site residues in angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) by site-directed mutagenesis." *FEBS J* 272(14): 3512-20.
- Hamming, I., W. Timens, M. L. Bulthuis, et al. (2004). "Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis." *J Pathol* 203(2): 631-7.
- Handa, R. K., C. M. Ferrario and J. W. Strandhoy (1996). "Renal actions of angiotensin-(1-7): in vivo and in vitro studies." *Am J Physiol* 270(1 Pt 2): F141-7.
- Harmer, D., M. Gilbert, R. Borman, et al. (2002). "Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme." *FEBS Lett* 532(1-2): 107-10.
- Hein, L., G. S. Barsh, R. E. Pratt, et al. (1995). "Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice." *Nature* 377(6551): 744-7.
- Herath, C. B., F. J. Warner, J. S. Lubel, et al. (2007). "Upregulation of hepatic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) levels in experimental biliary fibrosis." *J Hepatol* 47(3): 387-95.

- Horiuchi, M., M. Akishita and V. J. Dzau (1999). "Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system." *Hypertension* 33(2): 613-21.
- Hubert, C., A. M. Houot, P. Corvol, et al. (1991). "Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene." *J Biol Chem* 266(23): 15377-83.
- Huentelman, M. J., J. L. Grobe, J. Vazquez, et al. (2005). "Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats." *Exp Physiol* 90(5): 783-90.
- Ichiki, T., P. A. Labosky, C. Shiota, et al. (1995). "Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor." *Nature* 377(6551): 748-50.
- Igase, M., W. B. Strawn, P. E. Gallagher, et al. (2005). "Angiotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(3): H1013-9.
- Inagami, T. (1994). "The renin-angiotensin system." *Essays Biochem* 28: 147-64.
- Ishiyama, Y., P. E. Gallagher, D. B. Averill, et al. (2004). "Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors." *Hypertension* 43(5): 970-6.
- Ito, H., M. Torii and T. Suzuki (1993). "A comparative study on lipid peroxidation in cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive and normotensive rats." *Int J Biochem* 25(12): 1801-5.
- Ito, H., M. Torii and T. Suzuki (1995). "Comparative study on free radical injury in the endothelium of SHR and WKY aorta." *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 22(1): S157-9.
- Iwai, N., T. Inagami, N. Ohmichi, et al. (1992). "Differential regulation of rat AT1a and AT1b receptor mRNA." *Biochem Biophys Res Commun* 188(1): 298-303.
- Iwata, M., R. T. Cowling, D. Gurantz, et al. (2005). "Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(6): H2356-63.
- Iyer, S. N., M. C. Chappell, D. B. Averill, et al. (1998). "Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan." *Hypertension* 31(2): 699-705.
- Jaspard, E., L. Wei and F. Alhenc-Gelas (1993). "Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides." *J Biol Chem* 268(13): 9496-503.
- Jesmin, S., I. Sakuma, H. Togashi, et al. (2004). "Expression of Endothelin Receptors in the Brain of SHR-SP and Effects of an Endothelin Blocker." *J Cardiovasc Pharmacol* 44: S156-S159.
- Jonsson, J. R., A. D. Clouston, Y. Ando, et al. (2001). "Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis." *Gastroenterology* 121(1): 148-55.
- Joyner, J., L. A. Neves, K. Stovall, et al. (2008). "Angiotensin-(1-7) serves as an aquaretic by increasing water intake and diuresis in association with

- downregulation of aquaporin-1 during pregnancy in rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(3): R1073-80.
- Jullien, N. D., P. Cuniasse, D. Georgiadis, et al. (2006). "Combined use of selective inhibitors and fluorogenic substrates to study the specificity of somatic wild-type angiotensin-converting enzyme." *Febs J* 273(8): 1772-81.
- Kakoki, M., R. W. McGarrah, H. S. Kim, et al. (2007). "Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18): 7576-81.
- Kashgarian, M. (1985). "Pathology of small blood vessel disease in hypertension." *Am J Kidney Dis* 5(4): A104-10.
- Katugampola, S. D., J. J. Maguire, R. E. Kuc, et al. (2002). "Discovery of recently adopted orphan receptors for apelin, urotensin II, and ghrelin identified using novel radioligands and functional role in the human cardiovascular system." *Can J Physiol Pharmacol* 80(5): 369-74.
- Kerr, S., M. J. Brosnan, M. McIntyre, et al. (1999). "Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium." *Hypertension* 33(6): 1353-8.
- Kim, S., K. Ohta, A. Hamaguchi, et al. (1995). "Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats." *J Pharmacol Exp Ther* 273(1): 509-15.
- Kim, S., K. Ohta, A. Hamaguchi, et al. (1996). "Effects of an AT1 receptor antagonist, an ACE inhibitor and a calcium channel antagonist on cardiac gene expressions in hypertensive rats." *Br J Pharmacol* 118(3): 549-56.
- Kittleson, M. M., K. M. Minhas, R. A. Irizarry, et al. (2005). "Gene expression analysis of ischemic and nonischemic cardiomyopathy: shared and distinct genes in the development of heart failure." *Physiol Genomics* 21(3): 299-307.
- Kohlstedt, K., R. P. Brandes, W. Muller-Esterl, et al. (2004). "Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells." *Circ Res* 94(1): 60-7.
- Kohlstedt, K., R. Busse and I. Fleming (2005). "Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells." *Hypertension* 45(1): 126-32.
- Kohlstedt, K., C. Gershon, M. Friedrich, et al. (2006). "Angiotensin-converting enzyme (ACE) dimerization is the initial step in the ACE inhibitor-induced ACE signaling cascade in endothelial cells." *Mol Pharmacol* 69(5): 1725-32.
- Komatsu, T., Y. Suzuki, J. Imai, et al. (2002). "Molecular cloning, mRNA expression and chromosomal localization of mouse angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (mACE2)." *DNA Seq* 13(4): 217-20.
- Konishi, H., S. Kuroda, Y. Inada, et al. (1994). "Novel subtype of human angiotensin II type 1 receptor: cDNA cloning and expression." *Biochem Biophys Res Commun* 199(2): 467-74.
- Kostenis, E., G. Milligan, A. Christopoulos, et al. (2005). "G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor." *Circulation* 111(14): 1806-13.

- Kuba, K., Y. Imai, S. Rao, et al. (2005). "A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury." *Nat Med* 11(8): 875-9.
- Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet, et al. (1995). "Inducible gene targeting in mice." *Science* 269(5229): 1427-9.
- Lakso, M., B. Sauer, B. Mosinger, Jr., et al. (1992). "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14): 6232-6.
- Lambert, D. W., M. Yarski, F. J. Warner, et al. (2005). "Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)." *J Biol Chem* 280(34): 30113-9.
- Landmesser, U., S. Spiekermann, S. Dikalov, et al. (2002). "Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase." *Circulation* 106(24): 3073-8.
- Lang, R. E., W. Rascher, T. Unger, et al. (1981). "Reduced content of vasopressin in the brain of spontaneously hypertensive as compared to normotensive rats." *Neurosci Lett* 23(2): 199-202.
- Langeveld, B., W. H. van Gilst, R. A. Tio, et al. (2005). "Angiotensin-(1-7) attenuates neointimal formation after stent implantation in the rat." *Hypertension* 45(1): 138-41.
- le Tran, Y. and C. Forster (1997). "Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium." *J Cardiovasc Pharmacol* 30(5): 676-82.
- Leung, P. S. (2004). "The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs." *Curr Protein Pept Sci* 5(4): 267-73.
- Levy, B. I., J. Benessiano, D. Henrion, et al. (1996). "Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure." *J Clin Invest* 98(2): 418-25.
- Lewis, E. J., L. G. Hunsicker, R. P. Bain, et al. (1993). "The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group." *N Engl J Med* 329(20): 1456-62.
- Li, L., J. M. Miano, P. Cserjesi, et al. (1996). "SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis." *Circ Res* 78(2): 188-95.
- Li, N., J. Zimpelmann, K. Cheng, et al. (2005a). "The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules." *Am J Physiol Renal Physiol* 288(2): F353-62.
- Li, P., M. C. Chappell, C. M. Ferrario, et al. (1997). "Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide." *Hypertension* 29(1 Pt 2): 394-400.
- Li, W., M. J. Moore, N. Vasilieva, et al. (2003). "Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus." *Nature* 426(6965): 450-4.
- Li, W., C. Zhang, J. Sui, et al. (2005b). "Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2." *Embo J* 24(8): 1634-43.

- Lieb, W., J. Graf, A. Gotz, et al. (2006). "Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. Results of the MONICA Augsburg echocardiographic substudy." *J Mol Med* 84(1): 88-96.
- Lijnen, P. J., V. V. Petrov and R. H. Fagard (2001). "Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2(2): 117-22.
- Lochard, N., D. W. Silversides, J. P. van Kats, et al. (2003). "Brain-specific restoration of angiotensin II corrects renal defects seen in angiotensinogen-deficient mice." *J Biol Chem* 278(4): 2184-9.
- Loot, A. E., A. J. Roks, R. H. Henning, et al. (2002). "Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats." *Circulation* 105(13): 1548-50.
- Ma, X. L., F. Gao, A. H. Nelson, et al. (2001). "Oxidative inactivation of nitric oxide and endothelial dysfunction in stroke-prone spontaneous hypertensive rats." *J Pharmacol Exp Ther* 298(3): 879-85.
- Machado, R. D., R. A. Santos and S. P. Andrade (2000). "Opposing actions of angiotensins on angiogenesis." *Life Sci* 66(1): 67-76.
- Mack, C. P. and G. K. Owens (1999). "Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions." *Circ Res* 84(7): 852-61.
- Magaldi, A. J., K. R. Cesar, M. de Araujo, et al. (2003). "Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors." *Pflugers Arch* 447(2): 223-30.
- Malakauskas, S. M., H. Quan, T. A. Fields, et al. (2007). "Aminoaciduria and altered renal expression of luminal amino acid transporters in mice lacking novel gene collectrin." *Am J Physiol Renal Physiol* 292(2): F533-44.
- Mancini, G. B., G. C. Henry, C. Macaya, et al. (1996). "Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study." *Circulation* 94(3): 258-65.
- Marcic, B., P. A. Deddish, H. L. Jackman, et al. (1999). "Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor." *Hypertension* 33(3): 835-43.
- Matsuoka, Y., Y. Kitamura, I. Tooyama, et al. (1997). "In vivo hypoxia-induced neuronal damage with an enhancement of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in hippocampus." *Exp Neurol* 146(1): 57-66.
- Mendes, A. C., A. J. Ferreira, S. V. Pinheiro, et al. (2005). "Chronic infusion of angiotensin-(1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats." *Regul Pept* 125(1-3): 29-34.
- Methot, D., J. P. vanKats, N. Lochard, et al. (2001). "Development and application of a biological peptide pump for the study of the in vivo actions of angiotensin peptides." *Am J Hypertens* 14(6 Pt 2): 38S-43S.
- Mezzano, S. A., M. Ruiz-Ortega and J. Egido (2001). "Angiotensin II and renal fibrosis." *Hypertension* 38(3 Pt 2): 635-8.

- Miano, J. M., P. Cserjesi, K. L. Ligon, et al. (1994). "Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis." *Circ Res* 75(5): 803-12.
- Minshall, R. D., S. M. Vogel and S. F. Rabito (1997). "Are the inotropic and antiarrhythmic effects of bradykinin due to increases in coronary flow?" *Am J Cardiol* 80(3A): 148A-152A.
- Moessler, H., M. Mericskay, Z. Li, et al. (1996). "The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice." *Development* 122(8): 2415-25.
- Morris, M., J. A. Wren and D. K. Sundberg (1981). "Central neural peptides and catecholamines in spontaneous and DOCA/salt hypertension." *Peptides* 2(2): 207-11.
- Mosterd, A., R. B. D'Agostino, H. Silbershatz, et al. (1999). "Trends in the prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989." *N Engl J Med* 340(16): 1221-7.
- Mulvany, M. J. and C. Aalkjaer (1990). "Structure and function of small arteries." *Physiol Rev* 70(4): 921-61.
- Muthalif, M. M., I. F. Benter, M. R. Uddin, et al. (1998). "Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells." *J Pharmacol Exp Ther* 284(1): 388-98.
- Natesh, R., S. L. Schwager, E. D. Sturrock, et al. (2003). "Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex." *Nature* 421(6922): 551-4.
- Nicholls, M. G., A. M. Richards and M. Agarwal (1998). "The importance of the renin-angiotensin system in cardiovascular disease." *J Hum Hypertens* 12(5): 295-9.
- Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, et al. (1997). "'Green mice' as a source of ubiquitous green cells." *FEBS Lett* 407(3): 313-9.
- Okamoto, K. and K. Aoki (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." *Jpn Circ J* 27: 282-93.
- Okamoto, K., Y. Yamori, S. Nosaka, et al. (1973). "Studies on hypertension in spontaneously hypertensive rats." *Clin Sci Mol Med Suppl* 45 Suppl 1: 11s-4.
- Oudit, G. Y., M. A. Crackower, P. H. Backx, et al. (2003). "The role of ACE2 in cardiovascular physiology." *Trends Cardiovasc Med* 13(3): 93-101.
- Oudit, G. Y., A. M. Herzenberg, Z. Kassiri, et al. (2006). "Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis." *Am J Pathol* 168(6): 1808-20.
- Oudit, G. Y., Z. Kassiri, M. P. Patel, et al. (2007). "Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice." *Cardiovasc Res* 75(1): 29-39.
- Owens, G. K. (1995). "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." *Physiol Rev* 75(3): 487-517.

- Paizis, G., M. E. Cooper, J. M. Schembri, et al. (2002). "Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver." *Gastroenterology* 123(5): 1667-76.
- Paizis, G., C. Tikellis, M. E. Cooper, et al. (2005). "Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2." *Gut* 54(12): 1790-6.
- Paul, M., A. Poyan Mehr and R. Kreutz (2006). "Physiology of local renin-angiotensin systems." *Physiol Rev* 86(3): 747-803.
- Peiro, C., S. Vallejo, F. Gembardt, et al. (2007). "Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function." *J Hypertens* 25(12): 2421-5.
- Pendergrass, K. D., D. B. Averill, C. M. Ferrario, et al. (2006). "Differential expression of nuclear AT1 receptors and angiotensin II within the kidney of the male congenic mRen2.Lewis rat." *Am J Physiol Renal Physiol* 290(6): F1497-506.
- Popova, E., A. Krivokharchenko, D. Ganten, et al. (2004). "Efficiency of transgenic rat production is independent of transgene-construct and overnight embryo culture." *Theriogenology* 61(7-8): 1441-53.
- Rapp, J. P. (2000). "Genetic analysis of inherited hypertension in the rat." *Physiol Rev* 80(1): 135-72.
- Regan, C. P., I. Manabe and G. K. Owens (2000). "Development of a smooth muscle-targeted cre recombinase mouse reveals novel insights regarding smooth muscle myosin heavy chain promoter regulation." *Circ Res* 87(5): 363-9.
- Ren, Y., J. L. Garvin and O. A. Carretero (2002). "Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles." *Hypertension* 39(3): 799-802.
- Rousseau, A., A. Michaud, M. T. Chauvet, et al. (1995). "The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme." *J Biol Chem* 270(8): 3656-61.
- Rubattu, S., B. Struk, R. Kreutz, et al. (1995). "Animal models of genetic hypertension: what can we learn for human hypertension?" *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22(12): S386-93.
- Rulicke, T. and U. Hubscher (2000). "Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection." *Exp Physiol* 85(6): 589-601.
- Sabatini, R. A., P. A. Bersanetti, S. L. Farias, et al. (2007). "Determination of angiotensin I-converting enzyme activity in cell culture using fluorescence resonance energy transfer peptides." *Anal Biochem* 363(2): 255-62.
- Sampaio, W. O., A. A. Nascimento and R. A. Santos (2003). "Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(6): H1985-94.
- Sampaio, W. O., R. A. Souza dos Santos, R. Faria-Silva, et al. (2007). "Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways." *Hypertension* 49(1): 185-92.
- Santos, R. A., K. B. Brosnihan, D. W. Jacobsen, et al. (1992). "Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium." *Hypertension* 19(2 Suppl): II56-61.

- Santos, R. A., M. J. Campagnole-Santos, N. C. Baracho, et al. (1994). "Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors." *Brain Res Bull* 35(4): 293-8.
- Santos, R. A., C. H. Castro, E. Gava, et al. (2006). "Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice." *Hypertension* 47(5): 996-1002.
- Santos, R. A. and A. J. Ferreira (2007). "Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16(2): 122-8.
- Santos, R. A., A. J. Ferreira, A. P. Nadu, et al. (2004). "Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats." *Physiol Genomics* 17(3): 292-9.
- Santos, R. A., A. J. Ferreira, S. V. Pinheiro, et al. (2005a). "Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs." *Expert Opin Investig Drugs* 14(8): 1019-31.
- Santos, R. A., F. Frezard and A. J. Ferreira (2005b). "Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels." *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3(4): 383-91.
- Santos, R. A., A. C. Simoes e Silva, C. Maric, et al. (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8258-63.
- Sasaki, S., Y. Higashi, K. Nakagawa, et al. (2001). "Effects of angiotensin-(1-7) on forearm circulation in normotensive subjects and patients with essential hypertension." *Hypertension* 38(1): 90-4.
- Sasamura, H., L. Hein, J. E. Krieger, et al. (1992). "Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome." *Biochem Biophys Res Commun* 185(1): 253-9.
- Schartl, M., W. G. Bocksch, S. Dreysse, et al. (1994). "Remodeling of myocardium and arteries by chronic angiotensin converting enzyme inhibition in hypertensive patients." *J Hypertens Suppl* 12(4): S37-42.
- Schelling, P., H. Fischer and D. Ganten (1991). "Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy?" *J Hypertens* 9(1): 3-15.
- Shimamura, T., M. Nakajima, T. Iwasaki, et al. (1999). "Analysis of circadian blood pressure rhythm and target-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *J Hypertens* 17(2): 211-20.
- Shimokawa, H. (1999). "Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis." *J Mol Cell Cardiol* 31(1): 23-37.
- Silva, D. M., H. R. Vianna, S. F. Cortes, et al. (2007). "Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats." *Peptides* 28(3): 702-7.
- Solway, J., J. Seltzer, F. F. Samaha, et al. (1995). "Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha." *J Biol Chem* 270(22): 13460-9.
- Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." *Nat Genet* 21(1): 70-1.

- Soubrier, F., C. Hubert, P. Testut, et al. (1993). "Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene." *J Hypertens* 11(5): 471-6.
- Stegbauer, J., O. Vonend, V. Oberhauser, et al. (2003). "Effects of angiotensin-(1-7) and other bioactive components of the renin-angiotensin system on vascular resistance and noradrenaline release in rat kidney." *J Hypertens* 21(7): 1391-9.
- Stock, P., L. Liefeldt, M. Paul, et al. (1995). "Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role." *Cardiology* 86 Suppl 1: 2-8.
- Su, Z., J. Zimpelmann and K. D. Burns (2006). "Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells." *Kidney Int* 69(12): 2212-8.
- Szokodi, I., P. Tavi, G. Foldes, et al. (2002). "Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility." *Circ Res* 91(5): 434-40.
- Taal, M. W. and B. M. Brenner (2000). "Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists." *Kidney Int* 57(5): 1803-17.
- Taal, M. W., G. M. Chertow, H. G. Rennke, et al. (2001). "Mechanisms underlying renoprotection during renin-angiotensin system blockade." *Am J Physiol Renal Physiol* 280(2): F343-55.
- Tallant, E. A. and M. A. Clark (2003). "Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7)." *Hypertension* 42(4): 574-9.
- Tallant, E. A., D. I. Diz and C. M. Ferrario (1999). "State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle." *Hypertension* 34(4 Pt 2): 950-7.
- Tallant, E. A., C. M. Ferrario and P. E. Gallagher (2005). "Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(4): H1560-6.
- Tang, S. S., H. Rogg, R. Schumacher, et al. (1992). "Characterization of nuclear angiotensin-II-binding sites in rat liver and comparison with plasma membrane receptors." *Endocrinology* 131(1): 374-80.
- Tikellis, C., C. I. Johnston, J. M. Forbes, et al. (2003). "Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy." *Hypertension* 41(3): 392-7.
- Tipnis, S. R., N. M. Hooper, R. Hyde, et al. (2000). "A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase." *J Biol Chem* 275(43): 33238-43.
- Torii, M., H. Ito and T. Suzuki (1992). "Lipid peroxidation and myocardial vulnerability in hypertrophied SHR myocardium." *Exp Mol Pathol* 57(1): 29-38.
- Touyz, R. M. (2003). "The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension." *Curr Hypertens Rep* 5(2): 155-64.
- Touyz, R. M., G. Yao, M. T. Quinn, et al. (2005). "p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(3): 512-8.

- Towler, P., B. Staker, S. G. Prasad, et al. (2004). "ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis." *J Biol Chem* 279(17): 17996-8007.
- Trask, A. J., D. B. Averill, D. Ganten, et al. (2007). "Primary role of angiotensin-converting enzyme-2 in cardiac production of angiotensin-(1-7) in transgenic Ren-2 hypertensive rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(6): H3019-24.
- Tschope, C., H. P. Schultheiss and T. Walther (2002). "Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade." *J Cardiovasc Pharmacol* 39(4): 478-87.
- Turner, A. J. (2003). "Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 3): 723-7.
- Ueda, S., S. Masumori-Maemoto, K. Ashino, et al. (2000). "Angiotensin-(1-7) attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man." *Hypertension* 35(4): 998-1001.
- Ulker, S., D. McMaster, P. P. McKeown, et al. (2003). "Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation." *Cardiovasc Res* 59(2): 488-500.
- Unger, T. (2002). "The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease." *Am J Cardiol* 89(2A): 3A-9A; discussion 10A.
- Urata, H., H. Nishimura and D. Ganten (1996). "Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans." *Am J Hypertens* 9(3): 277-84.
- van Kats, J. P., D. Methot, P. Paradis, et al. (2001). "Use of a biological peptide pump to study chronic peptide hormone action in transgenic mice. Direct and indirect effects of angiotensin II on the heart." *J Biol Chem* 276(47): 44012-7.
- Ventura, A., A. Meissner, C. P. Dillon, et al. (2004). "Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28): 10380-5.
- Verheijen, I., P. M. Vanderheyden, J. P. De Backer, et al. (2004). "AT1 receptor antagonists." *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2(1): 69-77.
- Vickers, C., P. Hales, V. Kaushik, et al. (2002). "Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase." *J Biol Chem* 277(17): 14838-43.
- Wall, R. J. (2001). "Pronuclear microinjection." *Cloning Stem Cells* 3(4): 209-20.
- Ware, L. B. and M. A. Matthay (2000). "The acute respiratory distress syndrome." *N Engl J Med* 342(18): 1334-49.
- Warner, F. J., R. A. Lew, A. I. Smith, et al. (2005). "Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells." *J Biol Chem* 280(47): 39353-62.
- Weber, K. T., S. K. Swamynathan, R. V. Guntaka, et al. (1999). "Angiotensin II and extracellular matrix homeostasis." *Int J Biochem Cell Biol* 31(3-4): 395-403.
- Wei, L., F. Alhenc-Gelas, F. Soubrier, et al. (1991). "Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes." *J Biol Chem* 266(9): 5540-6.

- Wei, L., E. Clauser, F. Alhenc-Gelas, et al. (1992). "The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors." *J Biol Chem* 267(19): 13398-405.
- Williams, T. A., P. Corvol and F. Soubrier (1994). "Identification of two active site residues in human angiotensin I-converting enzyme." *J Biol Chem* 269(47): 29430-4.
- Wong, D. W., G. Y. Oudit, H. Reich, et al. (2007). "Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury." *Am J Pathol* 171(2): 438-51.
- Woodman, Z. L., S. L. Schwager, P. Redelinghuys, et al. (2005). "The N domain of somatic angiotensin-converting enzyme negatively regulates ectodomain shedding and catalytic activity." *Biochem J* 389(Pt 3): 739-44.
- Wysocki, J., M. Ye, M. J. Soler, et al. (2006). "ACE and ACE2 activity in diabetic mice." *Diabetes* 55(7): 2132-9.
- Xu, P., A. C. Costa-Goncalves, M. Todiras, et al. (2008). "Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice." *Hypertension* 51(2): 574-80.
- Yamamoto, K., M. C. Chappell, K. B. Brosnihan, et al. (1992). "In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats." *Hypertension* 19(6 Pt 2): 692-6.
- Yamamoto, K., M. Ohishi, T. Katsuya, et al. (2006). "Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II." *Hypertension* 47(4): 718-26.
- Yamori, Y. (1991). "Overview: studies on spontaneous hypertension-development from animal models toward man." *Clin Exp Hypertens A* 13(5): 631-44.
- Yang, W., W. Huang, S. Su, et al. (2006). "Association study of ACE2 (angiotensin I-converting enzyme 2) gene polymorphisms with coronary heart disease and myocardial infarction in a Chinese Han population." *Clin Sci (Lond)* 111(5): 333-40.
- Yao, E. H., N. Fukuda, T. Matsumoto, et al. (2007). "Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect." *Hypertens Res* 30(11): 1119-28.
- Yayama, K. and H. Okamoto (2008). "Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide." *Int Immunopharmacol* 8(2): 312-8.
- Ye, M., J. Wysocki, P. Naaz, et al. (2004). "Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination?" *Hypertension* 43(5): 1120-5.
- Ye, M., J. Wysocki, J. William, et al. (2006). "Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes." *J Am Soc Nephrol* 17(11): 3067-75.
- Yoshiji, H., S. Kuriyama, J. Yoshii, et al. (2001). "Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats." *Hepatology* 34(4 Pt 1): 745-50.
- Yu, J. and A. P. McMahon (2006). "Reproducible and inducible knockdown of gene expression in mice." *Genesis* 44(5): 252-61.

- Yu, L., N. A. Noble and W. A. Border (2002). "Therapeutic strategies to halt renal fibrosis." *Curr Opin Pharmacol* 2(2): 177-81.
- Yusuf, S., P. Sleight, J. Pogue, et al. (2000). "Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators." *N Engl J Med* 342(3): 145-53.
- Zaman, M. A., S. Oparil and D. A. Calhoun (2002). "Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system." *Nat Rev Drug Discov* 1(8): 621-36.
- Zhang, Z., C. S. Winborn, B. Marquez de Prado, et al. (2007). "Sensitization of calcitonin gene-related peptide receptors by receptor activity-modifying protein-1 in the trigeminal ganglion." *J Neurosci* 27(10): 2693-703.
- Zhong, J., Z. M. Zhu and Y. J. Yang (2001). "[Inhibition of PKC and ERK1/2 in cultured rat vascular smooth muscle cells by angiotensin-(1-7)]." *Sheng Li Xue Bao* 53(5): 361-3.
- Zisman, L. S., R. S. Keller, B. Weaver, et al. (2003). "Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2." *Circulation* 108(14): 1707-12.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Akronym	Bedeutung
A-779	Mas-Antagonist; (D-Ala ⁷)-Angiotensin-(1-7)
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
ACh	Acetylcholin
AcSDKP	Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro
Ang...	Angiotensin
AP-1	Aktivator Protein-1
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AT ₁ / AT ₂	Ang II Rezeptoren
BK	Bradykinin
B1 / B2	Bradykinin -Rezeptoren
bp	Basenpaar
C-	carboxy-
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHO	Ovarienzellen vom chinesischen hamster
CK2	Casein Kinase 2
CMV	Cytomegalievirus
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	counts per minute
Da	Dalton
DBP	diastolische Blutdruck
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DOCA	Deoxycorticosteron Acetate
DRB	CK2-Inhibitor; 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-benzimidazole
DTG	doppeltransgene Ratten
E.coli	Escherichia coli
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
ERK	Extracellular-signal-Regulated Kinase
F	Forward; Vorwärts-Primer

g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
h...	human
HA-tag	Hämagglutinin-Tag
HEMGH / HEXXH	Zink-bindende Motive von ACE und ACE2
HR	Herzgewicht
HUVEC	humane Endothelzellen der Umbilikalvene (human umbilical vein endothelial cells)
JNK	c-Jun NH ₂ – terminale Kinase
KG	Körpergewicht
L32	Housekeeping-Gen
LV	linker Ventrikel
M	mol/l ; Molar
m...	mouse
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
min	Minute
MKK7	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 7
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV	moloney murine leukemia virus
MYH9	nonmuscle myosin heavy chain IIA
N-	amino-
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEP	neutrale Endopeptidase, Nephilysin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Hyperoxid / Superoxid
PCP	Prolyl-Carboxypeptidase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	Phosphoinosit-abhängige Proteinkinase
PEP	Prolyl-Endopeptidase
pg	Pikogramm
PGI ₂	Prostacyclin
Phe	Phenylephrine
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
QTL	Quantitativer Merkmalslocus ; quantitative trait locus

R	Revers ; Rückwärts-Primer
r...	rat
RAS	Renin-Angiotensin-System
RGS5	Regulator of G-Protein Signaling 5
RIA	Radioimmunoassay
RMT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Ribonuklease Protection Assay
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
RV	rechter Ventrikel
Sabra	salzsensitive Ratten mit Neigung zur Hypertonie
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV	SARS Coronavirus
SBP	Systolischer Blutdruck
SD	Sprague Dawley Ratten
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler (standard error of measurement)
SHR	spontan hypertensive Ratten (spontaneous hypertensive rats)
SHRSP	spontan hypertensive Ratten mit Neigung zum Schlaganfall (spontaneous hypertensive stroke prone rats)
SM22 α	smooth muscle 22 α
SMMHC	smooth muscle myosin heavy chain
SNP	Sodium-Nitroprussid
SOD	Superoxid-Dismutase
TGF β ₁	transforming growth factor- β ₁
TGR / TG	transgene Ratte
U	Unit / Urin
UV	ultraviolett
V	Volt
WKY	Wistar-Kyoto Ratten
WT	Wildtyp
Y-	Hefe Positiv-Kontrolle(yeast positive control)
Y+	Hefe Negativ-Kontrolle (yeast negative control)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Freunden, Bekannten und Kollegen bedanken, die – auf jeweils ihre Art und Weise – zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. M. Bader, nicht nur für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Gruppe anfertigen zu können und die Bereitstellung der Geräte und Materialien, sondern vor allem für seine stets verfügbare und geduldige Betreuung.

Herrn Professor Dr. Heinemann danke ich herzlich für die Bereitschaft der universitären Betreuung meiner Dissertation.

Eine große und unverzichtbare Hilfe bei den physiologischen Versuchen war für mich Dr. Mihail Todiras, dem daher ein besonderer Dank zukommt. Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Fatimunnisa Qadri für die Hilfe bei den histochemischen Versuchen.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe von Michael Bader bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Mein Dank gilt ferner allen technischen Assistenten der Gruppe für die engagierte Hilfe.

Für die technische Assistenz und die Betreuung der Versuchstiere bedanke ich mich herzlich bei Frau Bergemann, Frau Dahlke und Frau Vogt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, Adelheid und Peter Rentzsch, sowie meinen Bruder Jörn Rentzsch und seiner kleinen Familie für die kontinuierliche und liebevolle Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt vor allem meinem Freund Jens Badewien für die tolle Unterstützung, die sehr hilfreichen Diskussionen bezüglich meiner Dissertation sowie die schöne Zeit außerhalb des Laboralltags. Danke, dass du da warst!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und lediglich unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfen angefertigt wurde. Ich erkläre weiterhin, dass ich mich nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe oder einen entsprechenden Doktorgrad besitze.

Berlin, den Mai 2008