

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie  
und Tumorimmunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zu Effekten  
des Renin-Angiotensin-Systems auf die Blutbildung**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Mai Viebahn

aus Donaueschingen

Datum der Promotion: 26.02.2016

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ACE2	<i>ACE-related Carboxypeptidase</i>
AcSDKP	Tetrapeptid acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro
Agt	Angiotensinogen
Ala	Alanin
AML	Akute myeloische Leukämie
AngI/II/III/IV	Angiotensin I/II/III/IV
Ang-(1-5)	Angiotensin-(1-5)
Ang-(1-7)	Angiotensin-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensin-(1-9)
AOGEN	Angiotensinogen
APA	Aminopeptidase
APN	Aminopeptidase N
Arg	Arginin
Asn	Aspargin
Asp	Asparginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AT <sub>1</sub>	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
AT <sub>2</sub>	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-2
BFU	<i>burst forming units</i>
BFU-E	<i>burst forming units</i> der Erythrozytenreihe
C	Cystein
Ca <sup>2+</sup>	Calcium <sup>2+</sup> -Ionen
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclo-Guanosinmonophosphat
cDNA	komplementäre (copy) DNA
CFU	<i>colony-forming units</i>
CFU-GEMM	CFU der Granulozyten/ Erythrozyten / Makrophagen/ Megakaryozyten-Linie
CFU-GM	CFU der Granulozyten/Makrophagen-Linie
CFU-Meg	CFU der Megakaryozyten-Linie
CFC	„colony forming cells“
CMP	myeloide Progenitorzelle
CLP	lymphoide Progenitorzelle
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CSF	“colony stimulating factor”
D-AMP	Dipeptidyl-Aminopeptidase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Epo	Erythropoetin
FBS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein
5-FU	5- Fluoruracil
G-CSF	Granulozytem- <i>colony stimulating factor</i>
GLUT <sub>4</sub>	Glucose Transporter Typ 4
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen- <i>colony stimulating factor</i>
GMP	<i>Granulocyte/macrophage progenitors</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Chlorwasserstoff
His	Histidin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPC	hämatopoetische Progenitorzellen
I	Isoleucin
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
Ile	Isoleucin
IL-1, 3, 6, 7	Interleukin 1, 3, 6, 7
IRAP	Insulin regulierte Aminopeptidase
JAK-STAT	Janus-Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription
K <sup>+</sup>	Kaliumion
kb	Kilo-Basenpaare
KOH	Kaliumhydroxid
Leu	Leucin
Lsg	Lösung
LTP	Langzeit-Potenzierung
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin ( <i>mean corpuscular haemoglobin</i> )
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration ( <i>mean corpuscular haemoglobin concentration</i> )
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen ( <i>mean corpuscular volume</i> )
MEP	<i>Megakaryocyte/erythrocyte progenitors</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Mrg	<i>Mas related gene</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NEP	Neutrale Endopeptidase
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCP	Prolyl-Carboxypeptidase
PE	Phycoerythrin
PEP	Prolyl-Endopeptidase
PerCP	Peridinin chlorophyll Protein
Phe	Phenylalanin

Pre-T cell	T-Zell-Vorläufer
Pre-B cell	B-Zell-Vorläufer
Pro	Prolin
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Serin
SDS	Natruimdodecylsulfat
Ser	Serin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
THM	<i>Tsukuba hypertensive mice</i>
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
ZNS	Zentrales Nervensystem

Die Abkürzungen zur Bezeichnung der Aminosäuren und Nukleotide entsprechen der Drei- bzw. Einbuchstaben-Nomenklatur.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Das Renin-Angiotensin-System.....</b>	<b>10</b>
1.1.1. Das „klassische“ Renin-Angiotensin-System.....	10
1.1.2. Eine neue Sichtweise: Das Renin-Angiotensin-System als Multi-Mediator-System	10
1.1.3. Biologisch aktive Metabolite des RAS.....	12
1.1.4. Die ACE2/Ang-(1-7)/Mas-Achse.....	15
<b>1.2. Das Renin-Angiotensin-System und die Hämatopoese.....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Grundlagen der Hämatopoese.....	17
1.2.2. Zusätzliche Einflüsse auf die Zahl der peripheren Blutzellen.....	19
1.2.3. Die Hypothese eines lokalen RAS im Knochenmark.....	20
1.2.4. Komponenten des RAS im Knochenmark.....	21
1.2.5. Der Einfluss des RAS auf die primitive Hämatopoese.....	21
1.2.6. Nachgewiesene Effekte von Angiotensin II auf hämatopoetische Progenitorzellen	22
1.2.7. Effekte des RAS auf die Bildung der Erythrozyten.....	24
1.2.8. Mögliche Wirkungsweisen des Angiotensin converting enzyme.....	26
1.2.9. Mögliche <i>Pathways</i> des Angiotensin II.....	27
1.2.10. Ang-(1-7) und seine Einflüsse auf die Hämatopoese.....	27
1.2.11. Klinische Bedeutung und Perspektiven.....	28
<b>1.3. Tiermodelle.....</b>	<b>30</b>
1.3.1. Angiotensinogen-Knockout-Mäuse (Agt-/-).....	30
1.3.2. Mäuse mit Defizienzen des AT1a-, AT1b- und AT2-Rezeptors.....	30
1.3.3. Angiotensinogen-überexprimierende Mäuse (TGM(rAOGEN)123).....	31
1.3.4. Mas-Knockout Mäuse.....	31
<b>1.4. Ziel dieser Arbeit.....</b>	<b>32</b>
<b>2. Material.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1. Oligonukleotide (Primer).....</b>	<b>34</b>
<b>2.2. Enzyme.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3. Chemikalien.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4. Peptide und ihre Sequenzen.....</b>	<b>35</b>
<b>2.5. Antikörper.....</b>	<b>36</b>
<b>2.6. Stammlösungen, Puffer und Gele.....</b>	<b>36</b>
2.6.1. Stammlösungen und Puffer.....	36
2.6.2. Gele.....	37
<b>2.7. Osmotische Minipumpen.....</b>	<b>37</b>
<b>2.8. Mausstämme.....</b>	<b>37</b>
<b>2.9. Geräte.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Methoden.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Genotypisierung der Knockout- und transgenen Mausstämme.....</b>	<b>39</b>
3.1.1. Präparation genomischer DNA aus Mausschwänzen.....	39
3.1.2. Polymerase-Kettenreaktion.....	39
3.1.3. Die Agarosegel-Elektrophorese.....	40
<b>3.2. Gewinnung der Blutproben und Analyse des Blutbildes.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3. Knochenmarkscharakterisierung mittels Durchflusszytometrie.....</b>	<b>41</b>
3.3.1. Gewinnung der Knochenmarkszellen.....	42
3.3.2. Färbung der Knochenmarkszellen.....	42
3.3.3. Durchflusszytometrie und Auswertung.....	42
<b>3.4. 10-Tage-Infusion von AngII und pharmakologische Rezeptorblockade mittels osmotischer Minipumpen.....</b>	<b>42</b>

3.5. Ang-(1-7)-Injektion in Wildtypen, Mas-Knockout-Tieren und bei induziertem Myokardinfarkt.....	43
3.6. Statistische Auswertung.....	43
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
4.1. Basale Blutbildcharakterisierung in Mäusen mit Defizienz bzw. Überexprimierung einzelner Renin-Angiotensin-System-Komponenten .....	45
4.1.1. Blutbilder Angiotensinogen-defizienter Tiere .....	46
4.1.2. Blutbilder von Tieren mit Defizienzen im AT1a, AT1b und AT2-Rezeptor .....	48
4.1.3. Blutbilder von Tieren mit Überexprimierung von Angiotensinogen .....	50
4.2. 10-Tage-Infusion von AngII und pharmakologische Rezeptorblockade in wildtypischen Mäusen .....	52
4.2.1. Organveränderungen nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder pharmakologischer Rezeptorblockade in wildtypischen Mäusen .....	53
4.2.2. Blutbildcharakterisierung nach 10-tägiger AngII-Infusion und/ oder pharmakologischer Rezeptorblockade in wildtypischen Mäusen .....	55
4.2.3. FACS-Analyse des Knochenmarks nach 10-tägiger AngII-Infusion und/ oder pharmakologischer Rezeptorblockade in wildtypischen Mäusen .....	60
4.3. Der Einfluss der Ang-(1-7)/Mas-Achse auf die Hämatopoese.....	62
4.3.1. Basale Blutbildcharakterisierung von Mas-Knockout-Mäusen.....	63
4.3.2. 10-Tage-Infusion von AngII und pharmakologische Rezeptorblockade in Mas-Knockout-Mäusen .....	65
4.3.3. Effekte von Ang-(1-7)-Injektionen auf das Blutbild von wildtypischen und Mas-defizienten Mäusen.....	73
4.3.4. Ang-(1-7)-Injektion bei induziertem Myokardinfarkt.....	76
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>79</b>
5.1. Effekte von AngII und seinen Rezeptoren auf die Hämatopoese .....	81
5.1.1. Effekte durch AngII auf Erythrozyten .....	81
5.1.2. Sind die Effekte von AngII auf die Erythrozytenzahl AT1-Rezeptor-vermittelt? .....	83
5.1.3. Diskrepanzen zwischen Angiotensinogen-Defizienz und Deletion aller AngII-Rezeptoren .....	85
5.1.4. Leukozyten: Unterschiede zwischen Kurz- und Langzeiteffekt von AngII .....	86
5.1.5. Keine eindeutig nachweisbaren Einflüsse durch AngII auf die Thrombozytenzahl .....	87
5.2. Der Einfluss der Ang-(1-7)/Mas-Achse auf das Blutbild .....	88
5.2.1. Die Rolle des Mas-Rezeptors.....	88
5.2.2. Die Wirkung von Ang-(1-7) im gesunden und pathologischen Modell .....	93
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>7. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>104</b>
<b>8. Lebenslauf .....</b>	<b>105</b>
<b>9. Publikationsliste .....</b>	<b>107</b>

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Diese Arbeit befasst sich mit der Wirkung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) an der Schnittstelle zwischen kardiovaskulärem System und Blutbildung. Das RAS ist in Bezug auf seine kardiovaskulären Wirkungen bereits detailliert untersucht, während über dessen Effekte auf die Hämatopoese nur wenig bekannt ist. Neuere Forschungsergebnisse geben Hinweise auf eine stimulierende Wirkung von AngiotensinII (AngII) auf die Erythropoese und von AngII und Angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)) auf hämatopoetische Stammzellen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des RAS auf Blutbild und Knochenmarkspopulation am Tiermodell untersucht. Folgende Hypothesen sollten überprüft werden: 1. AngII wirkt stimulierend auf die Erythropoese, dieser Effekt ist Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1 (AT1)-vermittelt. 2. AngII stimuliert hämatopoetische Progenitorzellen. 3. Ang-(1-7) stimuliert hämatopoetische Progenitorzellen und bewirkt damit eine Erhöhung aller Blutzellen im Blut. 4. Der Mas-Rezeptor nimmt als funktioneller Rezeptor von Ang-(1-7) Einfluss auf das Blutbild. **Methoden:** Es wurden Differentialblutbildanalysen erhoben von Mäusen mit genetischen Defizienzen und Überexpression einzelner RAS-Bestandteile, wildtypischen und Mas-Knockout-Mäusen nach 10-tägiger AngII-Infusion bzw. 3-wöchiger Behandlung mit Ang-(1-7). In der Versuchsgruppe mit AngII-Infusion wurden zusätzlich Knochenmarkszellen gewonnen und mittels Durchflusszytometrie auf frühe Progenitorzellen und *lineage restricted progenitor*-Zellen analysiert. Es erfolgte außerdem die Blutbildanalyse von Mäusen mit Myokardinfarkt und anschließender 3-wöchiger Behandlung mit Ang-(1-7). **Ergebnisse:** AngII führte nach 10-tägiger Infusion zu einer Erythrozytose, die AT1-vermittelt ist. Ein dauerhaft erhöhter AngII-Spiegel in Angiotensinogen-überexprimierenden Tieren führte dagegen nicht zu einer Erhöhung der Erythrozytenzahl. Eine stimulierende Wirkung auf hämatopoetische Progenitorzellen durch AngII konnte durchflusszytometrisch nicht nachgewiesen werden. Eine 3-wöchige Behandlung mit Ang-(1-7) führte zu keinen nachweisbaren Veränderungen im Blutbild gesunder Tiere. Im Rahmen eines Myokardinfarktes zeigte sich jedoch eine Erhöhung der Leukozyten und Thrombozyten im Blut. Ob diese Effekte Mas-vermittelt sind, ist unklar. Unter physiologischen Bedingungen konnten keine Mas-vermittelten Wirkungen von Ang-(1-7) nachgewiesen werden. **Schlussfolgerung:** Auch in dieser Arbeit ergaben sich Hinweise einer Einflussnahme des RAS auf die Blutbildung, insbesondere der Erythropoese. Die Hypothese einer stimulationssteigernden Wirkung von AngII auf hämatopoetische Progenitorzellen konnte *in vivo* nicht bestätigt werden. Anhand der erhobenen Blutbildanalysen lässt sich jedoch kein direkter Schluss auf eine veränderte Hämatopoese als Ursache ziehen, da andere Faktoren wie

Flüssigkeitshaushalt und unterschiedliche Zellverteilung die Zellzahlen im Blut beeinflussen. Weitere durchflusszytometrische Untersuchungen von Vorläuferzellen der Hämatopoese sind daher notwendig. Die Untersuchung dieses kleinen Ausschnitts des RAS ist von erheblicher klinischer Signifikanz, da pathologische Entwicklungen des einen Organsystems zu veränderten Regulationen des anderen führen können. Ein detailliertes Wissen über die Wirkung einzelner RAS-Bestandteile auf die Hämatopoese ist daher bei der Entwicklung neuer Therapieansätze hämatologischer und kardiovaskulärer Erkrankungen von großer Bedeutung.

## **Abstract**

**Introduction:** This thesis addresses the interface of the cardiovascular system and haematopoiesis by examining the effect of the renin-angiotensin-system (RAS) on haematopoiesis. The effects of the RAS on the cardiovascular system have been thoroughly investigated, but little is known about the effects of RAS on haematopoiesis. Recent results suggest a stimulating effect of angiotensin II (angII) on erythropoiesis, and of angII and angiotensin-(1-7) (ang-(1-7)) on haematopoietic progenitor cells (HPC). In this thesis, the influence of RAS on blood formation in the mouse model was investigated to verify the following hypotheses: 1. AngII stimulates erythropoiesis, which is angII-receptor type 1 (AT1) mediated. 2. AngII stimulates HPC. 3. Ang-(1-7) stimulates HPC and leads to increased levels in all blood cells. 4. The mas-receptor mediates effects on blood cells as functional receptor of ang-(1-7). **Methods:** Differential blood counts were performed with genetically engineered mice lacking or overexpressing RAS components, wildtype- and mas-knockout-mice after a 10 day-infusion of angII, or 3-week-infusion of ang-(1-7). Bone marrow cells were harvested in the group treated with angII for flow cytometry to detect HPC and lineage restricted progenitor cells. Differential blood counts were also performed in a group of mice after induced myocardial infarction and consecutive treatment with ang-(1-7). **Results:** A 10-day-infusion of angII led to erythrocytosis, mediated via the AT1-receptor. Long-term raised angII-blood levels in mice overexpressing angII, however, did not lead to erythrocytosis. A stimulating effect on HPC after angII-treatment could not be shown in flow cytometry. A 3-week ang-(1-7) treatment did not lead to any blood count changes in healthy mice, however, it induced thrombocytosis and leukocytosis in animals after myocardial infarction. It is unclear whether this effect is mas-mediated. There were no clear mas-mediated effects of ang-(1-7) in healthy mice. **Conclusion:** The results of this thesis suggest an effect of the RAS on haematopoiesis, and on erythropoiesis in particular, which is in line with previous



publications. The hypothesis of a stimulatory effect of the RAS on HPC could not be confirmed *in vivo*. Data were mainly collected through blood count analyses. They therefore fail to provide direct proof of altered haematopoiesis being the cause of the observed changes, as other factors (such as fluid balance and distribution of cells) can alter blood cell count. Further flow cytometric investigations are needed to show actual change in haematopoietic cells. Investigating this small area of the RAS is of substantial clinical importance, as pathological developments in one organ system can lead to altered regulation in the other. Detailed knowledge regarding the effects of RAS components on haematopoiesis is thus crucial for the development of new therapeutic approaches to haematological and cardiovascular diseases.

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Renin-Angiotensin-System

### 1.1.1. Das „klassische“ Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein Hormonsystem, das in der Regulation von Blutdruck und Wasserhaushalt eine wichtige Rolle spielt. Am Anfang einer Kaskade von verschiedenen Hormonen und Enzymen steht die Freisetzung des Enzyms Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere, stimuliert durch Hypovolämie, Hypotonie, Hyponatriämie und Sympathikusaktivierung. Renin spaltet das in der Leber gebildete Angiotensinogen (Agt) zu Angiotensin (Ang) I, das überwiegend biologisch inaktiv ist. Durch das *Angiotensin converting enzyme* (ACE), das vor allem auf der Oberfläche von Endothelzellen lokalisiert ist, aber auch durch die Enzyme Chymase und Cathepsin A wird das Dekapeptid AngI in das Oktapeptid AngII gespalten. Die Wirkung des zirkulierenden AngII wird über die beiden Rezeptoren AngII-Typ1 (AT1) und AngII-Typ2 (AT2) (Timmermans *et al.*, 1993) vermittelt und führt so über unterschiedliche Mechanismen zur Regulierung von Blutdruck und Wasserhaushalt: An den Blutgefäßen ruft AngII eine Vasokonstriktion hervor, die wiederum den Blutdruck erhöht. Außerdem kommt es zur vermehrten Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde und antidiuretischem Hormon (ADH) aus der Neurohypophyse und zur Sympathikusstimulierung. Im zentralen Nervensystem (ZNS) löst AngII Durstgefühl und einen vermehrten Salzhunger aus (Reid *et al.*, 1978).

### 1.1.2. Eine neue Sichtweise: Das Renin-Angiotensin-System als Multi-Mediator-System

Das klassische Verständnis des RAS im Sinne eines einfachen biologisch aktiven Hauptendproduktsystems wurde im Laufe der letzten zwanzig Jahre zugunsten des flexibleren Konzeptes eines Multi-Mediator-Systems verlassen. Grund dafür sind Hinweise darauf, dass AngII nicht als alleiniges Effektorpeptid in diesem Hormonsystem wirkt, sondern eine Reihe weiterer metabolisch aktiver Angiotensin-Peptide existiert (Fyhrquist und Saijonmaa, 2008). Diese Angiotensin-Peptide können durch verschiedene Enzyme aus AngI und II gebildet werden. Über die Prolylendopeptidase (PEP) oder das Nephilysin (NEP) wird AngI zu Ang-(1-7) konvertiert. Aus AngII kann durch ACE2, PEP oder Prolyl-Carboxypeptidase (PCP)

Ang-(1-7), durch AminopeptidaseA (APA) AngIII (Ang-(2-8)) und durch die Dipeptidyl-Amino-peptidase (D-AMP) AngIV (Ang-(3-8)) gebildet werden. AngIII wird durch Deletion des Arginin vom N-Terminus über eine AminopeptidaseN (APN) in AngIV konvertiert (Wright *et al.*, 1996; Abb.1.3). Auch wenn AngII immer noch als das wichtigste bioaktive Peptid des RAS gilt und in der Pathogenese des arteriellen Hochdrucks, der renalen Dysfunktion und des kongestiven Herzinfarkts eine wichtige Rolle spielt, wurde inzwischen die Bedeutung anderer Metabolite wie AngIII, AngIV und Ang-(1-7) entdeckt und charakterisiert (Ferrario, 2002; Ferrario *et al.*, 1997).

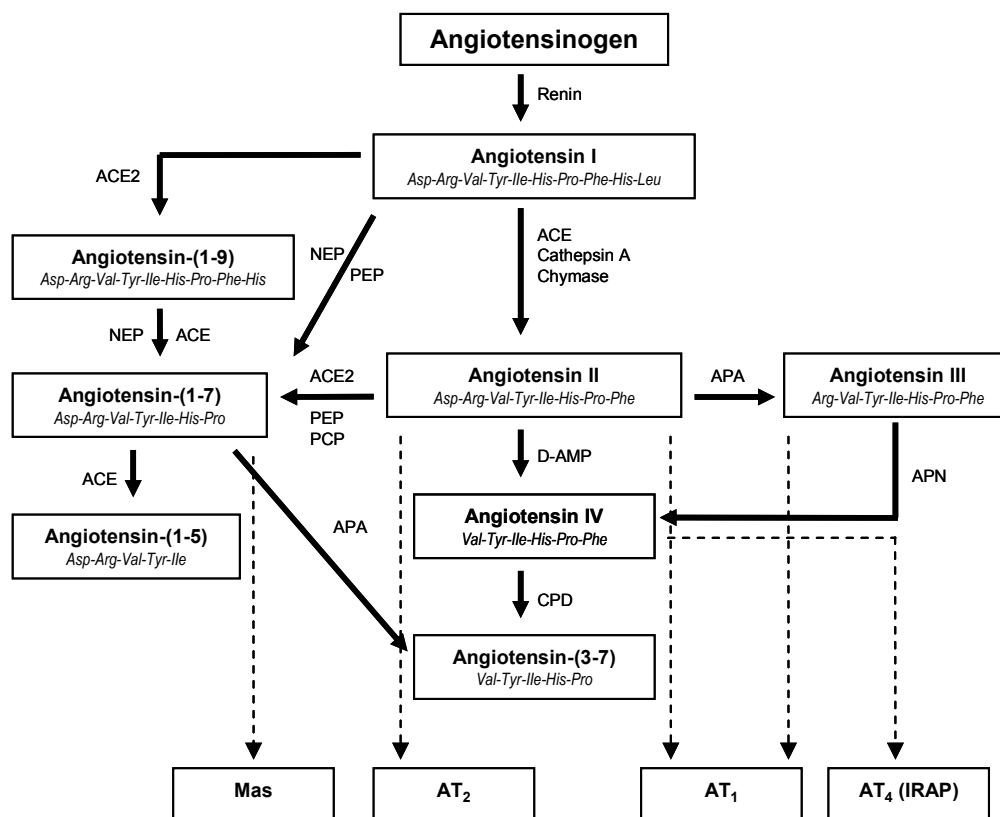


Abb. 1: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems (aus Sonja Grajewski: Liganden-abhängige und -unabhängige Signalübertragungswege von G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Mrg-Familie). Von Bedeutung ist, dass die bioaktiven Ang-Metabolite Ang-(1-7) und AngIV ihre Wirkung über eigene Bindungsstellen initiieren. A-779= Ang-(1-7)-Rezeptor-Antagonist, ACE= Angiotensin-Converting-Enzyme, APA= AminopeptidaseA, APN= AminopeptidaseN, CPD= Carboxypeptidase, D-AMP= Dipeptidyl-Amino-peptidase, IRAP= insulin-regulated amino-peptidase, NEP= Neutrale Endopeptidase24.11, PCP= Prolyl-Carboxypeptidase, PEP= Prolyl-Endopeptidase.

### **1.1.3. Biologisch aktive Metabolite des RAS**

#### **Das Oktapeptid Angiotensin II**

AngII [Ang-(1-8)] ist das Haupteffektorpeptid und damit der am besten erforschte Ang-Metabolit des RAS. Das Oktapeptid wird in einer Vielzahl von Geweben produziert, unter anderem in der Nebenniere, im Gehirn, Herzen, Niere, Gefäßen, Fettgewebe, Hoden, Pankreas, Postata, Auge und Plazenta (Hunyady und Catt, 2006). AngII wirkt über zwei verschiedene Rezeptoren: den AT1- und AT2-Rezeptor. Beide Rezeptoren sind zellmembrangebundene G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) mit einer Sequenzhomologie von 34% (Ichiki und Inagami, 1995), die jeweils pharmakologisch unterschiedlich beeinflussbar sind und unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege verwenden. Der AT1-Rezeptor wird in fast allen Geweben exprimiert, wohingegen der AT2-Rezeptor im erwachsenen Organismus nur im Herzen, Gehirn, in der Niere, Nebenniere und reproduktiven Organen zu finden ist (Tsutsumi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Ozono *et al.*, 1997). Da der AT2-Rezeptor vor allem während der Entwicklung exprimiert und in ausgewachsenen Organismen nur in pathologischen Zuständen hochreguliert wird, vermutet man, dass er vor allem während der Embryonal- und Fetalphase entscheidende Funktionen ausübt (Grady *et al.*, 1991; Akishita *et al.*, 1999; de Gasparo *et al.*, 2000). Die meisten bekannten Effekte von AngII sind daher AT1-vermittelt. Der AT2-Rezeptor scheint in ausgewachsenen Organismen AT1-antagonistisch zu wirken, so wiesen Gao *et al.* (2008) zentralen AT2-Rezeptoren in Ratten kompensatorische Eigenschaften im Sinne einer diuretischen und blutdrucksenkenden Wirkung nach.

AngII wirkt systemisch an der glatten Gefäßmuskulatur, in der Niere und im ZNS am subfornikalen Organ, dem Organum vasculosum, der Lamina terminalis und an der Area postrema. Seine lokale Wirkung entfaltet AngII in einer Vielzahl von Geweben, wobei AT1-vermittelte Effekte nachweislich zur Entwicklung und Progression pathophysiologischer Zustände wie kardialer Hypertrophie, endothelialer Dysfunktion, Tumorwachstum und dem metabolischen Syndrom führen (Hunyady und Catt, 2006).

#### **Der AngiotensinII-Metabolit AngiotensinIII**

AngIII [Ang-(2-8)] entsteht durch Abspaltung der ersten Aminosäure des AngII durch die AminopeptidaseA (APA). Das Peptid spielt über Vermittlung durch den AT1-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulierung durch das ZNS (Wright *et al.*, 1996), und führt dort zur Freisetzung von Vasopressin und erhöhtem Durstgefühl (Harding *et al.*, 1994). Lin *et*

*al.* (2001) konnten zeigen, dass eine intrazerebroventrikuläre Injektion von AngIII eine Reduktion des Barorezeptorreflexes, der Herzfrequenz und eine Erhöhung des mittleren arteriellen Drucks generiert. Die blutdrucksteigernde Wirkung von AngIII in der Peripherie ist zwar wesentlich schwächer ausgeprägt als die von AngII, der derzeitige Forschungsstand legt jedoch nahe, dass das zerebrale AngIII im Rahmen der zentral gesteuerten Blutdruckregulierung eine Schlüsselrolle spielt, da es dort wesentlich potenter in der Blutdrucksteigerung ist als AngII (Wright *et al.*, 2012). Des Weiteren agiert AngIII auf hypothalamischer Ebene über den AT1-PhospholipaseC-Signaltransduktionsweg als ein Modulator noradrenerger Transmission. Dies lässt vermuten, dass AngIII neben seiner Rolle in der Blutdruckregulation auch einen zentralen Modulator für verschiedene weitere kardiovaskuläre, endokrine und autonome Prozesse darstellt (Rodriguez-Campos *et al.*, 2000). In der Nebennierenrinde stimuliert AngIII *in vitro* wie AngII die Ausschüttung von Aldosteron, *in vivo* führt AngIII zu einer erhöhten systemischen Zirkulation von Aldosteron. Ein Teil dieser Wirkung wird über den AT2-Rezeptor vermittelt, während eine Blockade des AT1-Rezeptors zu keiner veränderten Aldosteronsekretion führt und demnach bei diesem Effekt keine Rolle zu spielen scheint (Yatabe *et al.*, 2011).

### **Das Angiotensin IV und der AngIV-Rezeptor**

Das Hexapeptid AngIV [Ang-(3-8)] ist ein Abbauprodukt von AngIII mit kurzer Halbwertszeit. Es entsteht durch Abspaltung der N-terminalen Aminosäure Arginin durch die Aminopeptidase N, kann jedoch auch direkt aus AngII gebildet werden. AngIV beeinflusst im ZNS Gedächtnis- und Lernprozesse (Wright *et al.*, 1999). AngIV erniedrigt den renalen und zerebralen Gefäßwiderstand (Cesari *et al.*, 2002), wirkt im Lungenkreislauf jedoch vasokonstriktorisch (Nossaman *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1994). Das Peptid kann mit niedriger Affinität an AT1-Rezeptoren binden und damit AngII-gleichgerichtete Effekte ausüben. Wright *et al.* identifizierten 1995 erstmals einen spezifischen „Rezeptor“ für AngIV, der sich strukturell vom klassischen AT1- und AT2-Rezeptor unterscheidet. Er ist vor allem im ZNS, aber auch in Niere, Nebenniere, Herz, Endothelium und Fettgewebe nachzuweisen. Erst 2001 gelang es Albiston *et al.*, den Rezeptor als membranständige insulinregulierte Aminopeptidase (IRAP) zu identifizieren. AngIV bindet mit hoher Affinität an diese unspezifische Zink-Metallopeptidase und wirkt aufgrund langsamer Umsetzung inhibitorisch auf das Enzym (Albiston *et al.*, 2001). Die IRAP wird im Gehirn (Neokortex, Hippocampus, Cerebellum und Basalganglien) sowie in den Nieren, dem Herzen, der Lunge, der Prostata und dem Darm exprimiert (Miller-Wing *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1995). Der

Wirkmechanismus der IRAP wurde am besten in den insulin sensitiven Geweben erforscht. In Adipocyten und Skelettmuskelzellen befindet sich die IRAP gemeinsam mit dem insulin gesteuerten Glucose Transporter Typ 4 (GLUT<sub>4</sub>) in intrazellulären Vesikeln (Ross *et al.* 1996). Nach Insulin stimulation kommt es zur Translokation der Vesikel an die Zellmembran und Freisetzung der enthaltenen Peptide an die Zelloberfläche (Keller 2003). Die GLUT<sub>4</sub>-Transporter sind für die insulin abhängige Glucoseaufnahme in die Zellen zuständig. Studien an IRAP-Knockout-Mäusen (Keller *et al.*, 2002) und 3T3-L1-Adipocyten (Yeh *et al.*, 2007) zeigen, dass ohne die IRAP keine Translokation der Vesikel an die Zelloberfläche erfolgt. Die genaue Rolle der IRAP und deren Inhibition durch AngIV sind jedoch noch weitgehend unerforscht. Möglicherweise kann durch die IRAP-Inhibition die GLUT<sub>4</sub>-Wirkung und die Glucoseaufnahme beeinflusst werden.

### **Das Heptapeptid Angiotensin-(1-7)**

Ang-(1-7) ist ein Amino-terminales Fragment des AngII und ein biologisch aktives RAS-Peptid (Santos *et al.*, 2000). Verschiedene Endopeptidasen sind an seiner Entstehung beteiligt. Das Schlüsselenzym zur Bildung des Peptids ist das ACE2. Es kann Ang-(1-7) sowohl aus AngII durch Abspaltung der C-terminalen Aminosäure Phenylalanin, als auch aus AngI durch Bildung des Zwischenproduktes Ang-(1-9) bilden (Karamyan und Speth, 2007). Es wurde jedoch gezeigt, dass in hypertensiven Rattenherzen die Produktion von Ang-(1-7) vorwiegend über ersteren Weg, also durch Spaltung von AngII durch ACE2 erfolgt (Trask *et al.*, 2007). Dem Peptid wird mittlerweile eine Schlüsselfunktion im kardiovaskulären System als funktioneller Antagonist zum AngII eingeräumt. Ang-(1-7) wirkt vasodilatierend und damit der durch AT1-Stimulation hervorgerufenen Vasokonstriktion entgegen. Dieser Effekt wird über Freisetzung von endotheliale NO, Prostaglandinen und Bradykinin vermittelt (Neves *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2000; Ferrario, 1998). Collister *et al.* (2003) konnten nachweisen, dass der andauernde hypotensive Effekt von Losartan in Ratten zum Teil durch einen erhöhten Spiegel von Ang-(1-7) während der ACE-Hemmung und die dadurch hervorgerufene vasodilatatorische Wirkung bedingt wird. Ang-(1-7) spielt ebenfalls nachweislich eine wichtige Rolle in der zentralen Blutdruckregulation. So wurde die antihypertensive Wirkung von Ang-(1-7) bei hypertensiven Ratten auf die Hemmung der durch AngII hervorgerufene Norepinephrin-Freisetzung zurückgeführt (Gironacci *et al.*, 2004). Man nimmt an, dass über diese Heruntersetzung des Sympathikotonus die Sensibilität des Barorezeptorreflexes erhöht wird. Auf diesem Weg soll das Peptid die Herzfrequenz und damit den Blutdruck beeinflussen (Xu *et al.*, 2011). Machado *et al.* beschrieben in Experimenten, dass Ang-(1-7)

die durch AngII induzierten proliferativen und neovaskulären Vorgänge limitiert (2000). In der Niere bewirkt Ang-(1-7) eine Änderung der tubulären Na<sup>+</sup>- und NaHCO<sub>3</sub>-Resorption, reduziert die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und induziert Diurese und Natriurese (Hilchey und Bell-Quilley, 1995). 1994 wurde A779 [Asp<sup>'</sup>-Arg\*-Vap-Tyfl-Ile'-His'-D-Ala<sup>'</sup>] erstmals als selektiver Antagonist von Ang-(1-7) beschrieben (Santos *et al.*). Die Arbeitsgruppe zeigte, dass A779 im Gegensatz zu AT1- und AT2-Blocker die antihypertensiven Effekte von Ang-(1-7) aufheben konnte. Die Wirkung von AngII, Vasopressin, AngIII und Bradykinin wurde dagegen nicht von A779 blockiert.

#### 1.1.4. Die ACE2/Ang-(1-7)/Mas-Achse

##### 1.1.4.1. Der Mas-Rezeptor

Das *Mas*-Protoonkogen wurde 1986 erstmals aus einem menschlichen Epidermalkarzinom isoliert (Young *et al.*). Das Gen kodiert einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben hydrophoben transmembranären Domänen. In Säugtieren wird dieses Gen vorwiegend im Hoden und einigen Regionen des Gehirns exprimiert, darunter vor allem in Neuronen des Vorderhirns, des Hippocampus und in der Amygdala. In geringeren Konzentrationen wird der Mas-Rezeptor auch im Herzen und in der Niere exprimiert (Alenina *et al.*, 2002; Metzger *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1988).

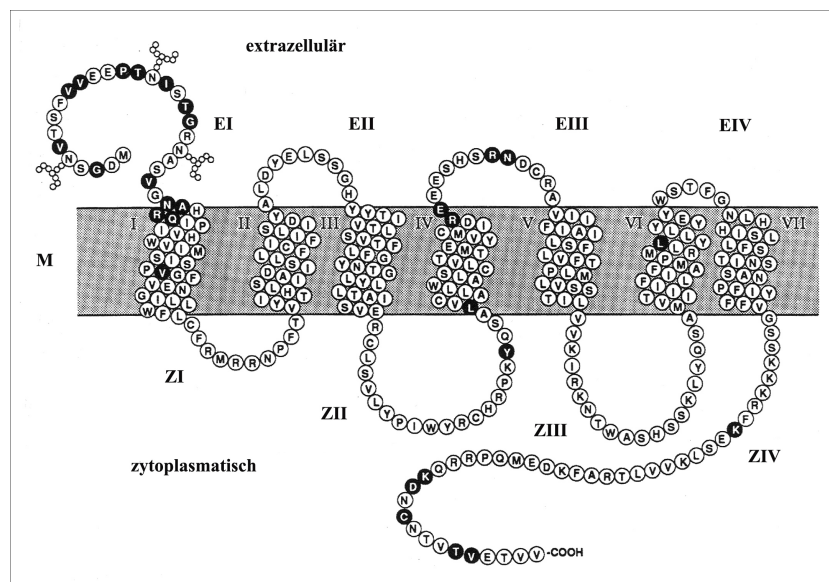


Abb. 2: Die Aminosäuresequenz des *Mas*-Genprodukts der Ratte und seine mögliche Faltung in der Zellmembran. Die schwarz unterlegten Aminosäuren sind zwischen humanen und Ratten-Rezeptor verschieden (Hanley *et al.*, 1989).

#### **1.1.4.2. Assoziation von Mas mit dem Ang-(1-7)-Signalweg und Interaktion von Mas mit dem AngII-Rezeptor AT<sub>1</sub>**

Zunächst wurde aufgrund von Transfektionsexperimenten vermutet, dass das *Mas*-Protoonkogen einen AngII-Rezeptor kodiert (Jackson *et al.*, 1988). Nachdem Anfang der 90er-Jahre der AT<sub>1</sub>-Rezeptor als Hauptrezeptor für AngII identifiziert wurde, konnten Ambroz *et al.* (1991) zeigen, dass der Ca<sup>2+</sup>-Anstieg in *Mas*-transfizierten Zellen nach der Stimulation mit AngII nur stattfindet, wenn gleichzeitig der AT<sub>1</sub>-Rezeptor exprimiert wird. Damit schien *Mas*, anders als zuvor postuliert, per se kein Rezeptor für AngII zu sein. Die Arbeitsgruppe von Santos und Walther (2003) wies schließlich nach, dass in Nieren von *Mas*-defizienten Mäusen keine Bindung von Ang-(1-7) erfolgt und damit der Ang-(1-7)-vermittelte antidiuretische Effekt nach akuter Überwässerung ausbleibt. Des Weiteren demonstrierte die Arbeitsgruppe, dass Ang-(1-7) an *Mas*-transfizierte Zellen bindet und zu einem intrazellulären Arachidonsäure-Anstieg führt. Eine durch Ang-(1-7) induzierte Relaxation der aortalen Gefäßmuskulatur geht in *Mas*-defizienten Mäusen verloren. Mit diesen Ergebnissen konnte das *Mas*-Protein als funktioneller Rezeptor für das Heptapeptid Ang-(1-7) identifiziert werden. Verschiedene Publikationen unterstützen die Theorie, dass die vasodilatierenden und antiproliferativen Wirkungen von Ang-(1-7) über den *Mas*-Rezeptor vermittelt werden (Santos *et al.*, 2006; Tallant *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2003). Kostenis *et al.* (2005) zeigten, dass die von AngII über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelte Produktion von Inositolphosphat und Mobilisierung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> um 50% reduziert wird, wenn die Zellen neben dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor zusätzlich den *Mas*-Rezeptor exprimieren. Gleichzeitig erhöht sich die Bindungskapazität von AngII, sodass eine verminderte Expression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in diesen Zellen ausgeschlossen werden kann. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass der *Mas*-Rezeptor mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor einen konstitutiven hetero-oligomeren Komplex bildet und dadurch die AngII-vermittelten Effekte dieses Rezeptors antagonisiert.

#### **1.1.4.3. Die ACE2/Ang-(1-7)/Mas-Achse als Gegenspieler zur ACE/AngII/AT<sub>1</sub>-Achse**

Mittlerweile wird ein Konzept diskutiert, welches das ACE2/Ang-(1-7)/*Mas*-System als den hauptgegenregulatorischen Mechanismus zur ACE/AngII/AT<sub>1</sub>-Achse beschreibt (Santos *et al.*, 2007). Wie bereits unter 1.1.3. erwähnt, gibt es verstärkt Hinweise darauf, dass diese Achse eine entscheidende Rolle in der kardiovaskulären Homöostase spielt und dass Veränderungen in der Expression bzw. Funktion der Achse mit signifikanten kardialen und vaskulären pathophysiologischen Veränderungen einhergehen (Ferreira *et al.*, 2010). Auch in der Niere scheint die ACE2/Ang-(1-7)/*Mas*-Achse eine protektive Rolle für Nierenfunktion und -struktur



zu spielen. Es wurde nachgewiesen, dass bei Patienten mit diabetischer Nephropathie ein Ungleichgewicht zwischen der Expression von ACE und ACE2 besteht (Mizuiru *et al.*, 2008; Reich *et al.*, 2008). Dies wiederum bestätigt die Hypothese, dass das Gleichgewicht zwischen ACE und ACE2 entscheidend ist für die Entstehung von Bluthochdruck, kardiovaskulären und renalen Pathologien. In der Lunge scheint das ACE2/Ang-(1-7)/Mas-System der Entwicklung von pulmonaler Hypertension entgegenzuwirken (Ferreira *et al.*, 2009). Neben der zentralen Regulation des Blutdrucks wird zur Zeit unter anderem die Rolle der ACE2/Ang-(1-7)/Mas-Achse im ZNS im Zusammenhang mit zerebrovaskulären Krankheiten erforscht. Sie fokussieren sich auf mögliche, durch Ang-(1-7) vermittelte, zerebroprotektive Mechanismen während eines Hirninfarktes (Ferreira *et al.*, 2010).

## **1.2. Das Renin-Angiotensin-System und die Hämatopoese**

### **1.2.1. Grundlagen der Hämatopoese**

Die Hämatopoese umfasst die Bildung der myeloiden, lymphoiden und erythrozytären Zelllinien. Sie ist ein dynamisches und fein geregeltes System, das durch vielfältige systemische und lokale Faktoren beeinflusst wird. Entscheidend beteiligt an der Regulation der Blutbildung sind die Stromazellen des Knochenmarks, die über Zell-Zell-Interaktionen und durch Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die blutbildenden Zellen wirken. Die Regulation von Proliferation, Differenzierung und Zelluntergang der hämatopoetischen Vorläuferzellen erfolgt durch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, die an spezifische Oberflächenrezeptoren der hämatopoetischen Zellen binden.

Die Hämatopoese des Menschen entwickelt sich während der dritten Lebenswoche mit der Bildung von Blutinseln aus dem extraembryonalen Mesoderm des Dottersacks (primitive Hämatopoese). In der 5. bis 6. Woche wird die Hämatopoese dann vor allem in der Leber und zu einem kleinen Teil in der Milz fortgeführt. Erst ab dem 7. Monat wird das Blut überwiegend im Knochenmark des Fetus produziert (adulte Hämatopoese), zunächst in fast allen Knochen, beim Erwachsenen nur noch in den flachen Knochen (Kopf, Becken, Rippen und Wirbelkörper). Neben dem Knochenmark werden auch Milz und Thymus zu den Organen der adulten Blutbildung gezählt, da dort die Weiterentwicklung der lymphatischen Zellreihe stattfindet. In bestimmten pathologischen Zuständen kann die adulte Hämatopoese sowohl im Knochenmark ausgedehnt werden, als auch wieder in Leber und Milz stattfinden (Schmidt *et al.*, 2010; Benninghoff und Drenckhahn, 2004).

Alle peripheren Blutzellen stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, d.h. die Fähigkeit, sich wiederholt zu teilen ohne sich dabei weiter zu differenzieren. Diese Stammzellen können sich in alle Richtungen der Hämatopoese differenzieren und sollen vor allem aus der AGM (Aorta, Gonaden, Mesonephros)-Region des frühen Embryos stammen. In der vierten bis sechsten Embryonalwoche bilden sich in der Region, die die dorsale Aorta, das umgebende Mesenchym und die Urogenitalleiste umfasst, Zellen, aus denen später sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch Endothelzellen ihren Ursprung nehmen. Während der fünften bis sechsten Embryonalwoche wandern sie von dort in Leber, Milz und Thymus und später in das Knochenmark ein (de Bruijn *et al.*, 2002; Dzierzak *et al.*, 1998). Im Knochenmark differenzieren sich aus den pluripotenten Stammzellen Vorläuferzellen, die bereits auf eine oder mehrere Linien determiniert sind (*committed progenitors*, Abb. 3).

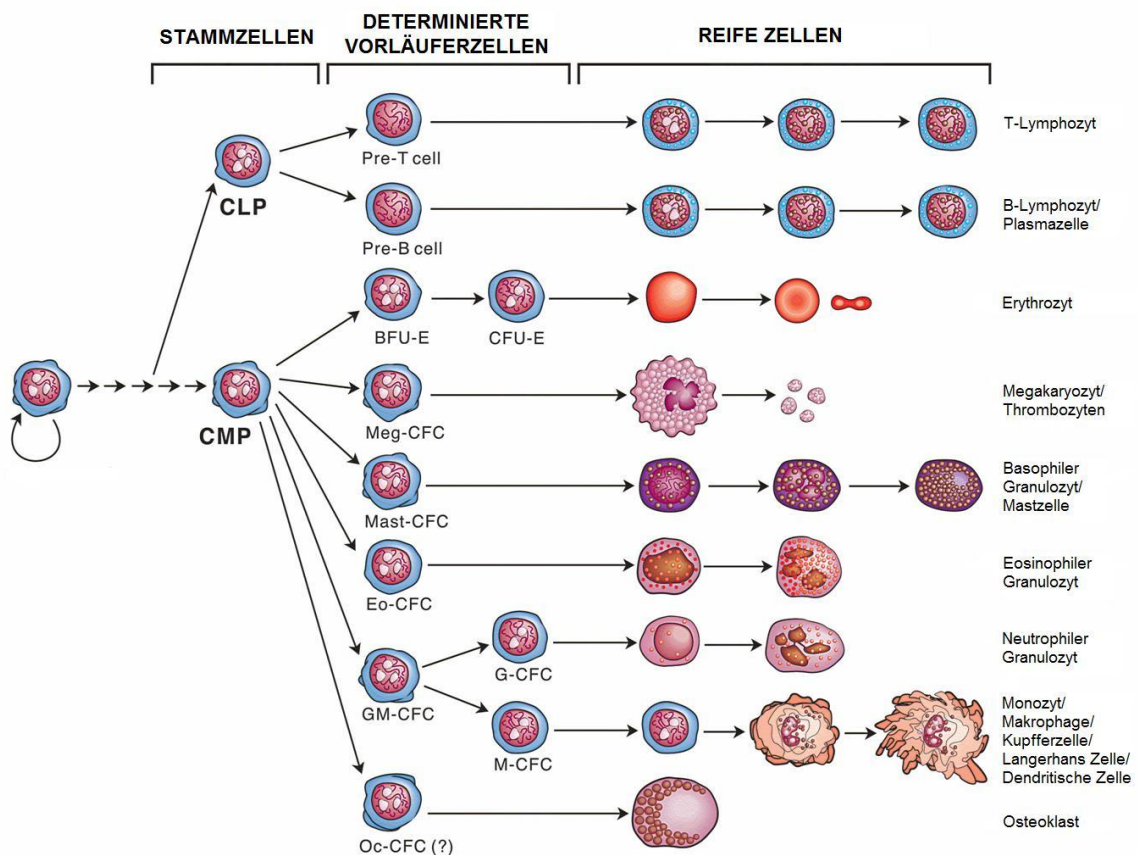


Abb. 3: schematische Darstellung der Zellreihen der Hämatopoese (aus [www.stemcells.com](http://www.stemcells.com)). CLP= common lymphoid progenitors (lymphoide Progenitorzellen), CMP= common myeloid progenitors (myeloide Progenitorzellen), Pre-T cell= T-Zell-Vorläufer, Pre-B cell= B-Zell-Vorläufer, BFU= burst forming units, CFU= colony-forming unit, CFC= colony forming cells.

So trennen sich in einem frühen Entwicklungsstadium die lymphoiden Vorläuferzellen von den myeloiden und wandern in Thymus und Milz aus, wo es zur Ausdifferenzierung in T- und

B-Lymphozyten kommt. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten (Abb. 3). Die pluripotenten Stammzellen und determinierten Vorläuferzellen sind makroskopisch nicht voneinander zu unterscheiden. Methoden zur Identifizierung sind die Immunphänotypisierung mittels Markierung von Oberflächenmarkern (Baum *et al.*, 1992) und die Zellkultur, in denen die determinierten Progenitorzellen die spezifischen Kolonien ihrer Zelldetermination bilden.

### 1.2.2. Zusätzliche Einflüsse auf die Zahl der peripheren Blutzellen

Die Zahl der Erythro-, Leuko- und Thrombozyten im Blut kann durch verschiedene weitere Faktoren beeinflusst werden. So sind neben der Blutbildung die wichtigsten Einflussfaktoren die Abbaurate der Zellen, die Umverteilung und die Volumenkontrolle. Ursachen eines verstärkten/ verminderten Abbaus sind in Tabelle 1 gelistet. Eine Umverteilung findet z.B. bei Infekten und entzündlichen Vorgängen statt, bei denen es zu einer verstärkten Ausschüttung von Leukozyten und Thrombozyten vom Knochenmark ins periphere Blut kommen kann. Auch die Milz kann Blutzellen speichern bzw. ausschütten. Insbesondere in Bezug auf Wirkungsweisen des RAS ist eine Änderung der Zellzahlen im Blut im Zusammenhang mit Veränderungen im Volumenhaushalt interessant. Kommt es zu einer Volumenretention mit Hypervolämie, wie z.B. bei einer RAS-Aktivierung, werden die zellulären Bestandteile im Blut verdünnt und führen damit zu einem relativen Abfall der Zellzahlen. Umgekehrt führt eine Exsikkose zu einer relativen Erhöhung der zellulären Bestandteile. Dies ist vor allem in Bezug auf die Erythrozytenzahl relevant, da diese den größten Anteil der zellulären Bestandteile stellt.

	<b>Verminderter Abbau</b>	<b>Verstärkter Abbau</b>
<b>Erythrozyten</b>		Hämolytische Anämien Hyperspleniesyndrom
<b>Leukozyten</b>	Akutphase nach Splenektomie	Hyperspleniesyndrom Infektionen/ Sepsis vermehrter peripherer Verbrauch von Granulozyten
<b>Thrombozyten</b>	Akutphase nach Splenektomie	Autoimmun (Idiopathische Thrombozytopenie, Heparin-induzierte Thrombozytopenie) Verbrauchskoagulopathie Mechanische Schädigung z.B. bei Vaskulitiden

*Tabelle 1: Übersicht über Ursachen eines verstärkten und verminderten Abbaus von Blutzellen*

### 1.2.3. Die Hypothese eines lokalen RAS im Knochenmark

Seitdem das Renin-Angiotensin-System und seine Effekte auf die Blutdruckregulation erstmals 1898 durch den Physiologen Robert Tigerstedt beschrieben worden waren, wurden dieses Hormonsystem und seine kardiovaskulären Effekte eingehend charakterisiert. Die Einführung des ersten ACE-Hemmers Captopril markierte einen entscheidenden Schritt in der Behandlung der essentiellen Hypertonie. Intensive Forschung führte zur Entwicklung weiterer ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten und einer Ausweitung der Indikationsgebiete über die Behandlung der Hypertonie hinaus. Neben seinen kardiovaskulären Funktionen und seinem Einfluss auf den Wasserhaushalt zeigte sich nach und nach, dass das RAS auch in anderen Bereichen der Endokrinologie, in der Onkologie und auch in der Hämatologie entscheidende Bedeutung hat. So beobachteten 1982 zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander das Auftreten von Anämie und Leukopenie bei Patienten unter hochdosierter ACE-Hemmer-Therapie (Studer und Vetter, 1982; Griffing und Melby, 1982). ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten können den Hämatokrit bei Posttransplantations-Erythrozytose effektiv senken (Conlon *et al.*, 1996; Rell *et al.*, 1994). Vlahakos *et al.* zeigten (1999), dass bei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) mit sekundärer Erythrozytose die Renin- und Aldosteronspiegel um ein dreifaches höher sind als bei COPD-Patienten mit normalem Hämatokrit und vermuteten daher einen Zusammenhang zwischen dem RAS und der Entwicklung der Erythrozytose.

Auch die historische Auffassung, bei dem Renin-Angiotensin-System handele es sich ausschließlich um ein systemisch zirkulierendes endokrines System, hat sich gewandelt. Das RAS kann auch als lokal wirkendes System agieren, das innerhalb eines Gewebes oder Organs para- und autokrine Funktionen ausübt. Diese lokalen Effekte wurden in kardialem, vaskulärem und renalem Gewebe nachgewiesen (Danser *et al.*, 1999; Dostal und Baker, 1999; Fischer *et al.*, 1998; Holtz und Goetz, 1994; Iwai *et al.*, 1988). Die Beobachtungen, dass lokal produziertes AngII das Wachstum von kardialen Myozyten und glatten Muskelzellen in der Gefäßwand induziert, dass es kardiale Kontraktilität und Anpassungsreaktionen moduliert, und dass es die Expression von vasoaktiven Faktoren, Enzymen und Zytokinen stimuliert, sprechen dafür, dass AngII auch im Sinne eines lokal agierenden Wachstumsfaktors betrachtet werden muss (Huckle und Earp, 1994). Aufgrund dieses neuen Konzeptes und der vermehrten Hinweise auf eine Beeinflussung der Hämatopoese durch das RAS postulierten Haznedaroglu *et al.* (1996) erstmals die Hypothese eines lokales RAS im Knochenmark. Laut dieser Hypothese soll ein lokal aktives, intrinsisches RAS im Knochenmark existieren, das die

Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen beeinflusst, wie es bereits in anderen Organen beobachtet wurde.

#### **1.2.4. Komponenten des RAS im Knochenmark**

Die Theorie eines lokalen RAS im Knochenmark konnte zunehmend untermauert werden, da es vielen Forschungsgruppen gelang, verschiedene Elemente des RAS im blutbildenden System des Knochenmarks nachzuweisen. Iwai *et al.* detektierten Renin in zirkulierenden Makrophagen/Monozyten der Ratte (1996). Der AT1a-Rezeptor wird im Menschen auf mononukleären Leukozyten und Thrombozyten exprimiert, die Expression jedoch jeweils auf unterschiedliche Weise reguliert (Crabos *et al.*, 1993). In kultivierten humanen Monozyten/Makrophagen existiert ein funktionsfähiges RAS, das AngII synthetisieren kann (Okamura *et al.*, 1999). AT1-Rezeptor-mRNA wird in humanen Stromazellen, T- und B-Lymphozyten und in CD34+ hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert (Rodgers *et al.*, 2000). Strawn *et al.* untersuchten das Knochenmark von Ratten auf verschiedene Bestandteile des RAS. mRNA von Renin, Angiotensinogen, ACE1, AT1a und AT2-Rezeptor konnten sowohl in den Zellen des blutbildenden Systems als auch in den Stromazellen des Knochenmarks nachgewiesen werden. In den hämatopoetischen Knochenmarkszellen konnten Strawn *et al.* außerdem mRNA des ACE2 detektieren. Dies war der erste Nachweis dieses kürzlich identifizierten Homologs des ACE1 im hämatopoetischen System, das aus AngII Ang-(1-7) abspaltet. *In vitro* konnten Strawn *et al.* zeigen, dass Stromazellen AngII produzieren und in das Kulturmedium abgeben (Strawn *et al.*, 2004). Goker *et al.* (2005) isolierten aus humanem Nabelschnurblut, das hämatopoetische und mesenchymale Progenitorzellen enthält, mRNA von Renin, Agt und ACE1.

#### **1.2.5. Der Einfluss des RAS auf die primitive Hämatopoese**

Das RAS scheint auch während der frühen Entwicklung des hämatopoetischen Systems eine entscheidende Rolle zu spielen. Savary *et al.* untersuchten die primitive Hämatopoese im Dottersack des Hühnerembryos auf Komponenten des RAS und wiesen enzymatisch aktives ACE im Endoderm nach, noch bevor sich Blutinseln entwickelt hatten (2005). Zusätzlich fanden sie Renin, Agt und AngII-Rezeptoren in direkter Nachbarschaft der Blutinseln. Die daraufhin aufgestellte Hypothese, dass das RAS die frühe Erythropoese beeinflusst, bestätigten Savary *et al.* durch *in vivo*-Inhibition des ACE mit Fosinoprilat im Hühnerembryo, die eine Senkung des Hämatokrits um 15% zur Folge hatte. Ein vergleichbares Ergebnis konnte mit dem AngII-Rezeptor-Antagonist Sar1-Ile8-AngiotensinII erzielt werden. Zusätzlich konnten Savary *et al.* zeigen, dass diese Senkung des Hämatokrits durch eine

verminderte Proliferation der Erythroblasten zustande kommt. Eine ähnliche Beobachtung machten Zambidis *et al.* erstmals bei der menschlichen Blutbildung anhand von Zellkulturen humaner embryonaler Stammzellen (2008). Sie konnten ACE als Oberflächenmarker und beide AngII-Rezeptoren auf humanen Hämangioblasten nachweisen. Hämangioblasten stammen von humanen embryonalen Stammzellen ab und können sich sowohl zu endothelialen als auch zu hämatopoetischen Progenitorzellen differenzieren. Unter ACE-Hemmung mit Captopril wird die *colony expansion* der Hämangioblasten stark vermindert. Darüber hinaus scheinen die AngII-Rezeptoren direkten Einfluss darauf zu nehmen, welchen der beiden Differenzierungswege der Hämangioblast einschlägt. Zambidis *et al.* zeigten, dass der AT2-Rezeptor notwendig für die Differenzierung der Hämangioblasten zu hämatopoetischen Vorläuferzellen ist, da diese unter AT2-Blockade mit PD123-319 vollständig ausbleibt. Stattdessen entwickeln sich fast ausschließlich endotheliale Vorläuferzellen. Umgekehrt führt eine AT1-Blockade mit Losartan zu einer überwiegenden Differenzierung zu hämatopoetischen Progenitorzellen.

#### **1.2.6. Nachgewiesene Effekte von Angiotensin II auf hämatopoetische Progenitorzellen**

In verschiedenen Geweben gewinnt man zunehmend Beweise dafür, dass AngII das Wachstum von Progenitorzellen wie z.B. epidermale Stammzellen, endotheliale Progenitorzellen und Vorläuferzellen der glatten Muskulatur stimuliert (Yamada *et al.*, 2007; Bahlmann *et al.*, 2005; Ohtani *et al.*, 2006; Rodgers *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1994). Auch auf hämatopoetische Progenitorzellen hat AngII proliferationsfördernde Wirkung. 1997 zeigten Mrug *et al.*, dass AngII *in vitro* das Wachstum früher erythroider Vorläuferzellen AT1-Rezeptor-vermittelt fördert. Rodgers *et al.* (2000) konnten nachweisen, dass AngII die Proliferation von murinen und humanen hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) stimuliert. In Kulturen mit murinen Lin<sup>-</sup>-Knochenmarkszellen bildet sich unter Zugabe von AngII die fünf- bis siebenfache Menge an Kolonien, mit und ohne gleichzeitiger Gabe des Wachstumsfaktors *colony stimulating factor* (CSF). Dieser Effekt kann mit Losartan blockiert werden. Ebenso wiesen Rodgers *et al.* (2000) einen proliferationsfördernden Effekt von AngII auf frühe hämatopoetische Progenitorzellen (Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>-Zellen) nach, der nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von CSF stattfindet. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass AngII sowohl über mesenchymale Stromazellen die Produktion von CSF stimuliert als auch direkt an den murinen HPC wirkt. Gleiche Beobachtungen konnten auch an humanen HPC gemacht werden. Aus Nabelschnurblut angereicherte CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Progenitorzellen zeigen

eine beschleunigte Proliferation und Formation von *colony forming units* (CFU) der Granulozyten/ Erythrozyten / Makrophagen/ Megakaryozyten-Linie (CFU-GEMM) und der Granulozyten/ Makrophagen-Linie (CFU-GM), jedoch nur in Anwesenheit von CSF. Auch die Bildung erythroider Progenitorzellen in einer Suspensionskultur aus CD34+-Zellen, die zunächst in einem semisoliden Medium mit Erythropoetin (Epo), einem der Hauptwachstumsfaktoren der Erythrozyten (siehe auch Kapitel 1.2.6), kultiviert worden waren, konnte durch AngII um ein Fünf- bis Zwanzigfaches gesteigert werden. Im Anschluss an die Ergebnisse von Rodgers *et al.* konnten Brunet *et al.* (2002) ebenfalls den stimulierenden Effekt von AngII in Kulturen mit Serumsupplementierung nachweisen, zeigten aber auch, dass in serumfreiem Medium das Gegenteil, also eine Hemmung der CFU-GM und der *burst forming units* der Erythrozytenreihe (BFU-E), stattfindet. Die inhibitorische Wirkung blieb bis zu einer Serumkonzentration von 2% nachweisbar, ab einer Konzentration von 20% wirkte AngII stimulierend auf die Kolonienbildung. Für diese konzentrationsabhängigen gegensätzlichen Effekte des AngII gibt es verschiedene Erklärungsansätze: Zum einen ist es möglich, dass AngII durch im Serum vorhandene Enzyme zu Ang-(1-7), AngIII oder AngIV metabolisiert wird und die in den mit Serum supplementierten Kulturen beobachteten proliferationssteigernden Effekte nicht dem AngII sondern einem seiner Metabolite zuzuschreiben sind. Eine andere Erklärung wäre, dass in den mit Serum supplementierten Kulturen die AT2-Rezeptoren auf den HPC in ihrer Expression herunterreguliert werden und AngII vor allem an den AT1-Rezeptoren wirkt bzw. die antagonistische Wirkung des AT2-Rezeptors wegfällt. Die widersprüchlichen Ergebnisse von Rodgers und Brunet zeigen, dass der Einfluss von AngII auf HPC sehr komplex und von vielen Faktoren wie der Konzentration von AngII, seinen Metaboliten und der Expression der Angiotensin-Rezeptoren auf der Oberfläche der HPC abhängig ist.

Auch *in vivo* konnten Effekte von AngII auf HPC nachgewiesen werden: Charrier *et al.* (2004) zeigten im Mausmodell, dass eine kurzzeitige Behandlung mit dem ACE-Hemmer Perindopril nach Bestrahlung einen bestrahlungsinduziertem Tod verhindert und die Regeneration des Knochenmarks beschleunigt. Eine Vorbehandlung mit Perindopril erhöht die Zellzahl im Knochenmark und die Anzahl an HPC vom 7. bis zum 28. Tag nach Bestrahlung. Um zu zeigen, dass es sich dabei um einen AngII-vermittelten Effekt handelt, wurde das Experiment mit einem AT1-Blocker wiederholt, was zu ähnlich protektiven Effekten führte. Somit kann vermutet werden, dass durch eine verminderte AngII-Wirkung über den AT1-Rezeptor sich eine geringere Zahl von HPC in der S-Phase befand und damit nicht durch die Bestrahlung vernichtet wurde.

### 1.2.7. Effekte des RAS auf die Bildung der Erythrozyten

Schon bald nach der Einführung von ACE-Hemmern und AT1-Blockern in den klinischen Gebrauch wurde bei einem Teil der Patienten eine diskrete Verminderung des Hämatokrits als Nebenwirkung dieser Pharmaka beobachtet. Auch von einer geringen Senkung der Hämoglobinkonzentration wurde in zwei prospektiven Studien berichtet (Julius *et al.*, 2004; Dahlof *et al.*, 2002). Nierentransplantierte Patienten können bei pathologischer Überaktivierung des RAS eine Erythrozytose entwickeln. In dieser Situation kann eine Therapie mit ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptorblockern zu einer Senkung des Hämatokrits führen (Julian *et al.*, 1998; Conlon *et al.*, 1996). Noch immer ist nicht vollständig geklärt, wie diese Phänomene zustande kommen. Es existieren verschiedene Hypothesen, über welche Mechanismen das RAS in die Erythropoese eingreift: Erstens könnte dies über eine verstärkte Bildung bzw. Freisetzung von Epo geschehen. Eine zweite, in Abschnitt 1.2.4 genauer erläuterte Theorie besagt, dass der Wirkmechanismus über die Hydrolysierung des Tetrapeptids acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) durch das ACE vonstatten geht. Eine dritte Hypothese postuliert eine direkte Wirkung der Peptide des RAS auf erythroide Vorläuferzellen (Hubert *et al.*, 2006).

Freudenthaler *et al.* berichteten, dass Infusion von AngII in Dosierungen unterhalb sowie oberhalb der blutdrucksteigernden Wirkung den Epo-Spiegel in gesunden Probanden erhöht (2000; 1999). Gleichzeitige Verabreichung eines ACE-Hemmers zeigte keinen Effekt, jedoch konnte ein AT1-Blocker diese Epo-Erhöhung inhibieren. Die daraus resultierende Vermutung, dass AngII an der physiologischen Regulation der renalen Epo-Ausschüttung entscheidend beteiligt ist, wurde jedoch teilweise revidiert, nachdem die gleiche Arbeitsgruppe die Wirkung einer endogenen AngII-Ausschüttung auf die Epo-Konzentration untersuchte: Unter Stimulation des RAS mit Furosemid bzw. Salzdiät konnte in gesunden Probanden keine vermehrte Epo-Ausschüttung festgestellt werden (Freudenthaler *et al.*, 2003).

Die Faktoren, die die Determinierung der multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen auf die Erythropoese regulieren, sind noch nicht vollständig geklärt. Epo ist ein obligater Wachstumsfaktor, der Teilung und Differenzierung der erythroiden Zellreihe stimuliert und Apoptose verhindert. Für die Proliferation früher erythroider Progenitorzellen sind vor allem IL-3 und der Stammzellefaktor zu nennen, die jedoch nicht spezifisch auf die Erythropoese festgelegt sind (Clark und Kamen, 1987; Bernstein *et al.*, 1991). Neben den eben genannten gibt es noch eine Reihe weiterer bekannter Faktoren, die die Erythropoese beeinflussen: *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), Granulozyten/Makrophagen-CSF (GM-CSF), IL-6, IL-1, Aktivin-A, und *basic fibroblast growth factor* (Shao *et al.*, 1992; Cashman *et al.*, 1990).



AngII könnte theoretisch ebenfalls zu diesen Faktoren gehören. Um diese Frage zu klären, untersuchten Mrug *et al.* erythroide Vorläuferzellen auf AT1-Rezeptor-mRNA und AT1-Rezeptor-Protein und konnten beides in den Zellen nachweisen. Zusätzlich zeigten sie, dass die Zugabe von AngII die Epo-stimulierte Proliferation erythroider Vorläuferzellen *in vitro* zusätzlich verstärkt; dieser Effekt wurde durch AT1-Rezeptorblockade vollständig aufgehoben (Mrug *et al.*, 1997). Analog zu den klinischen Beobachtungen zur ACE-Hemmer- bzw. AT1-Blocker-Therapie konnten Cole *et al.* *in vivo* zeigen, dass ein Mangel an AngII zu Anämie führt (2000). Dazu verwendeten sie ein Mausmodell mit einem genetisch verkürzten ACE-Protein (ACE.2). In homozygoten Tieren war eine schwache ACE-Aktivität von 34% im Vergleich zum Wildtyp erhalten, nur die N-terminale katalytische Domäne des ACE-Proteins wurde exprimiert. Da der nicht mehr exprimierte C-terminale Teil des Proteins dieses normalerweise in der Zellmembran verankert, zirkulierte das ACE.2-Protein im Blut und in extrazellulärer Flüssigkeit, ließ sich jedoch nicht in Geweben wie Lunge und Niere nachweisen. Der AngII-Spiegel im Blut war signifikant vermindert. In diesen Tieren war eine signifikante Reduktion des Hämatokrit und Hämoglobins zu beobachten. Gleichzeitig waren sowohl Epo-Spiegel als auch AcSDKP-Spiegel erhöht. Der Phänotyp dieses Modells präsentierte sich mit Hypotonie und normaler Nierenfunktion (im Gegensatz zu Mäusen mit kompletter Defizienz des ACE), wodurch eine renale Ursache der Anämie nicht mehr in Frage kam. Auch Hämolyse und Eisenmangel konnten als Ursache ausgeschlossen werden. Eine zweiwöchige Infusion mit AngII erhöhte den Hämatokrit in diesen Tieren auf beinahe normale Werte. Diese Ergebnisse suggerieren, dass die Anämie durch einen Mangel an AngII hervorgerufen wurde und nicht, wie häufig vermutet, durch hohe Plasmakonzentrationen von AcSDKP. Zusätzlich scheint die Wirkung von AngII nicht auf einer vermehrten Ausschüttung von Epo zu beruhen, da dieses unter AngII-Mangel und Anämie erhöht war (Cole *et al.*, 2000). Auch die Fähigkeit der BFU-E-Bildung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut chronischer Dialysepatienten und gesunder Probanden ist unter AT1-Rezeptorblockade signifikant vermindert (Naito *et al.*, 2003). Untersuchungen an transgenen Mäusen, die sowohl Renin als auch Agt überexprimierten (THM-Mäuse), zeigten, dass diese Tiere eine Erythrozytose entwickelten, die nicht nachzuweisen war, wenn die Tiere zusätzlich AT1-Rezeptor-Knockout-Mäuse waren (Kato *et al.*, 2005). Der Epo-Spiegel im Plasma war in den THM-Tieren signifikant erhöht, in THM/ AT1-Knockout Mäusen niedriger, jedoch immer noch signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Bei THM-Mäusen, die nur im Knochenmark keinen AT1-Rezeptor exprimieren, zeigte sich keine Veränderung in der durch das RAS vermittelten Erythrozytose. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Cole *et al.*

postulierten Kato *et al.* deshalb, dass der AT1-Rezeptor die Erythropoese über Stimulierung der Epo-Produktion in der Niere beeinflusst.

### **1.2.8. Mögliche Wirkungsweisen des Angiotensin converting enzyme**

Die bisher erforschten Wege, über die das RAS Einfluss auf die Hämatopoese nehmen kann, sind zahlreich und vielfältig. Das ACE hat neben AngI verschiedene Substrate und könnte so zum einen über die Produktion von AngII wirken, zum anderen über Bradykinin oder andere vasoaktive Peptide. Das Tetrapeptid acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) ist ein reversibler negativer Regulator der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen, indem es die Rekrutierung der primitiven Stammzellen in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. AcSDKP wurde als physiologisches Substrat des ACE identifiziert (Rousseau *et al.*, 1995; Rieger *et al.*, 1993). ACE soll das wichtigste Enzym zur Inaktivierung von AcSDKP sein. Es besitzt zwei homologe katalytische Domänen, die N- und C-Domäne, die sich in Struktur und Funktion zwar ähnlich sind; die N-Domäne hydrolysiert AcSDKP jedoch 50mal schneller als die C-Domäne. Durch Spaltung des AcSDKP wird die Rekrutierung der primitiven hämatopoetischen Stammzellen in den Zellteilungszyklus gefördert (Gaudron *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997). Durch Gabe des ACE-Hemmers Captopril in gesunden Probanden konnte die Hydrolyse von AcSDKP um 90-99% inhibiert und dadurch eine fünffach erhöhte Plasmakonzentration von AcSDKP hervorgerufen werden (Azizi *et al.*, 1996). Comte *et al.* (1997) wiesen in gesunden Probanden nach Behandlung mit einem ACE-Hemmer eine verminderte Zahl zirkulierender hämatopoetischer Vorläuferzellen nach. Auch bei diesen Probanden erhöhte sich die Konzentration des Peptids AcSDKP im Plasma, sodass Comte *et al.* vermuteten, dass das RAS über AcSDKP auf die Progenitorzellen Einfluss nimmt. Die pharmakologische Behandlung von Mäusen mit dem ACE-Hemmer Lisinopril nach Knochenmarksbestrahlung erhöhte die AcSDKP-Spiegel im Blutplasma um ein Sechsfaches und hatte zur Folge, dass innerhalb der ersten 24h nach Behandlung der Eintritt der hämatopoetischen Progenitorzellen in den Zellzyklus vollständig ausblieb (Rousseau-Plasse *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen gelang es Fuchs *et al.* (2004) durch Generierung von Mäusen mit selektiv inaktiverter N-Domäne des ACE zu zeigen, dass zwar durch fehlende hydrolytische Fähigkeit der N-Domäne des ACE der AcSDKP-Spiegel im Blut und im Urin steigt, die Hämatopoese jedoch nicht beeinträchtigt ist. Tiere ohne funktionelle N-Domäne erholen sich nach Phenylhydrazin-induzierter Anämie ebenso schnell wie Wildtypen. Damit scheint die Möglichkeit, dass die Effekte des RAS auf die Hämatopoese über AcSDKP mediert werden, weniger wahrscheinlich (Fuchs *et al.*, 2004).

### **1.2.9. Mögliche Pathways des Angiotensin II**

Verschiedene molekulare Mechanismen, über die AngII agiert, sind bekannt und können demnach auch im Rahmen der Wirkung des RAS auf die Hämatopoese eine Rolle spielen. Ruiz-Ortega *et al.* zeigten, dass AngII den nuclear factor (NF)- $\kappa$ B über den AT1- und AT2-Rezeptor aktiviert (2000). NF- $\kappa$ B ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor, der die Genexpression bei vielen vaskulären und hämatopoetischen Vorgängen reguliert und von großer Bedeutung für die Modulation von Immunantwort, Zellproliferation und Zelltod ist. AngII wirkt außerdem über den *Janus-Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK-STAT)-Signalweg (Horiuchi *et al.*, 1999), einem intrazellulären Signalübertragungsmechanismus, der auch von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie dem Granulozyten- Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF), GM-CSF, Epo, Thrombopoetin u.a. genutzt wird. Auch ein weiterer wichtiger intrazellulärer Signalweg der Hämatopoese, der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg, wird durch AngII aktiviert (Kubo *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 1998). Da AngII eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathologischen Vorgängen in kardialem, renalem, vaskulärem und zerebralem Gewebe durch Aktivierung der oben genannten Signalkaskaden spielt (Huckle und Earp, 1994), ist es wahrscheinlich, dass auch in der Regulation der Hämatopoese ähnliche Mechanismen wirken. Ein weiterer Faktor, der die Hämatopoese reguliert, ist die Arachidonsäure (AA). Diese biologisch aktive Fettsäure wird von den Stromazellen des Knochenmarks produziert und moduliert Differenzierung und Wachstum von HPC und erythroiden und myeloiden Vorläuferzellen über die Bildung von Eicosanoid-Metaboliten und Wachstumsfaktoren, und möglicherweise auch durch eine direkte Wirkung auf HPC (Rizzo, 2002; Torok-Storb *et al.*, 1999). Es ist bekannt, dass in verschiedenen Geweben eine AT1- und AT2-Rezeptor-vermittelte Freisetzung von AA zur Modulationen von Zellwachstum und Differenzierung führt (Muthalif *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998; Lokuta *et al.*, 1994). Richmond *et al.* (2004) zeigten, dass AngII auch bei den Stromazellen im Knochenmark zu einer Freisetzung von AA führt. Sowohl AT1- als auch AT2-Rezeptorblocker verhindern die durch AngII ausgelöste AA-Sekretion. Damit identifizierten sie einen weiteren möglichen Mechanismus, über den AngII direkt auf die Hämatopoese wirken könnte.

### **1.2.10. Ang-(1-7) und seine Einflüsse auf die Hämatopoese**

Studien zeigen, dass auch Ang-(1-7) an der Regulation der Hämatopoese beteiligt ist. Ang-(1-7) kann ebenso wie AngII die Regeneration des Knochenmarks nach Bestrahlung und Chemotherapie beschleunigen und die Zahl der HPC in Knochenmark und Blut erhöhen

(Rodgers *et al.*, 2003; Rodgers *et al.*, 2002). Tägliche Administration von AngII bzw. Ang-(1-7) nach Chemotherapie mit 5-Fluoruracil (5-FU) erhöht die Thrombozytenzahl im peripheren Blut und die Anzahl myeloider, erythroider und megakaryozytärer Vorläuferzellen im Knochenmark. Nach intravenöser Behandlung mit dem im Gegensatz zu 5-FU stammzelltoxischen Cyclophosphamid konnte die Arbeitsgruppe nach Ang-(1-7)-Administration einen positiven Effekt auf die Zahl der peripheren und knochenmarksständigen weißen Blutzellen und myeloiden Vorläuferzellen verzeichnen. Inhibition mit einem AT1-Blocker konnte die positiven Effekte der AngII-Administration nach Bestrahlung aufheben, nicht jedoch die Wirkung von Ang-(1-7). Dementsprechend scheinen die Angiotensinpeptide ihre Stimulation auf die hämatopoetische Regeneration über spezifische Rezeptoren auszuüben. Während bei AngII der AT1-Rezeptor als Signalübermittler identifiziert ist, ist bei Ang-(1-7) nicht geklärt, welcher Rezeptor für die Effekte verantwortlich ist. Auch die Forschungsgruppe um Ellefson zeigte, dass Ang-(1-7) nach Chemotherapie die Hämatopoese auf verschiedenen Ebenen beeinflusst. Eine erhöhte Anzahl Ang-(1-7)-bindender früher Progenitorzellen ( $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{cKit}^+$ ) wurde fünf bis sieben Tage nach 5-FU-Behandlung in der Durchflusszytometrie detektiert. Des Weiteren erhöhte sich die Zahl zirkulierender Leuko- und Thrombozyten. Den stärksten Effekt scheint Ang-(1-7) auf die Bildung von Vorläuferzellen verschiedener Zelllinien auszuüben; Ellefson *et al.* wiesen eine verstärkte Bildung von BFU-E, CFU-Meg, CFU-GM and CFU-GEMM nach. Die Coadministration von Filgrastim (rekombinantes G-CSF) mit Ang-(1-7) führt bei Myelosuppression zu einem synergistischen Effekt auf die Zahl der zirkulierenden Leukozyten und die Proliferation der erythroiden und megakaryozytären Zellreihen (Ellefson *et al.*, 2004). Ang-(1-7) stimuliert außerdem die Proliferation aus Nabelschnurblut gewonnener humaner  $\text{CD34}^+$  HPC *in vitro* und *in vivo* (Heringer-Walther *et al.*, 2009). Im Mausmodell demonstrierte die Arbeitsgruppe in der gleichen Publikation, dass eine kontinuierliche Infusion von Ang-(1-7) das *Engraftment* von  $\text{CD34}^+$  Zellen drastisch verbessert.

### **1.2.11. Klinische Bedeutung und Perspektiven**

ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorblocker sind gut etablierte Standardmedikamente in der Therapie kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen. Detailliertes Wissen über weitere Wirkungsbereiche des RAS sind daher essentiell zur richtigen Indikationsstellung und individuellen Therapieplanung insbesondere bei multimorbiden Patienten. Die hämatokritsenkende Nebenwirkung einer ACE-Hemmer- und AT1-Blocker-Therapie könnte

möglicherweise von Vorteil sein, da ein hoher Hämatokrit bereits als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor verdächtigt wurde (De Simone *et al.*, 1990). Für die gängigen Pharmaka des RAS gibt es, wie bereits erwähnt, mehrere Indikationsstellungen für hämatologische Erkrankungen: ACE-Hemmer und AT1-Blocker werden gezielt zur Senkung des Hämatokrits bei Erythrozytose nach Nierentransplantation verwendet (Rell *et al.*, 1994; Ducloux *et al.*, 1997; Julian *et al.*, 1998). Captopril und Losartan können als medikamentöser Aderlass bei Polyzythämia vera verwendet werden (Nomura *et al.*, 1996). Neueste Erkenntnisse suggerieren, dass das RAS ebenfalls in der Pathogenese maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems eine Rolle spielt: ACE, Renin und Agt werden in leukämischen Blasten bei akuter myeloischer Leukämie (AML) überexprimiert (Aksu *et al.*, 2006; Beyazit *et al.*, 2007). *In vitro*-Inkubation von AML Zellen mit ACE-Hemmern führt zu einem verminderten Wachstum und hemmt die Fähigkeit zur Bildung von CFU. Die Zugabe von AngII machte diesen Effekt teilweise rückgängig (Punto *et al.*, 2004). Die mRNA-Expression von ACE, Agt und Renin bei chronisch myeloischer Leukämie reduziert sich mit der Administration des Tyrosinkinase-Hemmers Imatinib (Sayitoglu *et al.*, 2009). AngII wurde als autokriner Wachstumsfaktor bei AML identifiziert (Haznedaroglu und Beyazit, 2010). Ein detailliertes Wissen über Wirkort und -mechanismus verschiedener Komponenten des RAS in diesem pathologischen Zusammenhang bieten neue Möglichkeiten für therapeutische Ansätze für neoplastische Erkrankungen des Knochenmarks.

Rodgers *et al.* zeigten, dass Angiotensinpeptide einen günstigen Effekt auf die Regeneration des Knochenmarks haben. Dabei geht es vor allem um die Stimulierung hämatopoetischer Progenitorzellen. Die Effekte von Ang-(1-7) entsprechen dabei denen des AngII. Anders als AngII führt Ang-(1-7) jedoch nicht zu Hypertonie, vielmehr sind dem Peptid AngII-antagonisierende kardiovaskuläre und auch kardioprotektive Eigenschaften nachgewiesen worden (Loot *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010). Für einen möglichen therapeutischen Einsatz bei myelosuppressiver Therapie und Knochenmarkstransplantation könnte dieses Angiotensinpeptid damit ein günstigeres Wirkungsprofil aufweisen.

Eine weitere therapeutische Möglichkeit ist die Inhibition der Hämatopoese durch AT1-Blocker bzw. ACE-Hemmer bei der Therapie mit zytotoxischen, S-Phase-spezifischen Medikamenten und bei Bestrahlung. Die RAS-Pharmaka sollen zu einer Proliferationshemmung der hämatopoetischen Stammzellen führen bzw. das Eintreten in die S-Phase des Zellzyklus verhindern und damit die Sensitivität der hämatopoetischen Stammzellen auf die toxische Therapie vermindern (Parker und Pragnell, 1995; Charrier *et al.*, 2004).

### 1.3. Tiermodelle

In diesem Kapitel werden alle gentechnisch modifizierten Mausstämme beschrieben, die in dieser Doktorarbeit verwendet wurden.

#### 1.3.1. Angiotensinogen-Knockout-Mäuse (Agt<sup>-/-</sup>)

Durch homologe Rekombination embryonaler Stammzellen der Maus zur Disruption des Agt-Gens gelang es Tanimoto *et al.* (1994) einen Mausstamm ohne endogene Produktion von Agt zu generieren. Die Deletion des Gens resultiert in einem vollständigen Verlust von AngI im Plasma. Diese Tiere sind signifikant hypotensiv, wachstumsretardiert und zeigen bereits als Neugeborene pathologische Nierenveränderungen mit Hypertrophie der Nierenarterien und Hydronephrose (Lochard *et al.*, 2003; Niimura *et al.*, 1995; Tanimoto *et al.*, 1994). Des Weiteren wurden in diesen Tieren eine veränderte Stoffwechsellage mit verminderten systemischen Leptin- und Insulinspiegeln nachgewiesen, die zu Untergewicht führen (Kim *et al.*, 2006).

#### 1.3.2. Mäuse mit Defizienzen des AT1a-, AT1b- und AT2-Rezeptors

Nagetiere besitzen im Gegensatz zum Menschen zwei AT1-Rezeptorsubtypen, die in ihrer Struktur zu 94% miteinander übereinstimmen. Die AT1a-Isoform wurde in einer Vielzahl von Organen nachgewiesen, darunter im Herzen, in der Niere, der Lunge, der Leber, in den glatten Muskelzellen der Gefäßwände und im Gehirn, während der AT1b-Subtyp vor allem im Hypothalamus nachgewiesen wurde (Dinh *et al.*, 2001). Die Rolle des AT1b-Rezeptors ist in vieler Hinsicht noch unklar, er wurde jedoch zum Beispiel auch in den Mesenterialarterien von Mäusen nachgewiesen und soll dort durch AngII hervorgerufene Vasokonstriktion vermitteln (Zhou *et al.*, 2005). Mäuse mit Defizienzen des AT1a- und AT1b-Rezeptors wurden von Ito *et al.* (1995) und Oliverio *et al.* (1998), Tiere mit AT2-Defizienz erstmals von Hein *et al.* (1995) beschrieben. Gembardt *et al.* (2008) generierten mithilfe von AT1a-, AT1b- und AT2-Single-Knockout-Mäusen erstmals AT1a- und AT1b-, AT1b- und AT2-, und AT1a- und AT2-Doppel-Knockout-Mäuse und Triple-Knockout-Mäuse. Um homozygote Wildtypen, Doppel-Knockout- und Triple-Knockout-Tiere zu erhalten, wurden heterozygote Tiere untereinander auf einem 129 x C57BL/6-Hintergrund gekreuzt, da AT1a/1b-Doppel-Knockout-Mäuse auf dem reinen C57BL/6-Hintergrund nicht überlebten (Oliverio *et al.*, 1998). Dieses *cross-breeding* diente auch dazu, einen möglichst ähnlichen genetischen Hintergrund für die homozygoten Tiere zu erhalten (Gembardt *et al.*, 2008). Triple-Knockout-Tiere sind überlebensfähig und fruchtbar, haben jedoch ebenso wie AT1a- und AT1b-Doppel-

Knockout-Mäuse eine erhöhte Mortalität in der Stillperiode. Doppel-Knockout-Mäuse, die nur den AT2-Rezeptor exprimieren, und Triple-Knockout-Mäuse zeigen in gleichem Maße wie bei den im vorigen Abschnitt beschriebenen Agt-Knockout-Tieren pathologische Nierenveränderungen. Doppel-Knockout-Tiere mit alleiniger Expression des AT1a zeigen einen gesunden Phänotyp der Nieren, während Tiere mit alleiniger Expression des AT1b einen intermediären Phänotyp aufweisen. AT2-Defizienz führt zu erhöhtem basalen Blutdruck, während Tiere mit AT1a-Deletion hypotensiv sind und ein erniedrigtes Herzgewicht haben; diese beiden Merkmale werden durch zusätzliche Defizienz im AT1b-Rezeptor weiter verstärkt. Hämodynamische Untersuchungen an diesen Tieren zeigen, dass eine AT1a-Deletion die vasokonstriktive Wirkung von AngII-Bolusinjektionen *in vivo* vermindert, umso stärker bei gleichzeitiger AT1b-Deletion, während alleinige oder kombinierte Defizienz im AT1b und/ oder AT2-Rezeptor keinen Einfluss auf diesen Effekt hatte. AngII-Injektion hat keinerlei Effekt auf den mittleren arteriellen Blutdruck in Triple-Knockout-Mäusen, was suggeriert, dass AT1a-, AT1b- und AT2-Rezeptoren die einzigen Vermittler der blutdruckregulierenden Effekte von AngII sind (Gembardt *et al.*, 2008). Van Esch *et al.* (2010) zeigten, dass Deletionen in den AngII-Rezeptoren weder eine veränderte Morphologie der mittelgroßen Koronargefäße noch eine verstärkte Fibrose zur Folge hatten. Herzen von Tieren mit AT1a- und AT1b-Defizienz sind jedoch verstärkt atrophiert. AngII-Infusion vermindert in allen Tieren die koronare Perfusion und den linksventrikulären systolischen Druck, außer in Tieren mit AT1a-Defizienz, bei denen dieser Effekt unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen der übrigen AngII-Rezeptoren ausbleibt.

### **1.3.3. Angiotensinogen-überexprimierende Mäuse (TGM(rAOGEN)123)**

Eine Überexpression von Ratten-Agt in NMRI-Mäusen wurde erstmals von Kimura *et al.* (1992) beschrieben. Sie benannten die von ihnen generierte transgene Linie TGM(rAOGEN)123. Das Genkonstrukt, bestehend aus Ratten-Agt-cDNA hinter einem endogenen Agt-Promoter, führt zur Überexpression von Agt in verschiedenen Organen. Das Ratten-Agt wird in hohen Konzentrationen in Leber und Gehirn produziert, lässt sich aber auch in Herz, Nieren und Hoden nachweisen. Plasma AngII-Spiegel sind in TGM(rAOGEN)123 um das dreifache erhöht. Die Tiere sind signifikant hypertensiv.

### **1.3.4. Mas-Knockout Mäuse**

Mäuse mit Defizienz des *Mas*-Protoonkogens wurden erstmals von Walther *et al.* (1998) durch gezielte Disruption des Gens erzeugt und beschrieben. Mas-Knockout-Tiere sind phänotypisch gesund und zeigen keine offensichtlichen Störungen in Wachstum und

Entwicklung. Obwohl der Mas-Rezeptor in hoher Konzentration im Hoden exprimiert wird, ist die Fertilität der Mas-Knockout-Tiere nicht beeinträchtigt. Im Gehirn führt die Defizienz des Mas-Rezeptors zu einer verlängerten Erhaltung der Langzeitpotenzierung der Neuronen im Gyrus dentatus. Diese positive Beeinflussung der synaptischen Plastizität geht mit Verhaltensänderungen im Sinne von erhöhter Angst einher (Walther *et al.*, 1998).

Das Trinkverhalten und der mittlere arterielle Druck sind im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Vor allem weibliche Mas-Knockout-Tiere zeigen jedoch eine verminderte Variabilität der Pulsfrequenz. Knockout-Tiere beider Geschlechter weisen einen erhöhten Sympathikotonus auf (Walther *et al.*, 2000). In der Niere führt die Mas-Defizienz zu Mikroalbuminurie und glomerulärer Hyperfiltration bei gleichzeitig histologisch veränderten Glomerula und verstärkter Expression von Kollagen IV und Fibronectin. Es wird daher vermutet, dass der Mas-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Regulation der renalen Fibrogenese spielt (Pinheiro *et al.*, 2009).

#### **1.4. Ziel dieser Arbeit**

Bisherige Studien, die sich mit dem Einfluss des RAS auf die Hämatopoese beschäftigten, zeigen, dass die Wirkungsweisen des RAS sehr vielfältig und komplex sind. Zum einen gibt es verschiedene Komponenten des RAS (ACE, AngII, weitere Angiotensin-Metabolite wie vor allem Ang-(1-7)), von denen nachgewiesen wurde, dass sie auf unterschiedliche Weise die Blutbildung beeinflussen. Zum anderen kann die Hämatopoese auf verschiedenen Stufen bzw. Ebenen durch das RAS moduliert werden. So wurde gezeigt, dass eine Stimulation früher hämatopoetischer Progenitorzellen durch AngII stattfindet, in anderen Studien wiederum waren spätere Entwicklungsstufen in der Erythropoese als Wirkungsort des RAS identifiziert worden (Rodgers *et al.*, 2000; Mrug *et al.*, 1997). Auch über die Wirkmechanismen herrscht weitgehend Unklarheit; es gibt sowohl Hinweise auf eine indirekte Beeinflussung der hämatopoetischen Zellen über Stimulation von Stromazellen im Knochenmark und konsekutiver Zytokinfreisetzung, als auch auf eine direkte Wirkung an den blutbildenden Zellen. Bezüglich der Frage, wie der stimulierende Effekt von AngII auf die Erythropoese zustande kommt, gibt es teils widersprüchliche Studienergebnisse, denn sowohl eine vermehrte Freisetzung von Epo als auch eine direkte Stimulation über den AT1-Rezeptor konnten experimentell nachgewiesen werden (Kato *et al.*, 2005; Cole *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit ging es darum, folgende Hypothesen, die sich aus der bisherigen Literatur ergaben, zu überprüfen:



1. AngII wirkt stimulierend auf die Erythropoese, dieser Effekt ist AT1-vermittelt.
2. AngII stimuliert hämatopoetische Progenitorzellen.
3. Ang-(1-7) stimuliert hämatopoetische Progenitorzellen und bewirkt damit eine Erhöhung aller Blutzellen im Blut.
4. Der Mas-Rezeptor hat als funktioneller Rezeptor von Ang-(1-7) Einfluss auf das Blutbild.

Da die meisten Daten bis dahin *in vitro* erhoben wurden, ging es vor allem darum, *in vivo* zu untersuchen, ob einzelne RAS-Bestandteile sichtbare Effekte auf das periphere Blutbild haben. Die Zellzahlen im Blut unterliegen, wie in Abschnitt 1.2.2 erläutert, neben Modifikationen in der Blutbildung auch anderen Einflüssen wie Abbaurate und Volumeneffekte, sodass anhand dieser Daten nur vermutet werden kann, dass die Abweichungen auf einer Modulation der Blutbildung beruhen. Um diese Vermutungen weiter zu erhärten, wurden durchflusszytometrische Analysen der Knochenmarkszellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Hämatopoese durchgeführt.

Neben der Untersuchung der eben genannten Hypothese diente die Arbeit auch dazu, den Einfluss einzelner RAS-Komponenten auf das Blutbild explorativ zu untersuchen, da bisher wenig detailliertes Wissen diesbezüglich existiert.

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf folgende Bestandteile des RAS:

- die AngII-Rezeptoren
- Agt
- AngII
- Ang-(1-7) und der Mas-Rezeptor

Da die Blutbildung durch verschiedene physiologische und pathologische Zustände moduliert wird, wurden die einzelnen Komponenten unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht:

- Die Defizienz von AngII-Rezeptoren, Agt und dem Mas-Rezeptor unter basalen Bedingungen im Knockout-Modell
- Die Überexpression von Agt unter basalen Bedingungen im transgenen Modell
- Eine Stimulation durch exogenes AngII in Wildtyp-Mäusen und die Rolle der einzelnen AngII-Rezeptoren durch pharmakologische Blockade
- Mögliche über den Mas-Rezeptor vermittelte Effekte der AngII-Stimulation
- Stimulation durch exogenes Ang-(1-7-) in Wildtyp- und Mas-knockout-Mäusen und die Rolle der Ang-(1-7) /Mas-Achse unter pathologischen Bedingungen

## 2. Material

### 2.1. Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez (Berlin-Buch, Deutschland) bezogen. Die Darstellung der Primersequenz erfolgt von 5' nach 3'.

#### Primer zur Genotypisierung des Mas-Knockout-Stammes

WT	Mas10	GTA CAG CTT CGA AGA ATG GGA GGC CC
	Mas14	CCT AAC TGA GCC ACC CTC ACC
KO	Mas12	GCC GTT GCC CTC CTG GCG CCT GGG
	NeoPVU	GGC AGC GCG GCT ATC GTG G

#### Primer zur Genotypisierung des Agt-Knockout-Stammes

WT	MMAng3N	CCA GTG GCA AGT TCA TCT TCC
	MMAng5N	CCA CCA GCT CTC TTT GGC ACC
KO	MMAng3N	CCA GTG GCA AGT TCA TCT TCC
	NeoPVU	GGC AGC GCG GCT ATC GTG G

#### Primer zur Genotypisierung von Agt-überexprimierenden Mäusen

RNANG 3N	CCC AAG CTC TCA ACA AAT GGC
RNANG 5N	GAG TGA GGC AAG AGG TGT AG

#### Primer zur Genotypisierung von AT1a-Defizienz

WT	AT1 A5	AAC CCA GAA AAG CAA AAT GGC
	AT1 3N	GTA GCG GTC GAT GCT GAG A
KO	AT1 TW33	GCT GGT AAG AAT GAT TAG G
	NeoTho	CTG CTT GCC GAA TAT CAT GG

#### Primer zur Genotypisierung von AT1b-Defizienz

WT	AT1 B3	CCA GGG CAA GAT TCA GAA GG
	AT1 B5	CCA ACA AAG AGA CAT GAT C
KO	Neo 1L	CCT GCG TGC AAT CCA TCT TGT TCA ATG
	AT1 B5	CCA ACA AAG AGA CAT GAT C

## Primer zur Genotypisierung von AT2-Defizienz

WT	AT25	CCA CCA GCA GAA ACA TTA CC
	AT23	GAA CTA CAT AAG ATG CTT GCC AGG
KO	AT23	GAA CTA CAT AAG ATG CTT GCC AGG
	NeoPVU	GGC AGC GCG GCT ATC GTG G

## 2.2. Enzyme

Produkt	Firma	Firmenort
RNase A	Roche	Basel, Schweiz
Proteinase K	Sigma	München, Deutschland
BioTherm™ DNA-Polymerase	Rapidozym	Berlin, Deutschland

## 2.3. Chemikalien

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>	<u>Firmenort</u>
Agarose	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma	München, Deutschland
λEcoR I/HindIII (DNA-Längenmarker)	Promega	Mannheim, Deutschland
dNTP	Rapidozym	Berlin, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva	Heidelberg, Deutschland
FCS	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
Xylazin (Rompun)	Bayer	Leverkusen, Deutschland
Ketamin (Ketanest)	Pfizer	Berlin, Deutschland
SDS	Serva	Heidelberg, Deutschland
PD123.319 Ditrifluoroacetat	Sigma	München, Deutschland
Sucrose	Sigma	München, Deutschland
Tris	Sigma	München, Deutschland

## 2.4. Peptide und ihre Sequenzen

Angiotensin II	Bachem	Weil am Rhein, Deutschland
----------------	--------	----------------------------

AngII-(1-8): Asp1 - Arg2 - Val3 - Tyr4 - Ile5 - His6 - Pro7- Phe8

**Angiotensin-(1-7)** Bachem Weil am Rhein, Deutschland

Ang-(1-7): Asp1 - Arg2 - Val3 - Tyr4 - Ile5 - His6 - Pro7

**A779** Bachem Weil am Rhein, Deutschland

A779: ASP1 – Arg2 – Val3 – Tyr4 – Ile5 – His6 – D-Ala7

## 2.5. Antikörper

<b>Biotin Mouse Lineage Panel</b> (TER119, CD11b, GR-1, B220, CD3e)	BD Pharmingen	San Diego, CA, USA
<b>PE Rat Anti-Mouse CD117 (c-kit)</b>	BD Pharmingen	San Diego, CA, USA
<b>FITC Rat Anti-Mouse Ly-6A/E (Sca-1)</b>	BD Pharmingen	San Diego, CA, USA
<b>PE Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (FcγR)</b>	BD Pharmingen	San Diego, CA, USA
<b>FITC Rat anti-Mouse CD34</b>	BD Pharmingen	San Diego, CA, USA
<b>Biotin Rat Anti-Mouse CD127</b>	BD Pharmingen	San Diego, CA, USA
<b>Streptavidin PerCP</b>	BD Pharmingen	San Diego, CA, USA

## 2.6. Stammlösungen, Puffer und Gele

### 2.6.1. Stammlösungen und Puffer

<b>dNTP-Mix:</b>	dATP	20µl
	dCTP	20µl
	dGTP	20µl
	dTTP	20µl
	1x TE-Puffer	320µl
<b>Ethidiumbromidlösung:</b>	1mg Ethidiumbromid/ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
<b>FACS-Puffer:</b>	EDTA	2mM
	FCS	2%
	NaN <sub>3</sub>	0,1%
	1x PBS-Puffer	
<b>Laufpuffer:</b>	Sucrose	4g
	Bromphenolblau	2,5mg
	1x TE	10ml
<b>λ-Marker:</b>	λ-DNA	80µl
	1x TE-Puffer	100µl
	Laufpuffer	20µl

<b>PBS-Puffer 10x:</b>	NaCl	80g
	KCl	2g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5g
	KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH = 7,2	auffüllen auf 1000ml

<b>Primer-Stammlösung:</b>	<b>Je µg Oligonucleotide :</b>	
	1x TE-Puffer	1µl

**Verdünnung für PCR-Einsatz:**

Stammlösung	10µl
1x TE-Puffer	190µl

<b>ProteinaseK:</b>	10mg Proteinase K/ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
---------------------	---

<b>Ohrlochpuffer:</b>	Tris	6,1g
	EDTA	37,2g
	NaCl	5,8g
	SDS	10g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , pH = 8,0	auffüllen auf 1000ml

<b>RNase A:</b>	10mg RNase/100ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
-----------------	---

<b>TE 10x:</b>	Tris/HCl	100mM
	EDTA pH 8,0	10mM

## 2.6.2. Gele

**Agarosegel** 1%: 2g Agarose ad 200ml 1x TAE-Puffer

Um die Fragmente sichtbar zu machen, wurden auf 30ml Agarose-Lösung 1,7µl Ethidiumbromid-Stammlösung (2.7.1) gegeben.

## 2.7. Osmotische Minipumpen

Osmotic mini pump Model 2002 Alzet Cupertino, CA, USA

## 2.8. Mausstämme

Die verwendeten Mäuse waren ausschließlich männlichen Geschlechts und wurden unter standardisierten Bedingungen in den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (FEM) der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin gehalten. Zucht und Haltung erfolgten in klimatisierten Räumen (21 Grad Celsius, relative Luftfeuchtigkeit 50 %) und bei künstlichem 12-stündig wechselndem Tag-/ Nachtrhythmus. Leitungswasser und Futter standen den Mäusen frei zur Verfügung. Die Haltung der Mäuse und die Untersuchungen

erfolgten gemäß dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the OPRR (Office for Protection against Research Risk) of the US National Institutes of Health, Washington D.C.“ (NIH-Publikation No. 85-23, überarbeitet 1985) und waren von den zuständigen Behörden genehmigt worden (Tötungsanzeige T 615; Genehmigungsnummer G 0258/05 des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin, genehmigt am 11.01.2006). Die einzelnen Mausstämme werden in Abschnitt 1.3 beschrieben.

## 2.9. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmenort</b>
<b>Blutbild-Analysegerät</b>	Scil animal blood counter	Scil animal care company GmbH	Viernheim, Deutschland
<b>Elektrophoresen</b>	Maxigel G48	Biometra	Göttingen, Deutschland
<b>Durchflusszytometer</b>	FACSCalibur	BD	Franklin Lakes, NJ, USA
<b>Heizbad</b>	GFL 1083	Zeiss	Burgwedel, Deutschland
<b>Mikroskop</b>	DMIL	Leica	Wetzlar, Deutschland
<b>PCR-Maschinen</b>	Mastercycler Masterc. pers. Masterc. Grad.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>Thermomixer</b>	Ther. comp. Ther. comf.	Eppendorf Eppendorf	Hamburg, Deutschland Hamburg, Deutschland
<b>Geldokumentationsanlage</b>	BioDoc Analyse	Biometra	Göttingen, Deutschland
<b>Vortex</b>	MS1 VF2	IKA Werke Jenke&Kunke	Staufen, Deutschland
<b>Waage</b>	SBC 21	l Scaltec	Heiligenstadt, Deutschland
<b>Zentrifugen</b>	5415 D 3200 1.0R	Eppendorf Eppendorf Heraeus	Hamburg, Deutschland Hamburg, Deutschland Hanau, Deutschland

## **3. Methoden**

### **3.1. Genotypisierung der Knockout- und transgenen Mausstämme**

#### **3.1.1. Präparation genomischer DNA aus Mausschwänzen**

Etwa 0,5cm lange kupierte Schwanzstücke wurden mit 100µl Ohrlochpuffer (2.6.1.) und 12µl Proteinase K-Lösung (2.6.1.) versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 37°C bzw. für 3h bei 55°C geschüttelt. Danach wurden die Proben kurz anzentrifugiert und durch weitere 10 min auf dem Schüttler bei 95°C die Proteinase denaturiert. Nach kurzer Lagerung auf Eis und nochmaligem Anzentrifugieren wurde zu den Proben 965µl TE-Puffer (2.6.1) und 35µl RNase A (2.2) gegeben und die Proben entweder zur sofortigen Genotypisierung verwendet oder bei -20°C eingefroren.

#### **3.1.2. Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; modifiziert nach Mullis und Faloona, 1987) ist eine Methode zur Amplifizierung eines definierten DNA-Abschnitts. Es werden dabei neben der Zielsequenz, dem sogenannten *Template*, zwei Primer (2.1) mit einer Länge von ca. 20-30 Nukleotiden benötigt, die komplementär zu den 3'-Enden des Templates sind und somit den zu amplifizierenden Bereich eingrenzen. Die Gradienten-PCR dient dazu, zunächst den Temperaturbereich zu identifizieren, in dem sich die Primer am besten an den Genabschnitt anlagern, sie variiert mit jedem Primer. Der Zyklus zur Amplifizierung beginnt mit der Auftrennung und Denaturierung der DNA-Doppelstränge. Dafür wurde als erstes die DNA bei 94°C internalisiert (Trennung der DNA-Doppelstränge) und anschließend bei 94°C denaturiert. Dann wurden die Primer bei 50-64°C am Anfang und Ende des zu amplifizierenden Genabschnittes in der *Annealing*-Reaktion gebunden und anschließend bei 72°C neue DNA synthetisiert. Für die Synthese wurde die thermostabile DNA-Polymerase (2.2) verwendet. Dieser dreiphasische Zyklus führte zu einer neu synthetisierten doppelsträngigen DNA der gewünschten Sequenz. Zur Amplifizierung wurde der Zyklus bis zu 35-mal durchlaufen. Jeder Zyklus resultiert in einer Verdoppelung der Zielsequenz, so dass diese exponentiell amplifiziert wird und durch Ethidiumbromidfärbung im Agarosegel (2.6.2) sichtbar und isolierbar gemacht werden kann.

Ansatz für eine Probe:

- 1,8 µl Primer 1
- 1,8 µl Primer 2
- 2,4 µl dNTP-Mix
- 4,5 µl PCR-Puffer
- 1,8 µl MgCl
- 0,25 µl Taq-Polymerase
- 2 µl DNA-Probe
- x µl H<sub>2</sub>O bidest, Endvolumen 45,0µl

Zyklusparameter:

- 1) 180s      94°C
- 2) 30s        94°C
- 3) 30s        60-63°C
- 4) 30-61s    72°C

Anzahl der Zyklen von Schritt 2) bis 4): 32-35

Da die verwendeten Enzyme temperaturinstabil sind, wurde auf Eis pipettiert. Das Programm *hot start* wurde vor Verwendung zum Vorwärmen der Maschine gestartet und die Proben für ca. 2 Stunden in die PCR-Maschine (2.9) gestellt. Nach Abkühlung des PCR-Gemisches wurden 10µl der Proben elektrophoretisch auf einem Agarosegel (2.6.2) aufgetrennt, um den Genotyp der Tiere nachzuweisen.

### 3.1.3. Die Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine simple und effektive Methode, um DNA-Fragmente einer Länge von 0,5–25kb zu trennen, zu identifizieren und zu reinigen. Ein Gel (2.6.2) wird in einer Konzentration für das entsprechende Fragment, das aufgetrennt werden soll, vorbereitet. Für Fragmente einer Länge bis zu 500bp werden Gele einer Konzentration von 1% verwendet, für Fragmente über 500bp eine Konzentration von 2%. Der Ansatz (2.6.2) wurde in der Mikrowelle bei 750W für ca. zwei bis fünf Minuten erhitzt. Für eine Agarosegel-Elektrophorese wurden 30ml flüssiges Agarosegel mit 6µl Ethidiumbromid (2.3) Laufpuffer gemischt. 10µl DNA-Probe wurden mit 10µl Laufpuffer vermischt und in die Kammern des Agarosegels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Ladung von 100V und 20mA für 15 bis 20min, die eine optimale Trennung garantiert. Das Ethidiumbromid im Agarosegel erlaubte die Detektion der DNA-Moleküle mit der Geldokumentationsanlage (2.9) im Anschluss an den Gellauf.



### **3.2. Gewinnung der Blutproben und Analyse des Blutbildes**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und das Blut mittels kardialer Punktion am geöffneten Thorax gewonnen. Im unter 4.3.4 beschriebenen Versuch, bei dem zusätzlich invasive hämodynamische Messungen vorgenommen wurden, wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert, intubiert und mit einer Mischung aus Raumluft, Sauerstoff und 2 - 2,5% Isofluran mittels eines Beatmungsgeräts für Nagetiere (2.9) ventiliert. Unter Narkose wurden die Tiere schließlich durch kardiale Punktion exsanguiniert. Ca. 200µl Blut wurden mit 1 bis 3µl EDTA zur Antikoagulation vermischt und mit dem ABC Animal Blood Counter (2.9) analysiert.

### **3.3. Knochenmarkscharakterisierung mittels Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zum Nachweis bzw. zur Darstellung und Quantifizierung von Zellen oder Mikropartikeln. Neben vielen verschiedenen Bereichen der Forschung findet sie vor allem als Standardmethode zur Charakterisierung von Knochenmarkszellen Anwendung. Auch in der Klinik wird die Durchflusszytometrie routinemäßig zum Nachweis von Leukämiezellen verwendet. Die nachzuweisenden Zellen bzw. Mikropartikel werden in Flüssigkeit suspendiert, der Flüssigkeitsstrom wird durch einen Laserstrahl und an einem elektronischen Messapparat vorbeigeleitet und die Partikel nach physikalischen bzw. chemischen Parametern registriert. Zum einen können die Zellen nach *forward scatter* (FSC), das die ungefähre Größe angibt, und Zellkomplexität oder Granulierung *side scatter* (SSC), zum anderen nach Fluoreszenz abgebildet werden. Dazu werden die Zellen mit spezifischen Oberflächenantikörpern inkubiert, an die Fluoreszenzmarker gekoppelt sind. Es gibt verschiedene Fluoreszenzfarben (grün: FITC (Fluorescein), orange: PE (Phycoerythrin), rot: PerCP (Peridinin chlorophyll protein) u.a.), sodass mehrere Oberflächenmarker gleichzeitig dargestellt werden können. Die Darstellung kann eindimensional als Histogramm oder zweidimensional als *dot plot* erfolgen, in diesem Fall werden die Zellen nach zwei Parametern dargestellt. Zusätzlich kann eine weitere Auswertung durch sogenanntes *Gating* vorgenommen werden, durch die bestimmte Gruppen der analysierten Zellen ausgeschlossen werden. Dies kann anhand morphologischer Parameter oder der Intensität der Fluoreszenz erfolgen.

### **3.3.1. Gewinnung der Knochenmarkszellen**

Die Knochenmarkszellen wurden aus dem Femur der Mäuse gewonnen. Dazu wurden beide Enden des Femurs mit einem Skalpell abgetrennt und das Innere des Knochens mit einer 5ml Spritze mit 4 bis 5ml RPMI-Lösung (2.6.1) von beiden Enden durchgespült. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb gegeben, um Knochenteile zu entfernen. Dann wurden die Zellen mit 1300rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Anschließend wurde eine einminütige Lyse der Erythrozyten mit 1ml RCLB (2.6.1) durchgeführt, die mit 20ml PBS-Puffer (2.6.1) gestoppt wurde. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 1300rpm und Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in 5ml PBS aufgenommen und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Diese erfolgte mittels einer 1:50 Verdünnung und Anfärbung mit Tryphanblau in einer Neubauer Zählkammer.

### **3.3.2. Färbung der Knochenmarkszellen**

Ca.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in ein 1,5ml Eppendorf-Cup gegeben. 0,2 $\mu$ l der jeweiligen Antikörper wurden in 20 $\mu$ l FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS, 2mM EDTA, 0,1% NaN<sub>3</sub>) gelöst und zu den Zellen gegeben. Es wurden Fluorescein isothiocyanate (FITC)-, Phycoerythrin (PE)- und Peridinin chlorophyll protein (PerCP)-gekoppelte Antikörper (2.5) verwendet. Nach 20minütiger Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen in 250 $\mu$ l FACS-Puffer (2.6.1) resuspendiert.

### **3.3.3. Durchflusszytometrie und Auswertung**

Die Durchflusszytometrie wurde mit einem FACSCalibur-Gerät durchgeführt und mithilfe der Software CellQuest Pro ausgewertet.

## **3.4. 10-Tage-Infusion von AngII und pharmakologische Rezeptorblockade mittels osmotischer Minipumpen**

Es wurden mit AngII (2.4) in Kochsalzlösung befüllte osmotische Minipumpen implantiert, die mit einer Rate von 0,5 $\mu$ l pro Stunde insgesamt 0,6mg AngII/kg pro Tag infundierten. Eine Kontrollgruppe erhielt nur mit Kochsalz befüllte Minipumpen. PD123.319 (2.4) wurde mit einer Konzentration von 10mg/kg pro Tag, A779 (2.4) mit einer Konzentration von 0,2mg/kg pro Tag verabreicht. Irbesartan (2.4) wurde über das Trinkwasser verabreicht, da es nur in Lauge gelöst werden kann, dazu wurden 10mg Irbesartan in 240 $\mu$ l 0,12molarer KOH-Lösung gelöst und so mit Wasser verdünnt, dass die Mäuse bei normaler Trinkmenge durchschnittlich

50mg/kg pro Tag zu sich nehmen. Dabei war ausgeschlossen worden, dass die entsprechende Menge an verdünnter KOH-Lösung alleine Einflüsse auf das Blutbild ausübt.

Die Mäuse wurden mit intraperitonealer Injektion von 80mg/kg Ketamin und 10mg/kg Xylazin ([http://med.stanford.edu/compmed/animal\\_care/mice.html](http://med.stanford.edu/compmed/animal_care/mice.html)) narkotisiert und die Minipumpen durch einen kleinen Schnitt in die Flanke der Tiere in das subkutane Gewebe geschoben. Der Schnitt wurde anschließend wieder vernäht.

10 Tage nach Implantation wurden die Tiere gewogen und nach in Kapitel 3.2 erläuterte Methode getötet und das Blut entnommen, des Weiteren wurden Herz, Nieren und Milz entnommen und deren Gewicht bestimmt. Zur durchflusszytometrischen Analyse der Knochenmarkszellen wurde ein Femur entnommen (genauer in 3.3 beschrieben).

### **3.5. Ang-(1-7)-Injektion in Wildtypen, Mas-Knockout-Tieren und bei induziertem Myokardinfarkt**

Die Versuchsreihe der myokardial infarzierten Tieren mit Ang-(1-7)-Injektion wurde durch Dr. Yong Wang durchgeführt und in *Circulation: Heart Failure*, 2010 beschrieben (Wang et al., 2010). In einer Gruppe wurde durch Ligatur des Ramus interventrikularis anterior ein Myokardinfarkt ausgelöst, die Kontrollgruppe wurde entsprechend der Myokardinfarktgruppe thorakotomiert, die Koronararterie wurde jedoch nicht ligiert. Zwei Tage nach Operation der Tiere wurde mit einer täglichen subkutanen Injektion von 50µg Ang-(1-7) pro Maus bzw. isotoner Kochsalzlösung für die Kontrollgruppe begonnen und für 21 Tage fortgeführt. Nach drei Wochen wurden unter Inhalationsnarkose hämodynamische Messungen an den Tieren durchgeführt, danach erfolgte die Blutentnahme durch kardiale Punktion. Bei der 21-tägigen Versuchsreihe der Ang-(1-7)-Injektionen in Wildtypen und Mas-Knockout-Mäusen wurden ebenfalls täglich 50µg Ang-(1-7) pro Maus subkutan injiziert.

### **3.6. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten und Erstellung der Graphen wurde mit dem Programm *GraphPad Prism* (Version 4.00 für Windows; Graph Pad Software Inc., San Diego, California, USA) durchgeführt. Da es sich um ein amerikanisches Programm handelt, werden die Dezimalstellen mit einem Punkt anstatt mit einem Komma angegeben. Zum Vergleich einzelner Gruppen gegen die Kontrollgruppe wurde der *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben verwendet. Für die Bewertung mehrerer Gruppen untereinander

und gegen die Kontrollgruppe wurde ein *One-way ANOVA* in Verbindung mit *Bonferroni's multiple comparison test* durchgeführt. Die Ergebnisse der Messreihen wurden als Mittelwerte (MEAN)  $\pm$  Standardabweichung (S.E.M.) angegeben. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  wurde als signifikant bezeichnet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Basale Blutbildcharakterisierung in Mäusen mit Defizienz bzw. Überexprimierung einzelner Renin-Angiotensin-System-Komponenten**

Ziel der ersten Untersuchungen war es, eine basale Charakterisierung des Blutbildes, d.h. der Erythrozyten, Leukozyten (einschließlich der Untergliederung in Lympho- Granulo- und Monozyten) und Thrombozyten, in Tieren mit genetischer Defizienz bzw. Überexpression einzelner Bestandteile des RAS durchzuführen. So wurde zunächst anhand von Agt-defizienten Tieren untersucht, wie sich das Blutbild bei völliger Ausschaltung des RAS darstellt. Agt-defiziente Mäuse weisen einen vollständigen Verlust von AngII im Plasma auf und sind aufgrund des ausfallenden vasokonstriktiven Teils des RAS hypotensiv (Tanimoto *et al.*, 1994). In der Literatur ist bisher vor allem AngII und seine Wirkung auf die Hämatopoese beschrieben worden, dabei wurde hauptsächlich postuliert, dass die Effekte von AngII über den AT1-Rezeptor hervorgerufen werden (Kato *et al.*, 2005). So sollte in dieser Arbeit als Nächstes geprüft werden, wie sich durch Ausschalten einzelner AngII-Rezeptoren das Blutbild verändert und ob diese Beobachtungen mit anderen, vor allem pharmakologischen Forschungsergebnissen übereinstimmen. Zusätzlich galt es zu untersuchen, ob eine Defizienz aller AngII-Rezeptoren zu den gleichen Ergebnissen führt wie die Defizienz von Agt. Damit sollte gezeigt werden, ob AngII als einziges Peptid des RAS Einfluss auf die Hämatopoese nimmt oder ob möglicherweise andere Mediatoren ebenfalls über AngII-Rezeptoren beteiligt sein bzw. die Rezeptoren ligandenunabhängig die Hämatopoese beeinflussen können. Für diese Versuchsreihe wurden alle möglichen Kombinationen von AT1a/AT1b/AT2-Doppel-Knockout-Mäusen und die Dreifach(Triple)-Knockout-Mäuse, die keinen der drei AngII-Rezeptoren mehr besitzen, verwendet und mit den Wildtypen verglichen (die Tiere wurden in Kapitel 1.3.2 beschrieben). Die dritte Blutbildcharakterisierung wurde mit Agt-überexprimierenden Mäusen durchgeführt. Die Mauslinie TGM(rAOPEN)123 ist transgen für Ratten-Agt. Bei diesen Tieren führt die Überexpression von Agt durch einen etwa dreifach erhöhten Plasmaspiegel von AngII zu Bluthochdruck und starken kardiovaskulären Veränderungen (Kimura *et al.*, 1992). Mit diesem Modell sollte überprüft werden, ob die Ergebnisse der Agt-defizienten Tiere sich auch bei einer Agt-Überproduktion in entsprechend umgekehrter Weise darstellen lassen.

### 4.1.1. Blutbilder Angiotensinogen-defizienter Tiere

#### 4.1.1.1. Charakterisierung von Erythrozyten

Die Defizienz von *Agt* zeigte massive Effekte auf die Erythrozytenzahl. Der Hämatokrit war bei Knockout-Tieren signifikant um 36% gegenüber den Wildtypen erniedrigt ( $p < 0,001$ ; Abb. 4 B), gleiche Effekte ließen sich auch bei Erythrozytenzahl und Hämoglobin nachweisen (Abb. 4 A und C). Zusätzlich konnte man bei unveränderten Werten von Mean corpuscular volume (MCV), Mean corpuscular haemoglobin (MCH) und Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) auf eine normochrome, normozytäre Anämie schließen, die eine grundlegende Störung der Stimulation der Erythropoese vermuten ließ (Abb. 4 D-F).

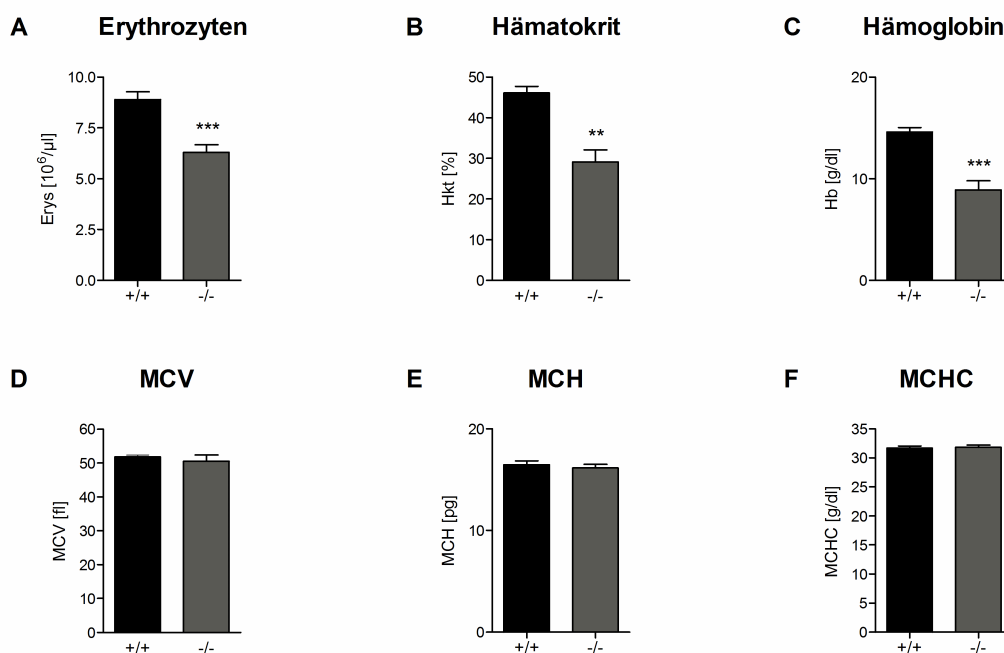


Abb. 4: *Quantitative Bestimmung von Erythrozytenzahl (A), Hämatokrit (B) und Hämoglobin (C), Mean corpuscular volume (MCV, D), Mean corpuscular haemoglobin (MCH, E) und Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC, F) im Blut von Wildtypen (+/+) und Agt-Knockout-Mäusen (-/-). Erys = Erythrozyten, Hkt = Hämatokrit, Hb = Hämoglobin. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Wildtyp. +/+ N=5, -/- N=6.*

#### 4.1.1.2. Charakterisierung von Leukozyten

Die Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen im peripheren Blut war in Knockout-Mäusen tendenziell erhöht. Signifikant war dieser Anstieg jedoch nur bei den Monozyten (Abb. 5 C); aufgrund der sehr niedrigen Gesamtzahl der Monozyten wirkte sich dies jedoch nicht auf das prozentuale Verhältnis der drei gemessenen Gruppen (Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) zueinander aus (Abb. 5 D-F).

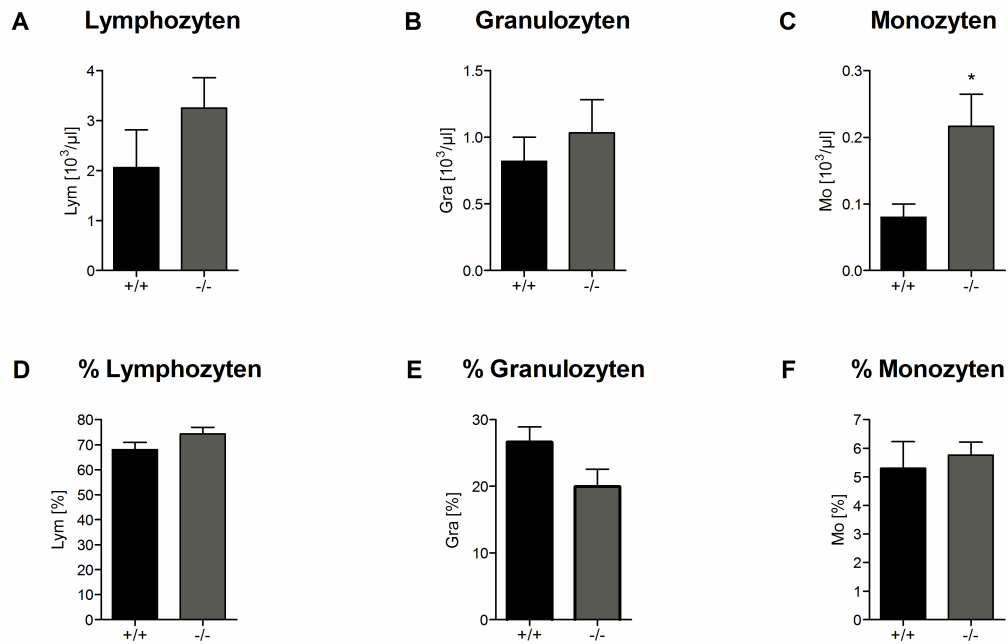


Abb. 5: Quantitative Bestimmung der Lympho- (A), Granulo- (B) und Monozytenzahl (C) und deren jeweiliger prozentualer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl (D bis F) im Blut von Wildtypen (+/+) und Agt-Knockout-Mäusen (-/-). Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. \*  $p < 0,05$ . +/+ N=5, -/- N=6.

#### 4.1.1.3. Quantitative Bestimmung der Thrombozyten

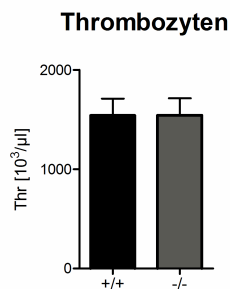


Abb. 6: Thrombozytenzahl im peripheren Blut bei Wildtypen (+/+) und Agt-Knockout-Mäusen (-/-). Thr= Thrombozyten. +/+ N=5, -/- N=6.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass das RAS ebenfalls Einfluss auf die Blutgerinnung nimmt (Silva, 2010). Mit der Blutbildanalyse sollten Anhalte dafür gewonnen werden, ob eine veränderte Thrombozytenzahl ursächlich für die veränderte Gerinnung sein könnte. In Agt-defizienten Tieren zeigte die Thrombozytenzahl keine Veränderungen (Abb. 6).

#### 4.1.2. Blutbilder von Tieren mit Defizienzen im AT1a, AT1b und AT2-Rezeptor

Nachdem sich bei den Agt-defizienten Tieren eine schwere Anämie gezeigt hatte, stellte sich nun zum einen die Frage, ob AngII allein für diesen Effekt verantwortlich ist oder ob andere Metaboliten des RAS dabei eine Rolle spielen könnten. Zum anderen sollte geprüft werden, über welchen AngII-Rezeptor die Wirkungen von AngII vermittelt werden. Die nächste Blutbildcharakterisierung erfolgte also an Mäusen mit Defizienzen in den AngII-Rezeptoren. Die untersuchten Genotypen waren folgende: Wildtyp (++/+/+), AT1b/AT2-Doppel-Knockout (++/-/-), AT1a/AT2-Doppel-Knockout (-/+/-), AT1a/AT1b-Doppel-Knockout (-/-/++) und Triple-Knockout (-/-/-). Doppel-Knockout-Mäuse exprimieren jeweils einen der drei Rezeptoren und eröffnen damit die Möglichkeit, selektiv die Wirkung eines einzelnen Rezeptors zu untersuchen. Triple-Knockout-Tiere besitzen keinen AngII-Rezeptor und sind deshalb ein geeignetes Modell in Ergänzung zu den Agt-defizienten Tieren, um zwischen der direkten Wirkung durch AngII und der Wirkung weiterer Ang-Metabolite zu differenzieren.

##### 4.1.2.1. Charakterisierung von Erythrozyten

Doppel-Knockout-Mäuse, die nur den AT1a oder den AT2-Rezeptor exprimierten, ließen keine Veränderungen der Erythrozytenzahl bzw. des Hämatokrits erkennen (Abb. 7). Die alleinige Expression des AT1b-Rezeptors zeigte eine nicht signifikante Erhöhung ( $p=0,09$ ) der Erythrozytenzahl.

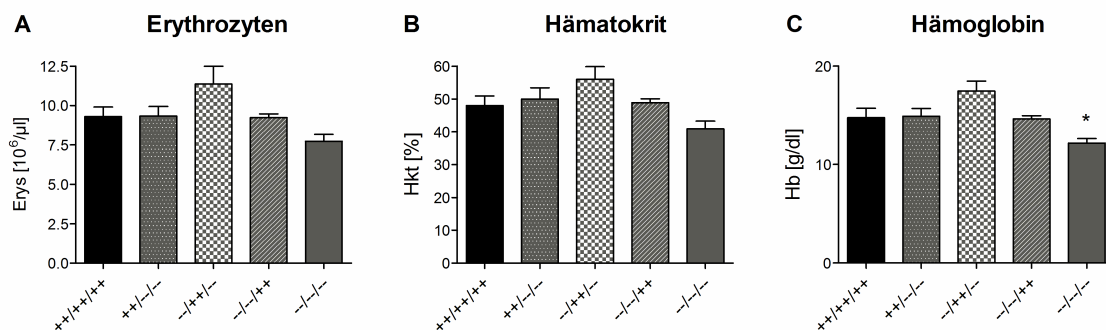


Abb. 7: *Quantitative Bestimmung von Erythrozytenzahl (A), Hämatokrit (B) und Hämoglobin (C) im Blut von Doppel-Knockout- und Triple-Knockout-Mäusen. Erys= Erythrozyten, Hkt= Hämatokrit, Hb= Hämoglobin. \*  $p < 0,05$  vs. (++/+/+). Wildtyp (++/+/+)  $N=13$ , AT1b/AT2-Doppel-Knockout (++/-/-)  $N=11$ , AT1a/AT2-Doppel-Knockout (-/+/-)  $N=5$ , AT1a/AT1b-Doppel-Knockout (-/-/++)  $N=8$ , Triple-Knockout (-/-/-)  $N=11$ .*

Eine AT1-vermittelte Wirkung des AngII auf die Erythrozyten konnte somit nicht eindeutig nachgewiesen werden. Nur die Defizienz aller drei Ang-Rezeptoren führte zu einer Erniedrigung der Erythrozytenzahl und des Hämatokrits um etwa 15%. Im Gegensatz dazu fiel der Hämatokrit in Agt-defizienten Tieren um 36%. Dies lässt eine Beteiligung weiterer



Metaboliten des RAS vermuten, deren Effekte nicht über den AT1 und AT2-Rezeptor mediert werden.

#### 4.1.2.2. Charakterisierung von Leukozyten

In den AT1a/AT1b-Doppel-Knockout-Mäusen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Lymphozyten-, Granulozyten- und Monozytenzahl gegenüber dem Wildtyp (Abb. 8 A-C), das prozentuale Verhältnis untereinander blieb unverändert (Abb. 8 D-F). Dieser Effekt könnte sowohl durch die wegfallende inhibierende Wirkung der AT1-Rezeptoren als auch durch die vermehrte Stimulation des AT2-Rezeptors zustande kommen. Tiere, die nur noch den AT1b-Rezeptor exprimierten, zeigten einen signifikanten prozentualen Anstieg der Granulozytenzahl und eine gleichzeitige signifikante Erniedrigung des prozentualen Anteils der Lymphozyten im Vergleich zum Wildtyp bei Erniedrigung der absoluten Leukozytenzahl ( $p=0,091$ , Abb. 7 A-E). Triple-Knockout-Tiere zeigten keine Veränderungen der weißen Blutzellen im Vergleich zum Wildtyp.

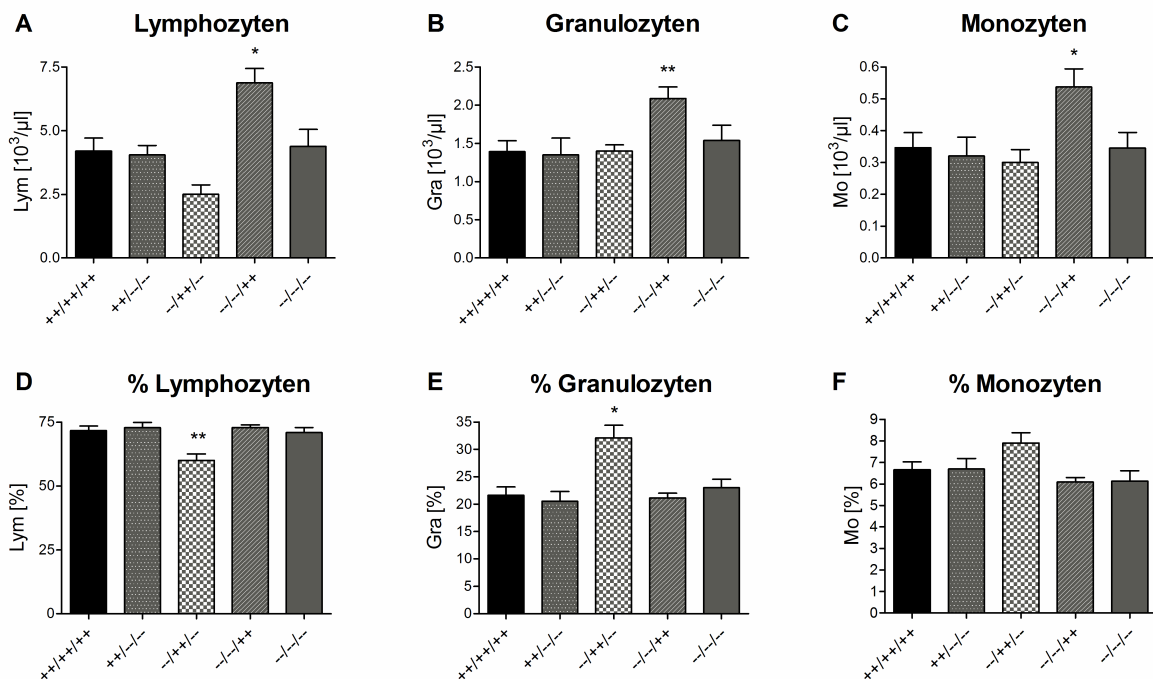


Abb. 8: Absolute Anzahl der Lymphozyten (A), Granulozyten (B) und Monozyten (C) im Blut von Doppel-Knockout- und Triple-Knockout-Mäusen. D-F: Prozentualer Anteil der drei Untergruppen an der Gesamt-Leukozytenzahl. Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs. Wildtyp. Wildtyp (++++/+++) $N=13$ , AT1b/AT2-Doppel-Knockout (++/-/-) $N=11$ , AT1a/AT2-Doppel-Knockout (-/+ +/ -) $N=5$ , AT1a/AT1b-Doppel-Knockout (-/-/+ +) $N=8$ , Triple-Knockout (-/-/-/-) $N=11$ .

#### 4.1.2.3. Quantitative Bestimmung der Thrombozyten

Wie bei den Agt-Knockout-Mäusen zeigten sich bei den Triple-Knockout-Mäusen keine Veränderungen in der Thrombozytenzahl. Auch bei den AT1a/AT2-Doppel-Knockout-Mäusen gab es keine eindeutigen Tendenzen (Abb. 9).

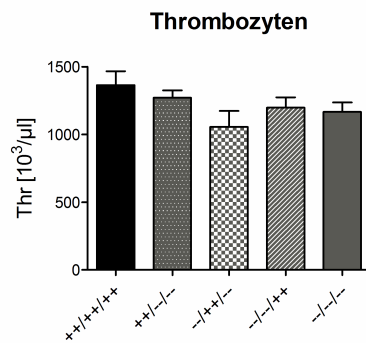


Abb. 9: Quantitative Bestimmung der Thrombozytenzahl in Doppel-Knockout- und Triple-Knockout-Mäusen. Thr= Thrombozyten. Wildtyp (+/++/+++)  
N=13, AT1b/AT2-Doppel-Knockout (+/+/-/-) N=11, AT1a/AT2-Doppel-Knockout (-/++/+-) N=5, AT1a/AT1b-Doppel-Knockout (-/-/+/) N=8, Triple-Knockout (-/-/-/-) N=11.

#### 4.1.3. Blutbilder von Tieren mit Überexprimierung von Angiotensinogen

Nachdem bei der Blutbildcharakterisierung Agt-defizienter Tiere eine ausgeprägte Anämie zu sehen war, sollte nun geprüft werden, ob in Tieren, die dauerhaft zuviel Agt produzieren, auch umgekehrt eine Erythrozytose beobachtet werden kann.

##### 4.1.3.1. Charakterisierung von Erythrozyten Angiotensinogen-überexprimierender Tiere

Eine Erythrozytose konnte in den Agt-überexprimierenden Tieren nicht nachgewiesen werden. Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobin zeigten keine signifikanten Veränderungen (Abb. 10 A-C), auch die Erythrozytenmorphologie blieb unverändert (Abb. 10 D-F).

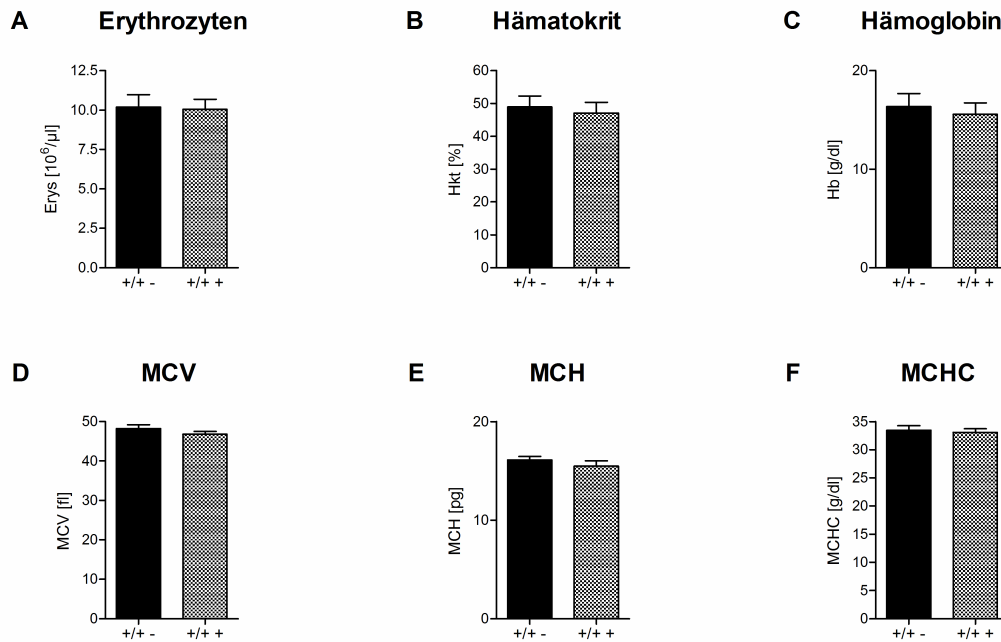


Abb. 10: Quantitative Bestimmung von Erythrozyten (A), Hämatokrit (B) und Hämoglobin (C) und Mean corpuscular volume (MCV), Mean corpuscular haemoglobin (MCH) und Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) (D-F) in TGM(rAOGEN)123-Tieren. Erys= Erythrozyten, Hkt= Hämatokrit, Hb= Hämoglobin. Wildtyp (+/+ -) N=6, AngII-Überexpression (+/+ +) N=6.

#### 4.1.3.2. Charakterisierung von Leukozyten Angiotensinogen-überexprimierender Tiere

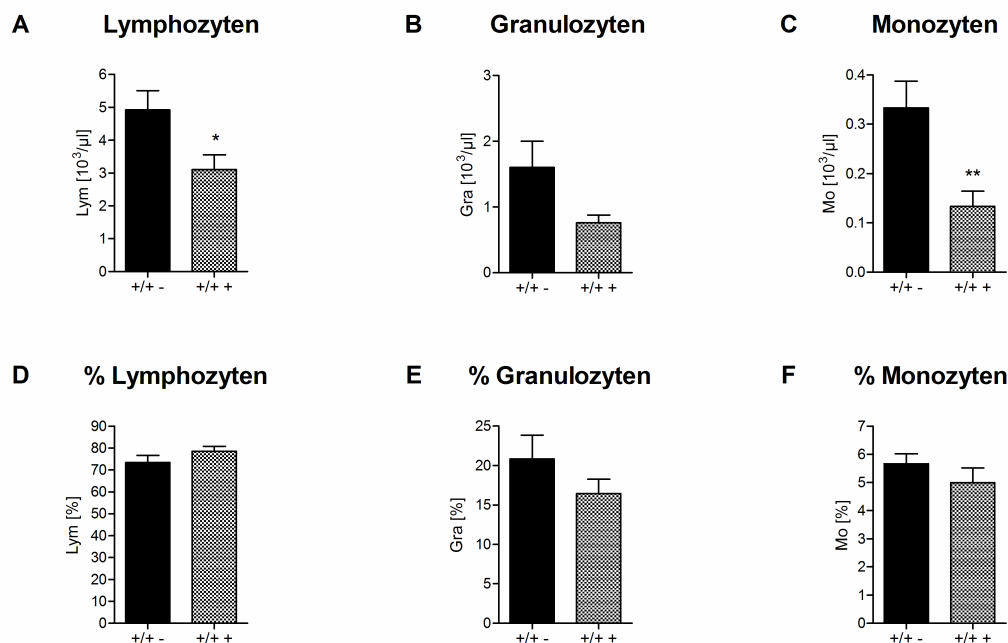


Abb. 11: Absolute Anzahl der Lympho- (A), Granulo- (B) und Monozyten (C) und deren jeweiliger relativer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl (D-F) in Wildtypen und Agt-überexprimierenden Tieren. Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Wildtyp (+/+ -) N=6, AngII-Überexpression (+/+ +) N=6.

Sowohl Lymphozyten als auch Monozyten zeigten in transgenen Tieren einen signifikanten Abfall, die Granulozyten einen Trend ( $p=0,072$ ) zur Erniedrigung im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 11). Das relative Verhältnis der einzelnen Untergruppen der Leukozyten zeigte dabei keine statistisch signifikanten Veränderungen.

#### 4.1.3.3. Quantitative Bestimmung der Thrombozyten Angiotensinogen-überexprimierender Tiere

Agt-Überexpression führte zu keiner Veränderung der Thrombozytenzahl im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 12).

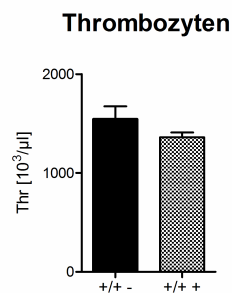


Abb. 12: Thrombozytenzahl in Agt-überexprimierenden Tieren (+/+ +) im Vergleich zu Wildtypen (+/+ -). Thr= Thrombozyten. N=6 in beiden Gruppen.

## 4.2. 10-Tage-Infusion von AngII und pharmakologische Rezeptorblockade in wildtypischen Mäusen

Die Ergebnisse der in 4.1. beschriebenen basalen Blutbildcharakterisierungen deuten darauf hin, dass AngII einerseits stimulierend auf die Erythrozytenzahl wirkt, andererseits andere Mediatoren des RAS zusätzlich zu diesem Effekt beitragen. Welcher der drei Ang-Rezeptoren die Wirkung von AngII vermittelt, ist nicht eindeutig. Auf die Leukozytenzahl im Blut scheint AngII über den AT1a-Rezeptor einen hemmenden Einfluss auszuüben. Die bisherigen, in 4.1. beschriebenen Beobachtungen wurden in genetisch manipulierten Modellen, also unter dauerhaft veränderten Bedingungen im RAS nachgewiesen. Diese Tiere haben dabei den Nachteil, dass auch ontogenetische Fehlbildungen und -entwicklungen aufgrund dauerhaft ausfallender Komponenten des RAS eine Rolle spielen können. Deshalb wurde als Nächstes ein pharmakologischer Versuch unternommen, in dem untersucht werden sollte, ob sich die unter langfristigen Bedingungen produzierten Ergebnisse bei einer kurzfristigen Aktivierung des RAS in genetisch unveränderten Wildtypen in gleicher Form nachweisen lassen oder ob bei kurzfristiger Aktivierung des RAS Effekte auftreten, die in genetisch veränderten Tieren aufgrund von langfristigen Gegenregulationen nicht zu beobachten sind. Für eine 10-tägige

kontinuierliche Infusion von AngII wurden Mäusen osmotische Minipumpen implantiert. Der Kontrollgruppe wurden Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung implantiert. Weitere drei Gruppen erhielten AngII und den AT1-Blocker Irbesartan, AngII zusammen mit dem AT2-Blocker PD123.319, oder AngII zusammen mit dem Mas-Antagonisten A779. Als entsprechende Kontrollgruppen wurden jeweils die drei eben genannten Rezeptorblocker alleine verabreicht.

#### **4.2.1. Organveränderungen nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder pharmakologischer Rezeptorblockade in wildtypischen Mäusen**

Nach 10-tägiger Behandlung zeigten sich im Körpergewicht keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 13 A und Abb. 14 A). Wildtypen mit AngII-Behandlung zeigten ein signifikant erhöhtes Herzgewicht- Körpergewicht-Verhältnis, das bei unverändertem Körpergewicht auf eine kardiale Hypertrophie schließen ließ (Abb. 13 A und B). Da sich diese Hypertrophie mit der Literatur deckt, diente dieser Befund auch als Bestätigung für eine effektive Dosierung von AngII (Harada *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 2000). Mäuse, die nur mit Rezeptorblockern behandelt wurden, zeigten keine Veränderungen des Herzgewichts mit Ausnahme der AT2-Blockade. Diese Gruppe wies im Student t-Test ein ebenfalls signifikant erhöhtes Herzgewicht- Körpergewicht-Verhältnis im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ( $p=0,047$ ) und unterschied sich nicht signifikant von der AngII-Gruppe. Von einer Verminderung der durch AngII induzierten kardialen Hypertrophie durch zusätzliche AT1-Blockade konnte ausgegangen werden, da das Herz-Körpergewicht-Verhältnis dieser Versuchsgruppe verglichen mit der AngII-Gruppe im Student t-Test signifikant geringer war ( $p=0,031$ ). AT2-Blockade führte hingegen nicht zu einer Reduktion der durch AngII stimulierten Hypertrophie (Abb. 13 B). Auch bei zusätzlicher Mas-Blockade mit AngII zeigte sich eine signifikante Steigerung des Herzgewichts (Abb. 14 B).

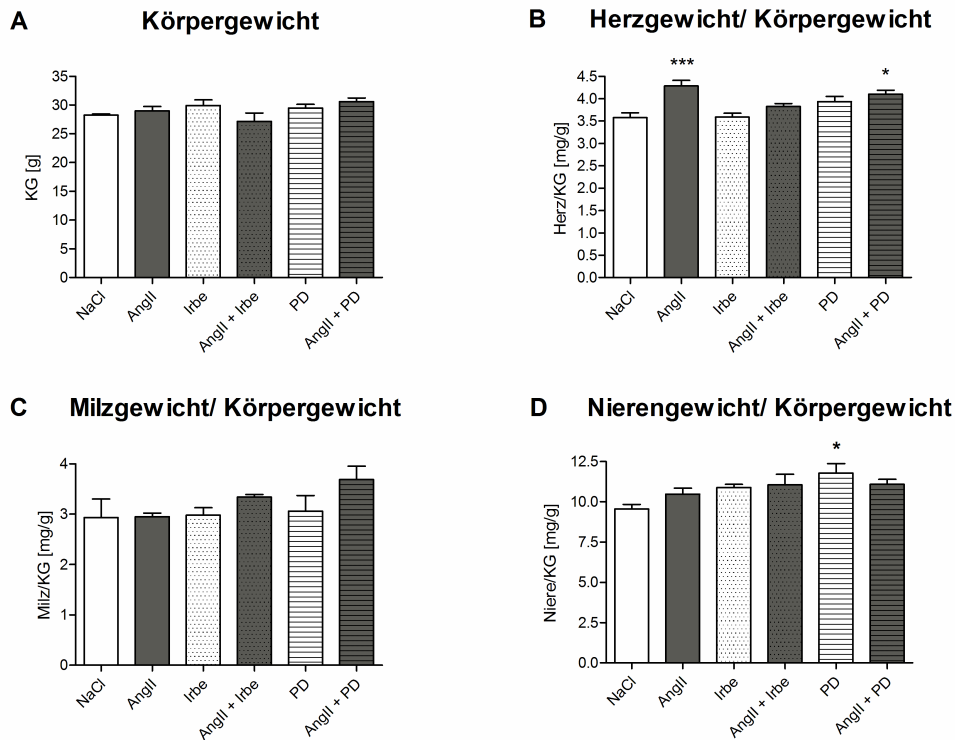


Abb. 13: Körpergewicht (A), Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (B), Milzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (C), Nierengewicht-Körpergewicht-Verhältnis (D) jeweils nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder AT1-/ AT2-Blockade. KG= Körpergewicht, Herz= Herzgewicht, Milz= Milzgewicht, Niere= Nierengewicht, NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, PD= PD123.319. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. NaCl. N=5 in allen Gruppen.

Das Milzgewicht, bezogen auf das Körpergewicht, erhöhte sich nicht bei alleiniger AngII-Gabe, jedoch bei kombinierter Gabe von AngII mit dem AT1- und AT2-Blocker (nicht signifikant im One-way ANOVA-Test, jedoch signifikant gegenüber AngII im Student t-Test, Abb. 13 C). AngII-Infusion führte zu keiner signifikanten Veränderung des Nierengewicht-Körpergewicht-Verhältnisses. Bei alleiniger AT1- und AT2-Blockade nahm das Nierengewicht zu (bei Irbesartan signifikant im Student t-Test, bei PD123.319 auch signifikant im One-way ANOVA mit Bonferroni). Es zeigte sich jedoch keine Steigerung dieses Effektes bei zusätzlicher AngII-Infusion, vielmehr blieb das Nierengewicht unverändert zur Kontrollgruppe (Abb. 13 D). Mas-Antagonisierung alleine hatte keinen Effekt, führte jedoch zusammen mit AngII ebenfalls zu einer Erhöhung des Nierengewichts (Abb. 14 D).

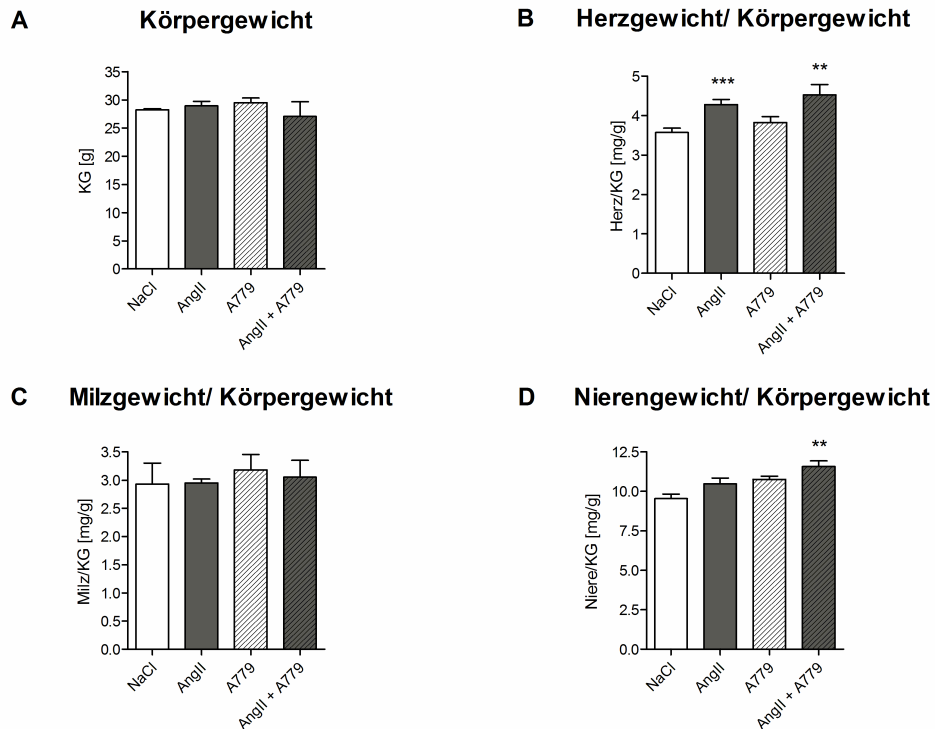


Abb. 14: Körpergewicht (A), Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (B), Milzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (C), Nierengewicht-Körpergewicht-Verhältnis (D) jeweils nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder Mas-Rezeptorblockade durch A779. KG= Körpergewicht, Herz= Herzgewicht, Milz= Milzgewicht, Niere= Nierengewicht, NaCl= 0,9% Kochsalzlösung. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. NaCl.  $N=5$  in allen Gruppen.

#### 4.2.2. Blutbildcharakterisierung nach 10-tägiger AngII-Infusion und/ oder pharmakologischer Rezeptorblockade in wildtypischen Mäusen

##### 4.2.2.1. Charakterisierung von Erythrozyten

Die 10-tägige Behandlung mit AngII bewirkte eine signifikante Erhöhung der Erythrozytenzahl von  $7,9 \times 10^6 \pm 0,09$  auf  $9,5 \times 10^6 \pm 0,19$  Zellen pro  $\mu\text{l}$  ( $p < 0,001$ , Abb. 15 A). Dieser Effekt war klar AT1-vermittelt, da es bei gleichzeitiger Irbesartan-Gabe zu keiner Erythrozytose kam ( $8,4 \times 10^6 \pm 0,34$  Zellen pro  $\mu\text{l}$ ), bei gleichzeitiger Blockierung des AT2-Rezeptors dagegen die Zahl der Erythrozyten im gleichen Maße wie bei alleiniger AngII-Gabe stieg. Hämoglobingehalt und Hämatokrit erhöhten sich im gleichen Verhältnis wie die Erythrozytenzahl (Abb. 15 B und C).

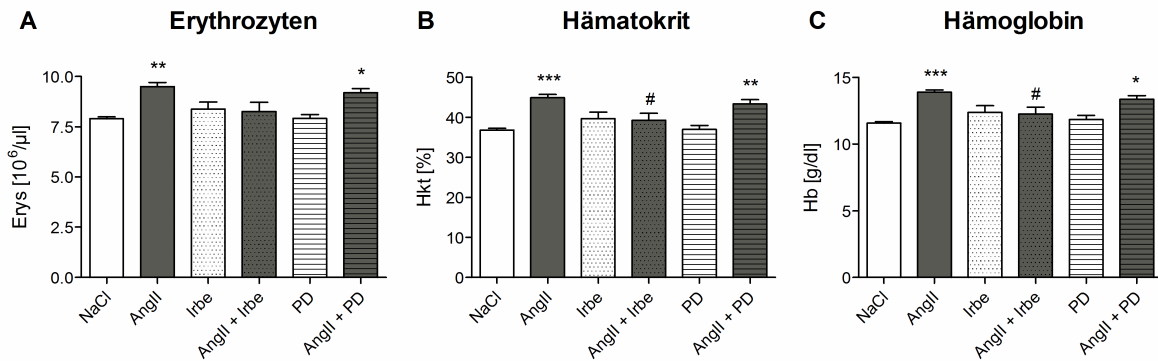


Abb. 15: Erythrozytenzahl (A), Hämatokrit (B) und Hämoglobin (C) nach 10-Tage-Infusion von AngII und/ oder AT1-/ AT2-Rezeptorblockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, PD= PD123.319, Erys= Erythrozyten, Hkt= Hämatokrit, Hb= Hämoglobin. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. NaCl; #  $p < 0,05$  vs. AngII.  $N=5$  in allen Gruppen.

Eine Infusion von A779 löste, verglichen zur NaCl-Kontrollgruppe, ebenfalls eine im Student t-Test signifikante Steigerung von Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobin aus. Die Kombination von A779 mit AngII zeigte jedoch im Vergleich zur alleinigen Gabe von AngII keine additive Steigerung der Erythrozytenzahl (Abb. 16 A-C).

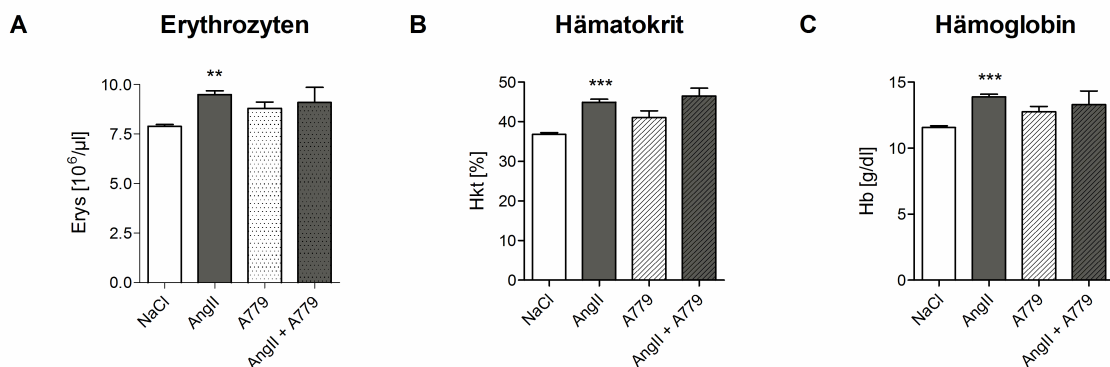


Abb. 16: Erythrozytenzahl (A), Hämatokrit (B) und Hämoglobin (C) nach 10-Tage-Infusion von AngII und/ oder Mas-Rezeptorblockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Erys= Erythrozyten, Hkt= Hämatokrit, Hb= Hämoglobin.  $N=5$  in allen Gruppen.

Größe und Hämoglobingehalt (MCH, MCV, MCHC) der Erythrozyten blieben in allen Fällen unverändert (Abb. 17 A-C).



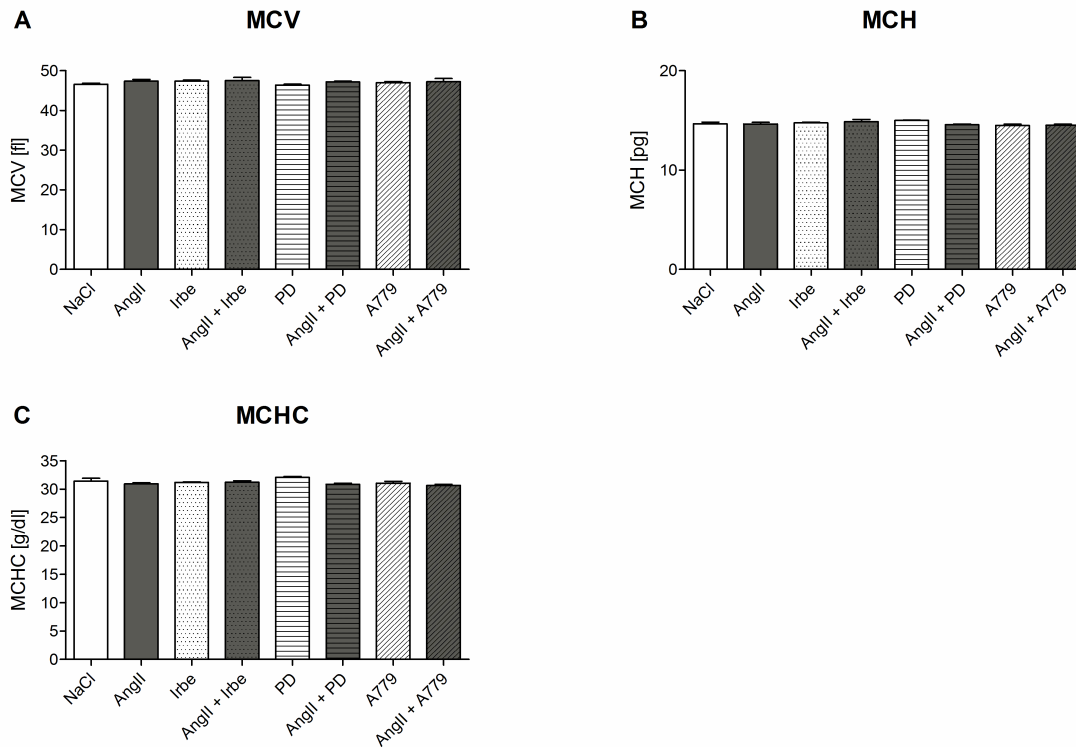


Abb. 17: A: Mean corpuscular volume (MCV), B: Mean corpuscular haemoglobin (MCH) und C: Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder zusätzlicher AT1-/ AT2-Blockade oder Mas-Blockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, PD= PD123.319. N=5 in allen Gruppen.

#### 4.2.2.2. Charakterisierung von Leukozyten

Die Gabe von AngII zeigte im Wildtyp eine Tendenz zur Erhöhung der Granulozytenzahl ( $p=0,08$  im Student t-Test, Abb. 18 A), während weder bei der Lymphozyten- noch bei der Monozytenzahl eine klare Tendenz zu erkennen war. Das relative Verhältnis zwischen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten blieb unverändert (Abb. 18 D-F). Blockierung des AT1- oder AT2- Rezeptors führte zu keiner signifikanten Veränderung der Lympho-, Mono- oder Granulozytenzahl (Abb. 18).

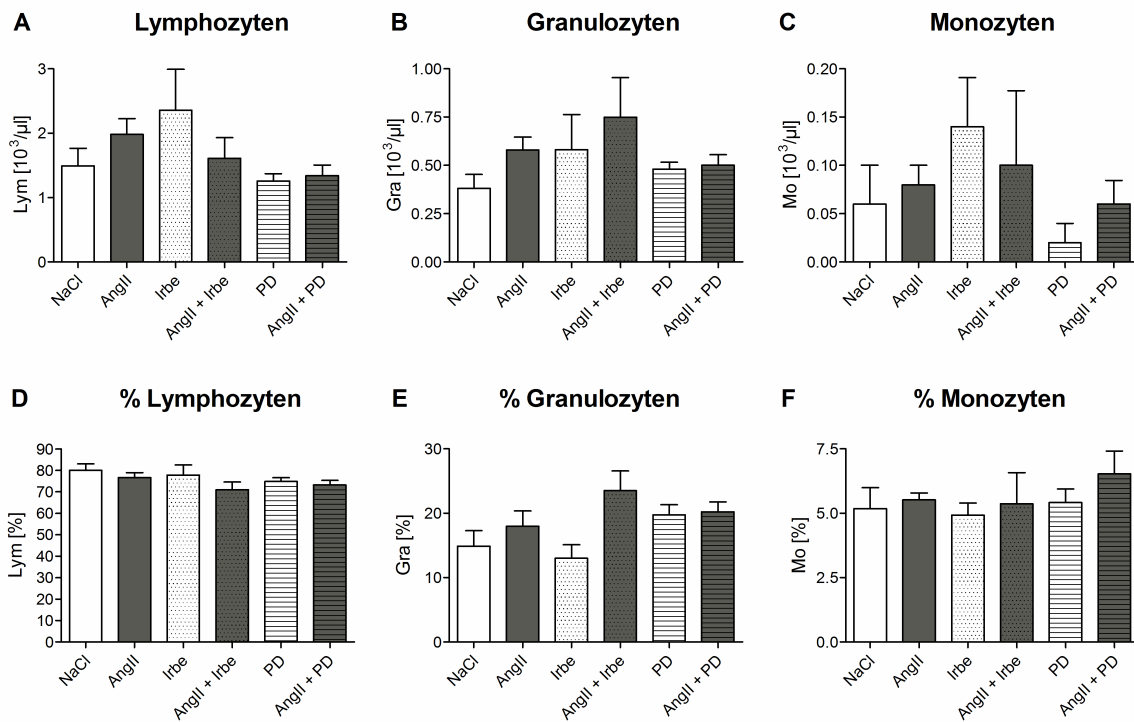


Abb. 18: Differentialblutbild von Wildtyp-Mäusen: Absolute Anzahl der Lympho- (A), Granulo- (B) und Monozyten (C) und deren jeweiliger relativer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl (D-F) nach 10-tägiger AngII-Infusion und/ oder AT1-/ AT2-Rezeptorblockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, PD= PD123.319, Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. Alle Gruppen N=5.

Auch die Blockierung des Mas-Rezeptors mit und ohne AngII führte zu keinen signifikanten Unterschieden oder erkennbaren Trends der Lympho-, Granulo- und Monozytenzahl. Der kaum sichtbare Balken der A779-Gruppe in Abb. 19 C kam durch sehr niedrigen Messungen zustande; so wurden bei drei Tieren jeweils  $0,000 \times 10^3$  Monozyten/ $\mu\text{l}$  und einmal  $0,001 \times 10^3$  Monozyten/ $\mu\text{l}$  gemessen. Diese Gruppe unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Das prozentuale Verhältnis der Leukozytenunterarten zueinander änderte sich nicht (Abb. 19 A-F).

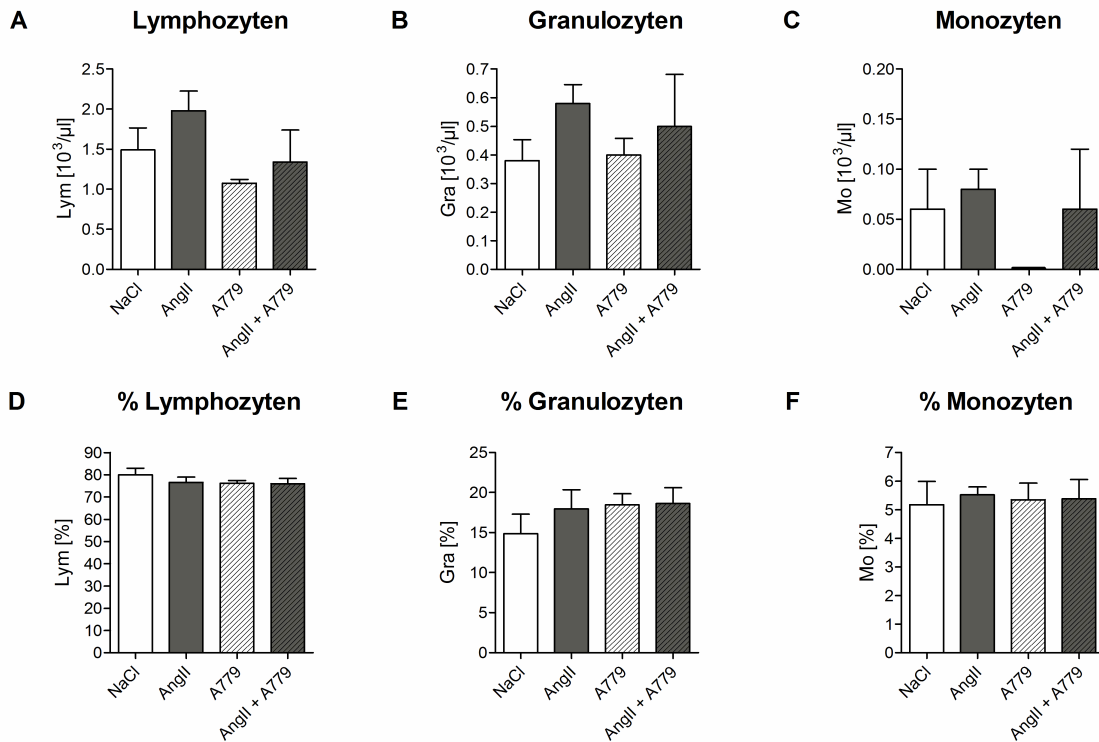


Abb. 19: Differentialblutbild von Wildtyp-Mäusen: Absolute Anzahl der Lympho- (A), Granulo- (B) und Monozyten (C) und deren jeweiliger relativer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl (D-F) nach 10-tägiger AngII-Infusion und/ oder Mas-Blockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. Alle Gruppen N=5 außer der A779-Gruppe mit N=4.

#### 4.2.2.3. Quantitative Bestimmung von Thrombozyten

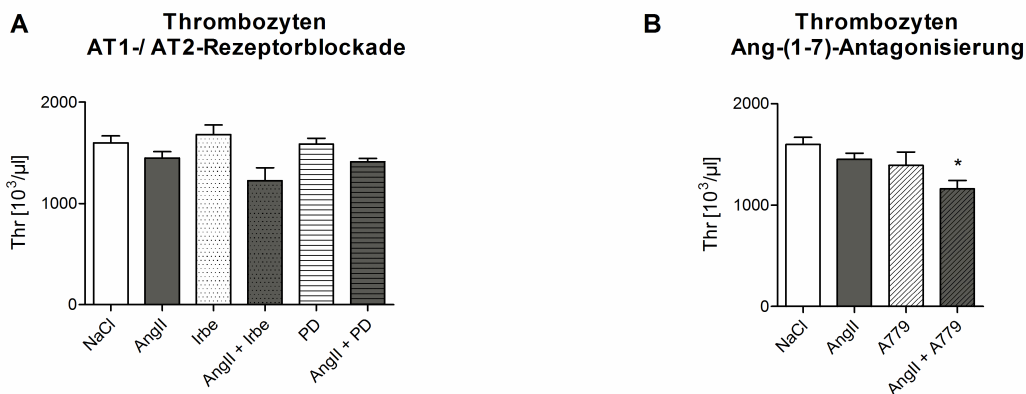


Abb. 20: Thrombozytenzahl im Blut nach 10-Tage-Infusion von AngII und/ oder A: AT1-/ AT2-Rezeptorblockade bzw. B: Mas-Blockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, PD= PD123.319, Thr= Thrombozyten. \*  $p < 0,05$  vs. NaCl; A779-Gruppe N=4, in allen anderen Gruppen N=5.

AngII-Infusion alleine zeigte keinen signifikanten Effekt, führte aber in Kombination mit dem AT1- und AT2-Blocker zu einer im Student t-Test signifikanten Erniedrigung der Thrombozytenzahl (Abb. 20 A). A779, das bei alleiniger Gabe keine Veränderungen

hervorrief, zeigte in Kombination mit AngII eine signifikant erniedrigte Thrombozytenzahl gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 20 B).

#### **4.2.3. FACS-Analyse des Knochenmarks nach 10-tägiger AngII-Infusion und/oder pharmakologischer Rezeptorblockade in wildtypischen Mäusen**

Für die Entstehung der durch AngII-Infusion hervorgerufene Polyglobulie können verschiedene Prozesse verantwortlich sein. Mögliche Mechanismen, die in Betracht gezogen werden müssen, sind zum einen eine gesteigerte Erythropoese durch Proliferationszunahme bzw. eine verminderte Apoptoserate der Vorläuferzellen, zum anderen ein verminderter Abbau der reifen zirkulierenden Erythrozyten. Rodgers *et al.* konnten nachweisen, dass AngII *in vitro* zu einer Proliferationssteigerung hämatopoetischer Stammzellen führt, die durch Losartan blockiert werden kann (Rodgers *et al.*, 2000). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob man *in vivo* einen solchen Effekt ebenfalls beobachten kann. Dafür wurde das Knochenmark der Versuchstiere mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden drei verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen verwendet, um zum einen frühe multipotente Progenitorzellen und zum anderen spätere bzw. determinierte Vorläuferzellen (so genannte *Lineage-restricted progenitors*) der Granulozyten/Makrophagen- (*Granulocyte/macrophage progenitors*, GMP) und der Erythrozyten/Megakaryozyten-Zellreihe (*Megakaryocyte/erythrocyte progenitors*, MEP) darzustellen. Frühe hämatopoetische Progenitorzellen exprimieren die Oberflächenantigene CD117 (c-kit) und Sca-1 und können von differenzierten Vorläuferzellen durch fehlende Expression linienspezifischer Oberflächenmarker unterschieden werden ( $Lin^-$ ) (Morrison *et al.*, 1997). Zum Nachweis der GMP- und MEP-Zelllinien wurden  $IL-7R\alpha^-Lin^-Sca^-$ -Zellpopulationen isoliert, dabei wird der Oberflächenmarker IL-7R $\alpha$  auf allen lymphoiden Zellen exprimiert und erlaubt damit die Trennung der erythromyeloïden Linie von dieser, während die Aussortierung der  $Sca-1^-$  ( $Sca^-$ )-Zellen alle hämatopoetischen Stammzellen ausschließt. Akashi *et al.* zeigten außerdem, dass in murinem Knochenmark erythromyeloïde CFU noch keine linienspezifischen Oberflächenmarker exprimieren. Diese  $IL-7R\alpha^-Lin^-Sca^-$ -Zellpopulationen wurden zusätzlich mit CD34 FITC und Fc $\gamma$ R (CD16/32) PE gefärbt, wobei sich MEP als Fc $\gamma$ R $^{lo}$ CD34 $^-$ , GMP als Fc $\gamma$ R $^{hi}$ CD34 $^+$  darstellen (Akashi *et al.*, 2000).

#### 4.2.3.1. Nachweis früher Progenitorzellen

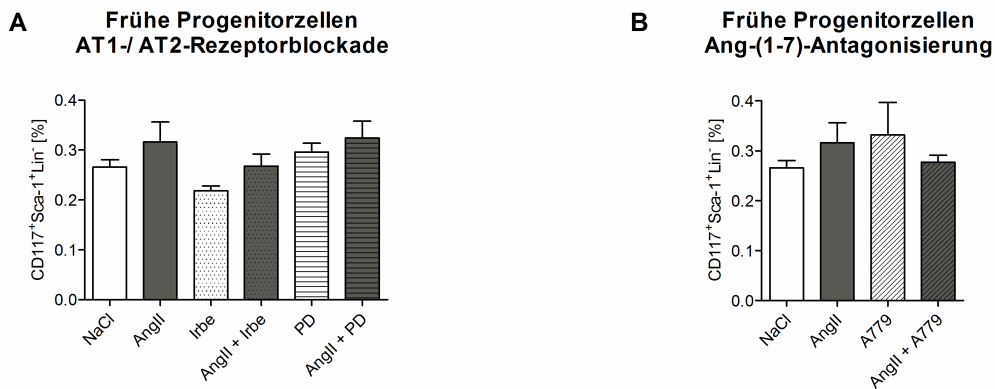


Abb. 21: Charakterisierung des Knochenmarks mittels Durchflusszytometrie nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder A: AT1-/ AT2-Rezeptorblockade bzw. B: Mas-Blockade. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD117<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>-Zellen an der Gesamtzahl der Knochenmarkszellen. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, PD= PD123.319. \*  $p < 0,05$  vs. NaCl.  $N=5$  in allen Gruppen.

Im Knochenmark der Tiere ließ sich nach 10-tägiger AngII-Infusion keine signifikante Steigerung des prozentualen Anteils der frühen Progenitorzellen verzeichnen. Irbesartan führte jedoch bei alleiniger Verabreichung zu einer im Student t-Test signifikanten Verminderung des Anteils an frühen Progenitorzellen, während eine AT2-Blockade keinen Einfluss auf die frühen Progenitorzellen hatte (Abb. 21 A). A779 zeigte keine Effekte, weder bei alleiniger Verabreichung, noch bei gleichzeitiger AngII-Infusion (Abb. 21 B).

#### 4.2.3.2. Nachweis determinierter Vorläuferzellen

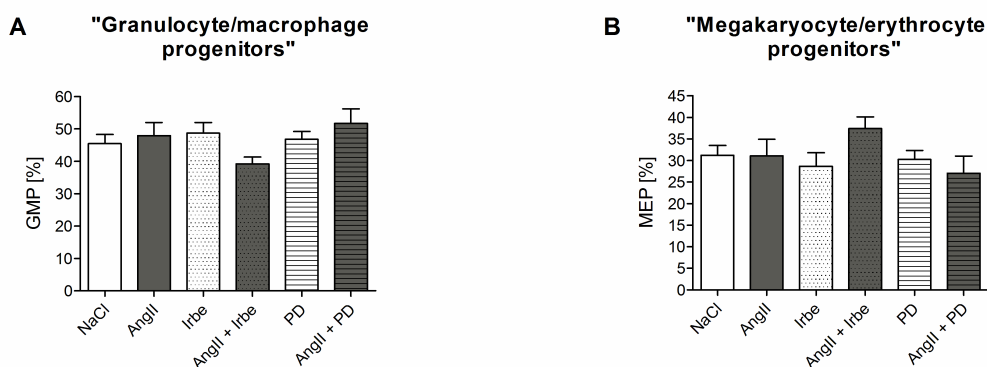


Abb. 22: Darstellung determinierter Vorläuferzellen (Lineage-restricted progenitors) mittels Durchflusszytometrie von Knochenmarkszellen nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder AT1-/ AT2-Rezeptorblockade. A: GMP (Granulocyte/macrophage progenitors) stellen sich als  $Fc\gamma R^{hi}CD34^{+}IL-7R\alpha^{-}Lin^{-}Sca^{-}$  dar; B: MEP (Megakaryocyte/erythrocyte progenitors) stellen sich als  $Fc\gamma R^{lo}CD34^{-}IL-7R\alpha^{-}Lin^{-}Sca^{-}$  dar. Angegeben ist der prozentuale Anteil  $Fc\gamma R^{lo}CD34^{-}$  bzw.  $Fc\gamma R^{hi}CD34^{+}$  an allen  $IL-7R\alpha^{-}Lin^{-}Sca^{-}$  Zellen. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, PD= PD123.319.  $N= 5$  in allen Gruppen.

AngII-Infusion führte zu keinen Veränderungen der prozentualen Anteile der GMP- und MEP-Linie. Die kombinierte Verabreichung von Irbesartan und AngII hatte gegenüber der alleinigen AngII-Infusion eine tendenzielle Erniedrigung des GMP-Anteils zur Folge ( $p=0,09$  im Student t-Test vs. AngII), während der MEP-Anteil sich nicht signifikant erhöhte. Die Kombination von AngII mit dem AT2-Blocker zeigte keine Veränderungen (Abb. 22 A).

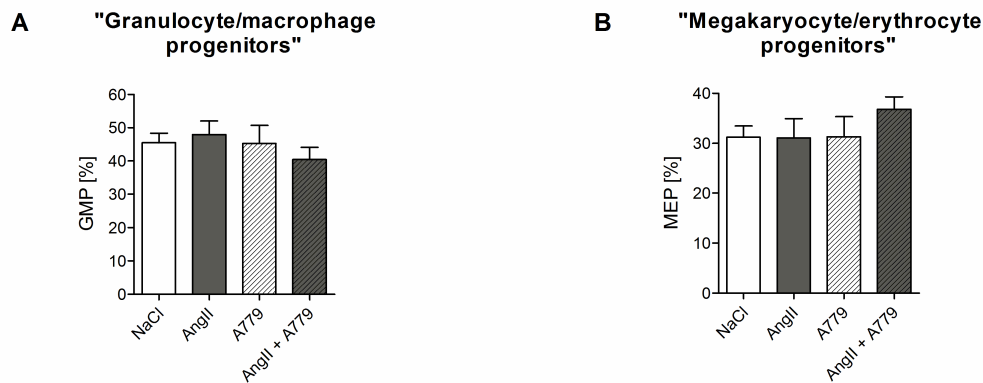


Abb. 23: Darstellung determinierter Vorläuferzellen mittels Durchflusszytometrie von Knochenmarkszellen nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder Mas-Blockade. A: GMP (Granulocyte/macrophage progenitors) stellen sich als  $Fc\gamma R^{hi} CD34^{+} IL-7R\alpha^{-} Lin^{-} Sca^{-}$  dar; B: MEP (Megakaryocyte/erythrocyte progenitors) stellen sich als  $Fc\gamma R^{lo} CD34^{-} IL-7R\alpha^{-} Lin^{-} Sca^{-}$  dar. Angegeben ist der prozentuale Anteil  $Fc\gamma R^{lo} CD34^{-}$  bzw.  $Fc\gamma R^{hi} CD34^{+}$  an allen  $IL-7R\alpha^{-} Lin^{-} Sca^{-}$  Zellen. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung. N= 5 in allen Gruppen.

Antagonisierung von Ang-(1-7) mit und ohne AngII-Infusion führte zu keiner statistisch signifikanten Änderung der GMP- und MEP-Zelllinien (Abb. 23).

### 4.3. Der Einfluss der Ang-(1-7)/Mas-Achse auf die Hämatopoese

Vergleicht man das Blutbild der Triple-Knockout-Mäuse (Kapitel 4.1.2) mit dem der Agt-defizienten Mäuse (4.1.3), so fällt auf, dass die Defizienz aller drei AngII-Rezeptoren einen weniger starken Effekt auf die Senkung der Erythrozytenzahl hatte als der komplette Ausfall von Agt. Diese Beobachtung legt nahe, dass neben AngII noch weitere Ang-Metabolite an der Modulation der Erythro- bzw. Hämatopoese beteiligt sind. *In-vivo*-Studien haben bereits nachgewiesen, dass der AngII-Metabolit Ang-(1-7) nach Knochenmarkssuppression und Stammzelltransplantation die Regenerationsfähigkeit des Knochenmarks verbessert (Rodgers *et al.*, 2003; Ellefson *et al.*, 2004). Des Weiteren konnten Wang *et al.* (2010) zeigen, dass Ang-(1-7) *in vitro* zu einer verstärkten Proliferation endothelialer Progenitorzellen führt, die bei Defizienz des Mas-Rezeptors, der als funktioneller Rezeptor für Ang-(1-7) angenommen wird, ausbleibt. Dementsprechend sollte in dieser Arbeit als Nächstes der Einfluss der Ang-(1-7)/Mas-Achse auf Blutbild und Vorläuferzellen im Knochenmark untersucht werden.

Neben einer basalen Blutbildcharakterisierung von Mas-Knockout-Tieren wurde, ähnlich dem im Abschnitt 4.2 beschriebenen Versuchsaufbau, das Blutbild und Knochenmark von Mas-Knockout-Mäusen nach 10-tägiger AngII-Infusion und AT1-Rezeptorblockade bzw. Mas-Rezeptorblockade charakterisiert. Zusätzlich zu AngII sollten sowohl in Wildtypen als auch in Mas-Knockout-Mäusen Effekte durch kurzfristige Ang-(1-7)-Behandlung auf das Blutbild untersucht werden. Zuletzt wurde ein Experiment durchgeführt, das die Rolle der Ang-(1-7)/Mas-Achse unter pathophysiologischen Bedingungen untersuchen sollte. Dafür wurde einem Mausmodell operativ ein Myokardinfarkt induziert und anschließend über drei Wochen täglich Ang-(1-7) injiziert.

### 4.3.1. Basale Blutbildcharakterisierung von Mas-Knockout-Mäusen

#### 4.3.1.1. Charakterisierung von Erythrozyten

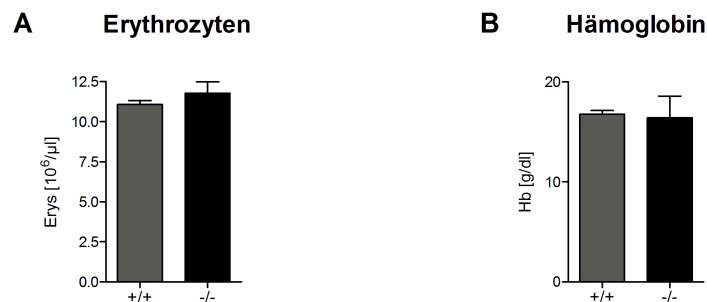


Abb. 24: Quantitative Bestimmung von Erythrozytenzahl (A) und Hämoglobingehalt (B) im Blut von Mas-Wildtypen (+/+) und Mas-Knockout-Mäusen (-/-). Erys= Erythrozyten, Hb= Hämoglobin. +/+ N=7, -/- N=8.

Mas-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu ihren Wildtypen bei einer basalen Charakterisierung des Blutes keine signifikanten Unterschiede in der Erythrozytenzahl und dem Hämoglobingehalt des Blutes (Abb. 24). Auch MCV, MCH und MCHC waren unverändert (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.1.2. Charakterisierung von Leukozyten

Eine Defizienz im Mas-Rezeptor führte zu einer signifikanten Erhöhung aller drei gemessenen leukozytärer Zelllinien ( $p < 0,01$ ; Abb. 25 A-C). Das relative Verhältnis zwischen den einzelnen Zelltypen verschob sich nicht signifikant (Abb. 25 D-F).

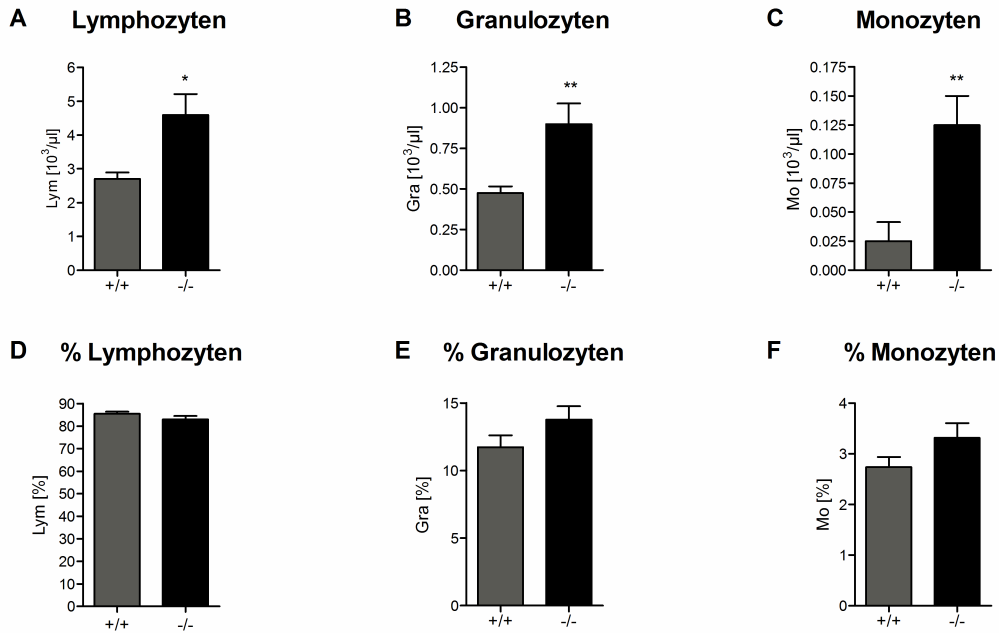


Abb. 25: Differentialblutbild: Quantitative Bestimmung der Lympho- (A), Granulo- (B) und Monozytenzahl (C) und prozentualer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl (D-F) im Blut von Wildtypen (+/+) und Mas-Knockout-Mäusen (-/-). Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . +/+ N=7, -/- N=8.

#### 4.3.1.3. Quantitative Bestimmung von Thrombozyten

Verschiedene unpublizierte Experimente der Arbeitsgruppe Walther gaben bereits Anhalt dafür, dass die Gerinnung in Mas-Knockout-Tieren verändert ist. Auffällig bei diesen Tieren war vor allem eine verkürzte Gerinnungszeit. Die Thrombozytenzahl bei der basalen Blutbildcharakterisierung von Mas-Knockout-Mäusen war signifikant niedriger als in den Wildtypen ( $p < 0,01$ ; Abb. 26).

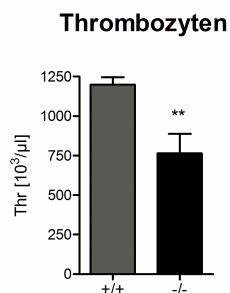


Abb. 26: Thrombozytenzahl im Blut von Wildtypen (+/+) und Mas-Knockout-Tieren (-/-). Thr= Thrombozyten. \*\*  $p < 0,01$ ; +/+ N=7, -/- N=8.



### **4.3.2. 10-Tage-Infusion von AngII und pharmakologische Rezeptorblockade in Mas-Knockout-Mäusen**

Ziel des in 4.2. beschriebenen pharmakologischen Experiments war in erster Linie, die Rolle der AngII-Rezeptoren zu untersuchen. Sowohl die Literatur als auch die Ergebnisse der Experimente mit den Wildtypen suggerierten, dass der AT1-Rezeptor die Hauptvermittlerrolle in der AngII-induzierten Erythropoese spielt. Um mögliche Effekte durch den AngII-Metaboliten Ang-(1-7) auszuschließen, wurde neben der AngII-Rezeptorblockade auch ein Ang-(1-7)-Antagonist parallel zur AngII-Infusion verabreicht. Der Mas-Rezeptor, der einerseits ein funktioneller Rezeptor von Ang-(1-7) darstellt und andererseits mit dem AT1-Rezeptor interagiert, indem er hetero-oligomere Komplexe mit diesem bildet und damit seine Funktion antagonisiert, sollte in diesem pharmakologischen Experiment ebenfalls auf mögliche Effekte in der Blutbildung untersucht werden. Dazu wurden Mas-Knockout-Mäusen, analog zu dem im Abschnitt 4.2 beschriebenen Versuchsaufbau mit den Wildtypen, 10 Tage lang AngII infundiert und weiteren Gruppen entweder ein AT1-Rezeptorblocker oder ein Mas-Rezeptorblocker einzeln oder in Kombination mit AngII verabreicht. Da im vorangegangenen pharmakologischen Experiment die Blockade des AT2-Rezeptors keine Effekte gezeigt hatte (siehe 4.2.), wurde in diesem Versuchsaufbau auf eine weitere Gruppe mit zusätzlicher Verabreichung von PD123.319 verzichtet.

#### **4.3.2.1. Organveränderungen von Mas-Knockout-Mäusen nach 10-tägiger AngII-Infusion und/ oder pharmakologischer Rezeptorblockade**

Körpergewicht, Herz- und Milzgewicht von Mas-Knockout-Mäusen unterscheiden sich unter basalen Bedingungen nicht von den Wildtypen. Die einzige Ausnahme bildete dabei das Nierengewicht, das in Mas-Knockout-Tieren höher war. Nach 10-tägiger Behandlung mit AngII, AT1-Rezeptorblockade oder AngII und AT1-Rezeptorblockade zeigten sich in Hinsicht auf das Körpergewicht keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb. 27 A). Wie bei den Wildtypen (4.2.1.1.) löste auch bei den Mas-Knockout-Tieren die AngII-Infusion eine kardiale Hypertrophie aus. Eine gleichzeitige Behandlung mit Irbesartan konnte diesen Effekt nicht im gleichen Maße verhindern wie es bei den Wildtypen der Fall war; so unterscheidet sich diese Gruppe im Student t-Test signifikant von der Kontrollgruppe, jedoch nicht von der AngII-Gruppe (Mittelwert Herz zu Körpergewicht-Verhältnis der Kontrollgruppe  $3,6 \pm 0,09$  mg/g, AngII-Gruppe  $4,1 \pm 0,17$  mg/g, AngII und Irbesartan-Gruppe  $3,9 \pm 0,09$  mg/g; Abb. 27 B, vergleiche dazu Abb. 13 B in

Abschnitt 4.2.1). Weder AngII-Infusion noch AT1-Rezeptorblockade führten bei Milz- und Nierengewicht zu signifikanten Veränderungen (Abb. 27 C und D).

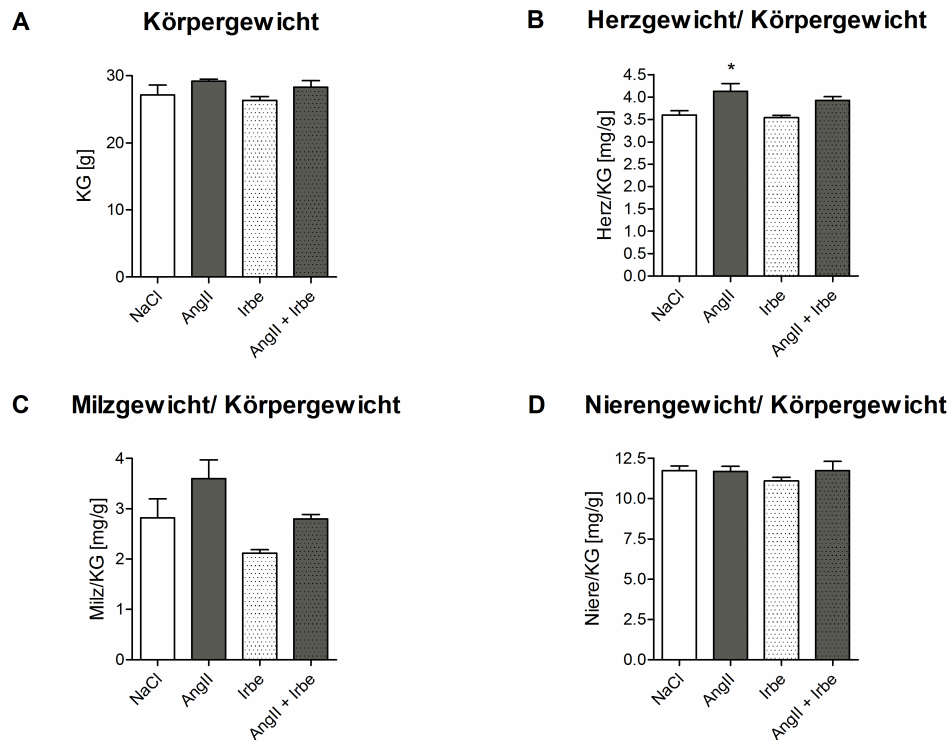


Abb. 27: A: Körpergewicht, B: Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis, C: Nierengewicht-Körpergewicht-Verhältnis, D: Milzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis in Mas-Knockout-Mäusen jeweils nach 10-Tage-Infusion von AngII und AT1-Rezeptorblockade. KG= Körpergewicht, Herz= Herzgewicht, Milz= Milzgewicht, Niere= Nierengewicht, NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan. \*  $p < 0,05$  vs. NaCl. NaCl-, AngII-, Irbesartan-Gruppe  $N=4$ , AngII+Irbesartan-Gruppe  $N=5$ .

Mas-Rezeptorblockade zeigte bei alleiniger Verabreichung eine tendenzielle Erhöhung des Herz- zu Körpergewicht-Verhältnisses ( $p=0,09$  im Student t-Test, Abb. 28 B). In Kombination mit AngII-Infusion führte sie in Mas-defizienten Tieren zu einer im Student t-Test signifikanten Herzgewichtszunahme, die in vergleichbarem Maße ausgeprägt war wie bei alleiniger AngII-Behandlung (Herz zu Körpergewicht-Verhältnis der Kontrollgruppe:  $3,6 \pm 0,19$  mg/g; AngII-Gruppe:  $4,1 \pm 0,16$  mg/g; AngII + A779-Gruppe:  $4,07 \pm 0,10$  mg/g; Abb. 28 B). In den Wildtypen führte die kombinierte Gabe des Ang-(1-7)-Antagonisten mit AngII zu einer signifikanten Erhöhung des Nierengewichts (Abb. 14 D); bei den Mas-Knockout-Mäusen zeigte sich ein gegenteiliger Effekt: das Nierengewicht dieser Tiere war im Student t-Test signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 28 D).

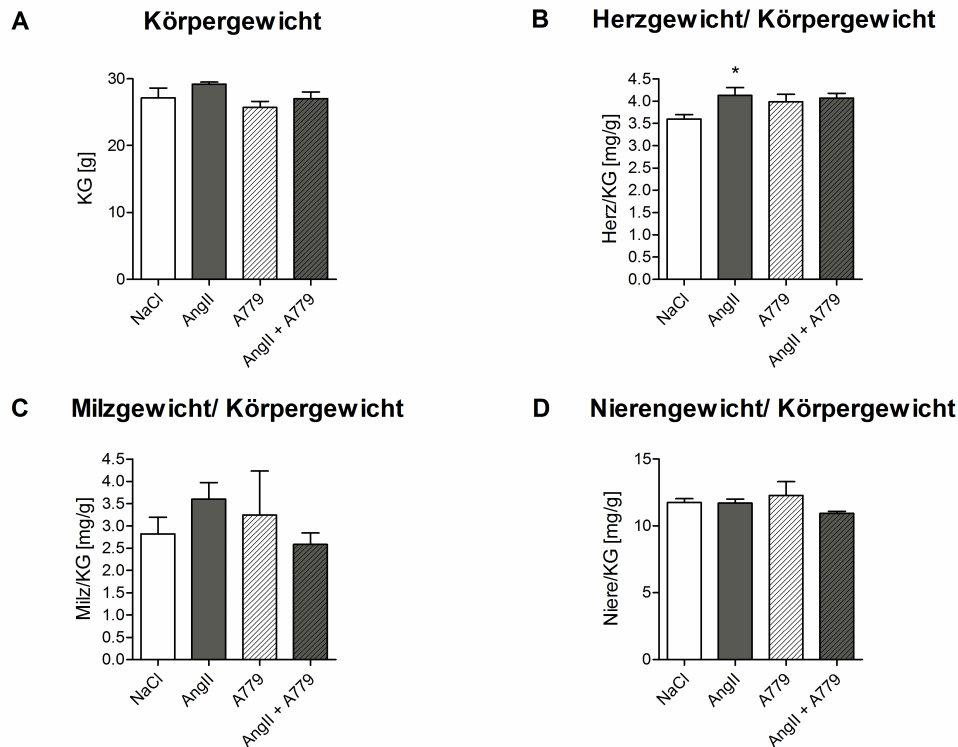


Abb. 28: A: Körpergewicht, B: Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis, C: Milzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis, D: Nierengewicht-Körpergewicht-Verhältnis in Mas-Knockout-Mäusen jeweils nach 10-tägiger Infusion von AngII und Mas-Rezeptorblockade. KG=Körpergewicht, Herz= Herzgewicht, Milz= Milzgewicht, Niere= Nierengewicht, NaCl= 0,9% Kochsalzlösung. NaCl-, AngII- und A779-Gruppe N=4, AngII+A779-Gruppe N=5.

#### 4.3.2.2. Blutbildcharakterisierung von Mas-Knockout-Mäusen nach 10-tägiger AngII-Infusion und/ oder pharmakologischer Rezeptorblockade

##### 4.3.2.2.1. Charakterisierung von Erythrozyten

Die basale Erythrozytenzahl der Mas-Knockout-Kontrollgruppe unterschied sich nicht von der der Kontrollgruppe der Wildtypen (Abb. 15 A und Abb. 29 A, vgl. auch mit der basalen Blutbildauswertung von Mas-Knockout-Mäusen in Abschnitt 4.3.1.1). Wie bei den Wildtypen zeigte sich bei den Mas-Knockout-Tieren eine durch AngII hervorgerufene Erythrozytose (die Erythrozytenzahl war nicht im one-way-ANOVA, sondern im Student t-Test signifikant erhöht, Abb. 29 A-C). Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Wildtypen war die gleichzeitige AT1-Rezeptorblockade bei Mas-Knockout-Mäusen nicht im gleichen Maße effektiv: Die Erythrozytenzahl unterschied sich weder signifikant von der Kontroll- noch von der AngII-Gruppe. Der Hämoglobin-Gehalt in der AngII und Irbesartan-Gruppe war im Student t-Test signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, der Hämatokrit zeigte eine tendenzielle Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0,07$  im Student t-Test, Abb. 29 B

und C). Gegenüber der AngII-Gruppe unterschieden sich dagegen weder Hämoglobin-Gehalt noch Hämatokrit signifikant. MCV, MCH und MCHC blieben in allen Gruppen unverändert (Daten nicht gezeigt).

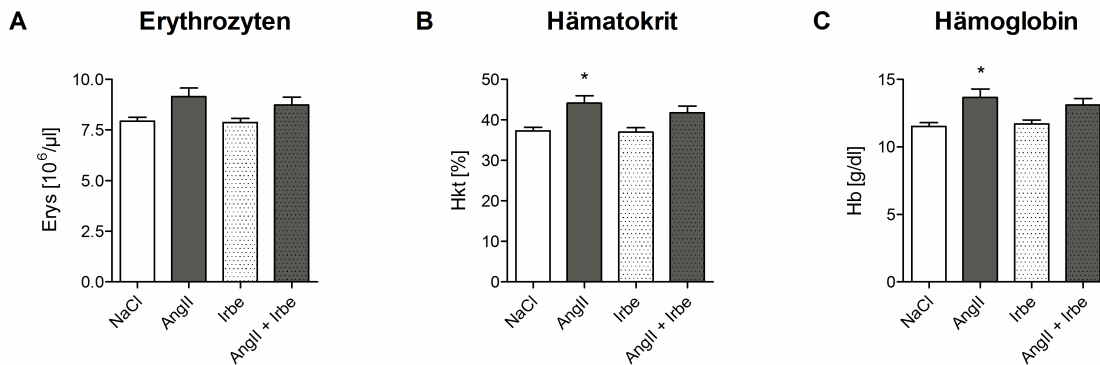


Abb. 29: Erythrozytenzahl (A), Hämatokrit (B) und Hämoglobin (C) im Blut von Mas-Knockout-Mäusen nach 10-tägiger Infusion von AngII und zusätzlicher AT1-Rezeptorblockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, Erys= Erythrozyten, Hkt= Hämatokrit, Hb= Hämoglobin. \* $p < 0,05$  vs. NaCl. NaCl-, AngII-, Irbesartan-Gruppe  $N=4$ , AngII+Irbesartan-Gruppe  $N=5$ .

Alleinige Mas-Rezeptorblockade führte zu keiner signifikanten Änderung der Erythrozytenzahl. Mas-Rezeptorblockade bei AngII-Infusion resultierte in einer ähnlich ausgeprägten Erythrozytose wie bei alleiniger AngII-Infusion (Abb. 30 A). Gleiches zeigte sich bei Hämatokrit und Hämoglobingehalt. Beim Hämoglobingehalt waren diese in der AngII + A779-Gruppe zwar nicht im one-way ANOVA, aber im Student t-Test signifikant erhöht ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ , Abb. 30 B und C).

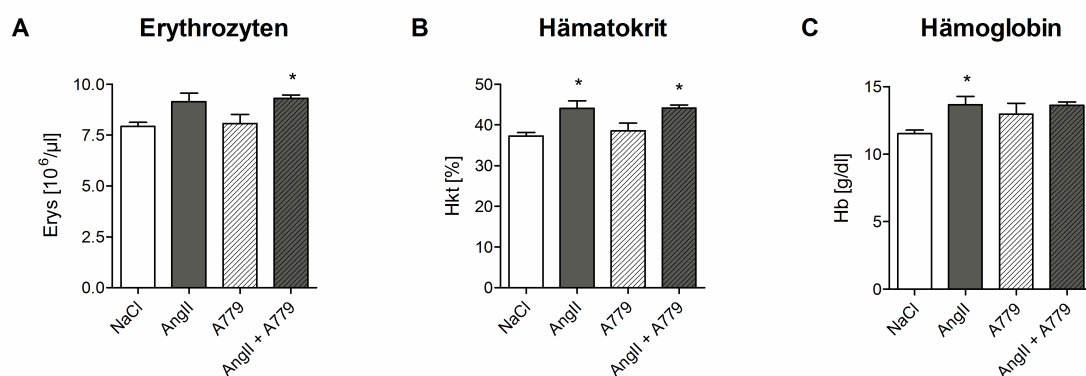


Abb. 30: Erythrozytenzahl (A), Hämatokrit (B) und Hämoglobin (C) im Blut von Mas-Knockout-Mäusen nach 10-tägiger Infusion von AngII und zusätzlicher Mas-Rezeptorblockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Erys= Erythrozytenzahl, Hkt= Hämatokrit, Hb= Hämoglobin. \* $p < 0,05$  vs. NaCl. NaCl-, AngII-, A779-Gruppe  $N=4$ , AngII+A779-Gruppe  $N=5$ .

### 4.3.2.2. Charakterisierung von Leukozyten

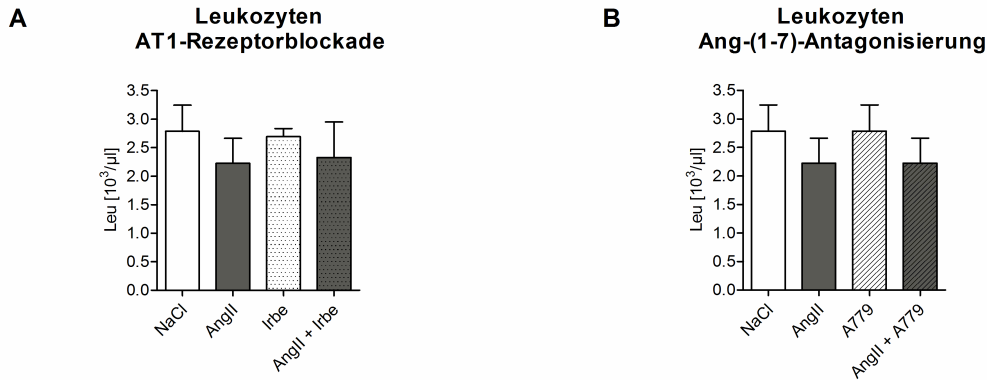


Abb. 31: Absolute Leukozytenzahl im Blut von Mas-Knockout-Mäusen nach 10-tägiger Infusion von AngII und zusätzlicher AT1-Rezeptorblockade (A) bzw. Mas-Rezeptorblockade (B). NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, Leu= Leukozyten. NaCl-, AngII-, Irbesartan- und A779-Gruppe N=4, AngII+Irbesartan-Gruppe N=5.

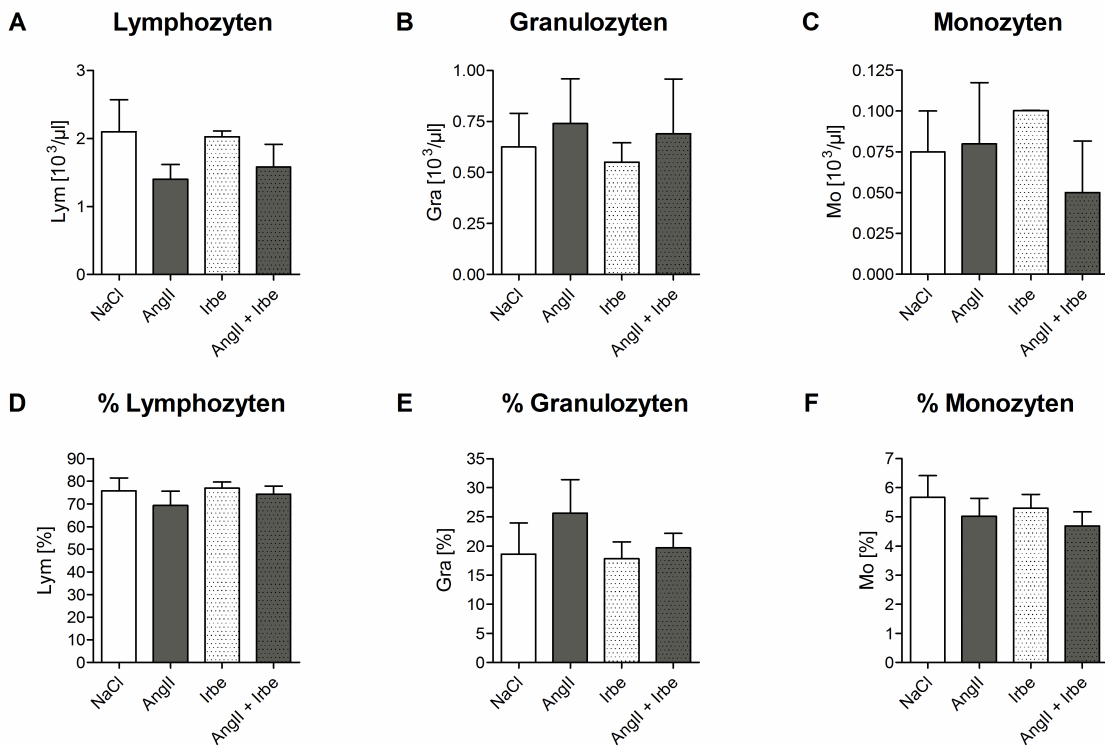


Abb. 32: Differentialblutbild von Mas-Knockout-Mäusen: Absolute Anzahl der Lympho- (A), Granulo- (B) und Monozyten (C) und deren jeweiliger relativer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl (D-F) nach 10-tägiger Infusion von AngII und zusätzlicher AT1-Rezeptorblockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. NaCl-, AngII-, Irbesartan- und A779-Gruppe N=4, AngII+Irbesartan-Gruppe N=5.

Nach 10-tägiger Infusion von AngII in Mas-Knockout-Mäusen zeigten sich keine signifikanten Änderungen in der Gesamtleukozytenzahl bzw. den einzelnen leukozytären

Zellreihen (Abb. 31 A und Abb. 32 A-C). Auch unter AT1-Blockade kam es zu keinen eindeutigen Effekten auf die Leukozyten (Abb. 31 A und Abb. 32 A-F). In Kombination mit A779 führte die AngII-Infusion jedoch zu einer tendenziellen Erniedrigung der Leukozytenzahl ( $p=0,062$  im Student t-Test, Abb. 31 B). Der bei der Leukozytenzahl beobachtete Effekt betraf Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, in der Auswertung der einzelnen Zelllinien zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abb. 33 A-C). Das prozentuale Verhältnis der einzelnen Zellreihen zueinander änderte sich dabei nicht (Abb. 33 D-F).

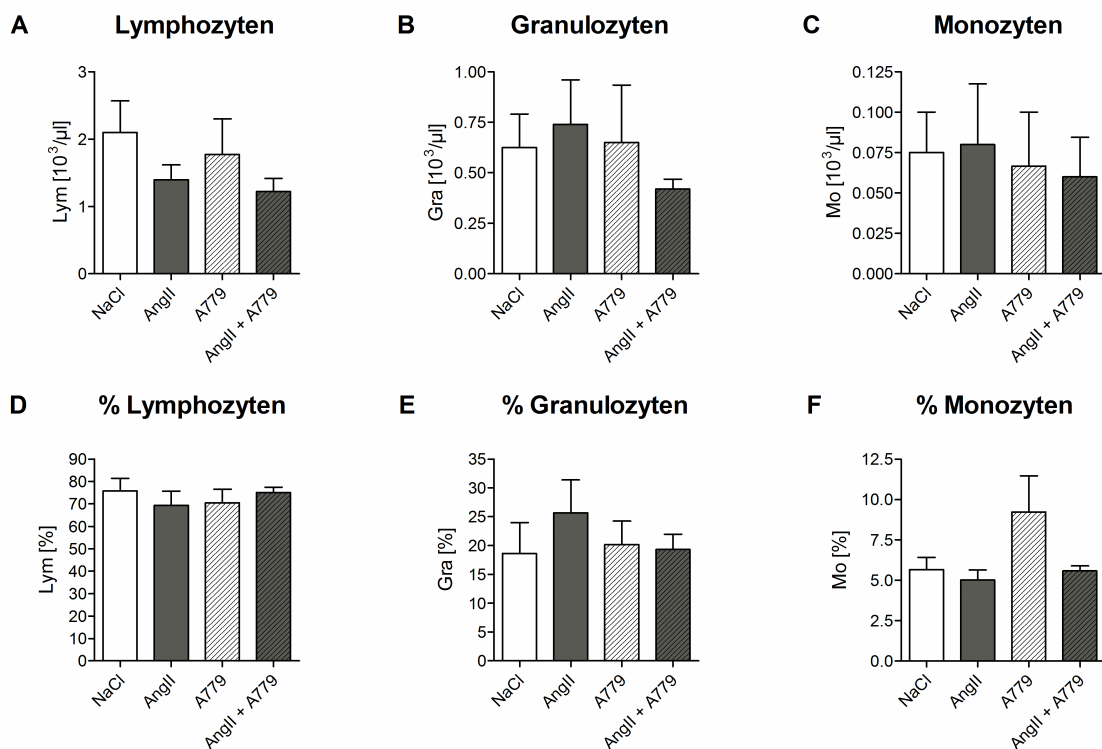


Abb. 33: Differentialblutbild von Mas-Knockout-Mäusen: Absolute Anzahl der Lympho- (A), Granulo- (B) und Monozyten (C) und deren jeweiliger relativer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl (D-F) nach 10-tägiger Infusion von AngII und zusätzlicher Mas-Rezeptorblockade. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. NaCl-, AngII-, Irbesartan- und A779-Gruppe N=4, AngII+A779-Gruppe N=5.

#### 4.3.2.2.3. Quantitative Bestimmung von Thrombozyten

Bei den Mas-Knockout-Tieren ließ sich im Gegensatz zu den Wildtypen (Abb. 20 A) keine Verringerung der Thrombozytenzahl durch AngII-Infusion in Kombination mit AT1-Rezeptorblockade verzeichnen (Abb. 34 A). Auch A779 alleine oder in Kombination mit AngII führte in diesem Fall zu keiner signifikanten Senkung der Thrombozytenzahl (Abb. 34 B).

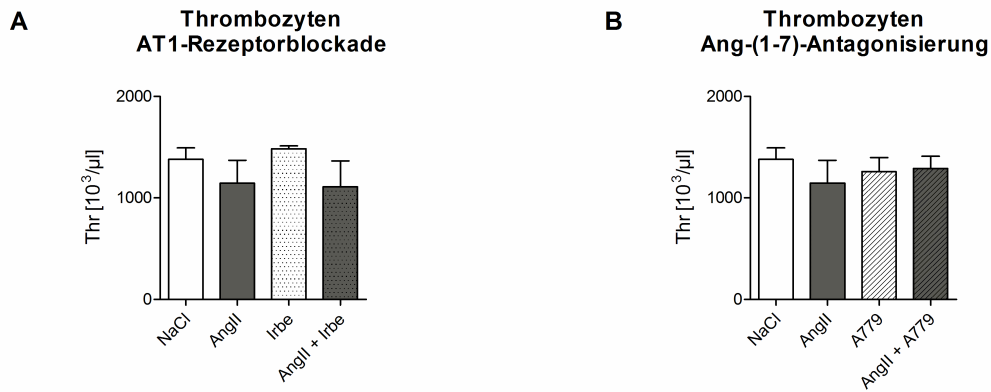


Abb. 34: Thrombozytenzahl von Mas-Knockout-Mäusen nach 10-tägiger Infusion von AngII und zusätzlicher AT1-Rezeptorblockade (A) bzw. Mas-Rezeptorblockade (B). NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan, Thr= Thrombozyten. NaCl-, AngII-, Irbesartan- und A779-Gruppe N=4, AngII+Irbesartan- und AngII+ A779-Gruppe N=5.

#### 4.3.2.3. FACS-Analyse des Knochenmarks von Mas-Knockout-Mäusen nach 10-tägiger AngII-Infusion und/ oder pharmakologischer Rezeptorblockade

##### 4.3.2.3.1. Nachweis früher Progenitorzellen

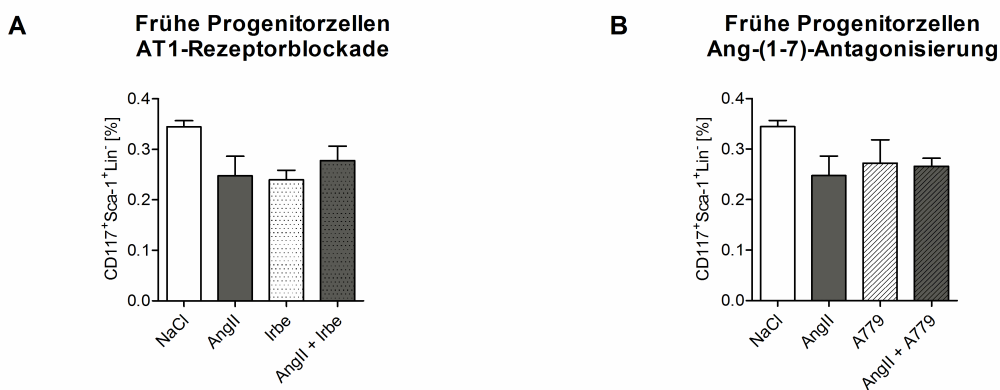


Abb. 35: Charakterisierung des Knochenmarks von Mas-Knockout-Mäusen mittels Durchflusszytometrie nach 10-tägiger Infusion von AngII und/oder AT1-Rezeptorblockade (A) bzw. Mas-Rezeptorblockade (B). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD117<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> Zellen an der Gesamtzahl der Knochenmarkszellen. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan. NaCl-, AngII-, Irbesartan-, A779-Gruppe N=4, AngII+Irbesartan- und AngII+A779-Gruppe N=5.

Bei den Wildtypen führte eine AT1-Blockade zu einer signifikanten Verringerung der frühen Progenitorzellen. Dieser Effekt ließ sich bei den Mas-Knockout-Tieren ebenfalls nachweisen ( $p < 0,01$  im Student t-Test; Abb. 35 A). AngII-Infusion führte bei diesen Tieren tendenziell zu einer Erniedrigung des prozentualen Anteils der frühen Progenitorzellen (Abb. 35,  $p = 0,05$  im Student t-Test). A779 konnte diesen Effekt nicht verhindern und führte in Kombination mit

AngII ebenfalls zu einer im Student t-Test signifikanten Verringerung der Progenitorzellzahl gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 35 B).

#### 4.3.2.3.2. Nachweis von *Lineage-restricted progenitors*

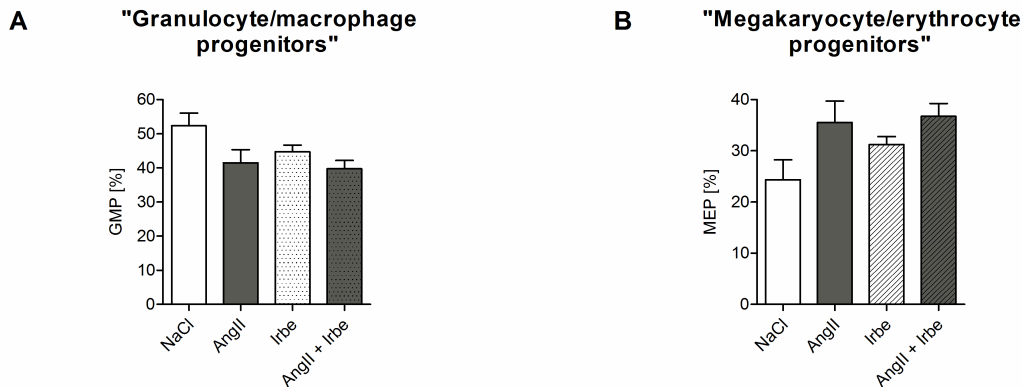


Abb. 36: Darstellung determinierter Vorläuferzellen (*Lineage-restricted progenitors*) mittels Durchflusszytometrie von Knochenmarkszellen von Mas-Knockout-Tieren nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder AT1-Rezeptorblockade. A: GMP stellen sich als  $Fc\gamma R^{hi}CD34^{+}IL-7R\alpha^{-}Lin^{-}Sca^{-}$  dar; B: MEP stellen sich als  $Fc\gamma R^{lo}CD34^{-}IL-7R\alpha^{-}Lin^{-}Sca^{-}$  dar. Angegeben ist der prozentuale Anteil  $Fc\gamma R^{lo}CD34^{-}$  bzw.  $Fc\gamma R^{hi}CD34^{+}$  an allen  $IL-7R\alpha^{-}Lin^{-}$  Zellen. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Irbe= Irbesartan. NaCl-, AngII-, Irbesartan-, N=4, AngII+Irbesartan-Gruppe N=5.

Eine 10-tägige AngII-Infusion führte bei den Mas-Knockout-Mäusen zu einer tendenziellen Erniedrigung des GMP- bzw. einer Erhöhung des MEP-Anteils (jeweils  $p=0,09$  im Student t-Test). AT1-Blockade konnte diesen Trend nicht blockieren, sondern führte bei gleichzeitiger AngII-Infusion zu einer im Student t-Test signifikanten Erniedrigung der GMP und Erhöhung der MEP (Abb. 36). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte man im gleichen Versuchsaufbau mit wildtypischen Mäusen keine Effekte durch AngII alleine oder in Kombination mit einem AT1-Blocker auf die determinierten Vorläuferzellen nachweisen (Kapitel 4.2.3.2). Auch eine gleichzeitige Mas-Rezeptorblockade mit AngII-Infusion konnte die Effekte von AngII auf den GMP- und MEP-Anteil nicht blockieren (Abb. 37).



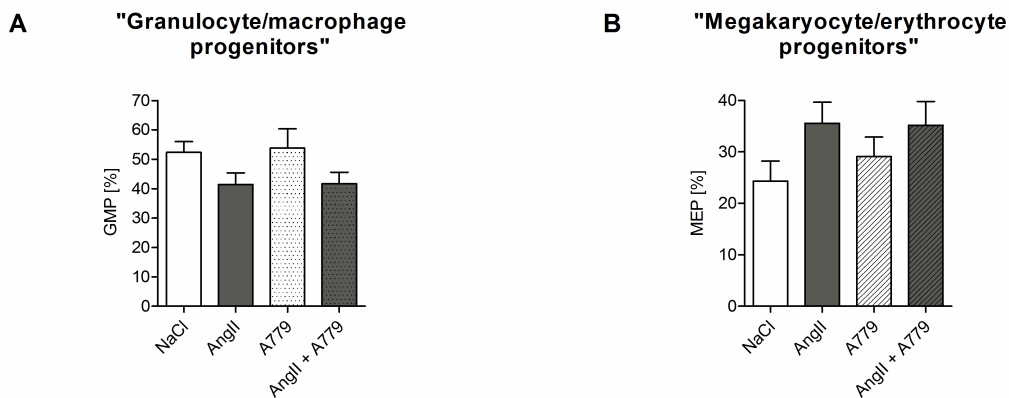


Abb. 37: Darstellung determinierter Vorläuferzellen (Lineage-restricted progenitors) mittels Durchflusszytometrie von Knochenmarkszellen von Mas-Knockout-Tieren nach 10-tägiger Infusion von AngII und/ oder Mas-Rezeptorblockade. A: GMP stellen sich als  $Fc\gamma R^{lo}CD34^{+}IL-7R\alpha^{-}Lin^{-}$  dar; B: MEP stellen sich als  $Fc\gamma R^{hi}CD34^{-}IL-7R\alpha^{-}Lin^{-}$  dar. Angegeben ist der prozentuale Anteil  $Fc\gamma R^{lo}CD34^{-}$  bzw.  $Fc\gamma R^{hi}CD34^{+}$  an allen  $IL-7R\alpha^{-}Lin^{-}$  Zellen. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung. NaCl-, AngII-, A779-Gruppe N=4, AngII+A779-Gruppe N=5.

### 4.3.3. Effekte von Ang-(1-7)-Injektionen auf das Blutbild von wildtypischen und Mas-defizienten Mäusen

Nachdem der Einfluss von AngII auf das Blutbild Mas-defizienter Tiere untersucht worden war, sollte nun in einer Versuchsreihe mit wildtypischen und Mas-Knockout-Tieren erforscht werden, ob und wie der Ang-Metabolit Ang-(1-7) auf die Blutbildung Einfluss nimmt. Dafür wurden den Tieren über drei Wochen täglich 50  $\mu$ g (1,6 $\mu$ g/g) Ang-(1-7) subkutan injiziert. Die gleiche Behandlung wurde neben den Wildtypen auch an Mas-Knockout-Tieren durchgeführt, um nachzuweisen, ob durch Ang-(1-7) ausgelöste Effekte über den Mas-Rezeptor vermittelt werden.

#### 4.3.3.1. Charakterisierung von Erythrozyten

Eine 21-tägige Ang-(1-7)-Behandlung führte im Gegensatz zu der in 4.2.2.1 beschriebenen Erythrozytose unter AngII-Infusion zu keiner Steigerung der Erythrozytenzahl, des Hämatokrits oder des Hämoglobingehaltes im Blut von Wildtypen (Abb. 38 A-C). Ang-(1-7) bewirkte eine Veränderung der Erythrozytenmorphologie im Sinne eines verminderten Erythrozytenvolumens (MCV), der Hämoglobingehalt pro Erythrozyt blieb dabei unverändert (Abb. 38 D-F). Auch in den Mas-Knockout-Tieren kam es zu keinen signifikanten Veränderungen der Erythrozytenzahl unter Ang-(1-7)-Behandlung (Abb. 38 A-C). Die mittlere Hämoglobinkonzentration (MCHC) war in unbehandelten Mas-Knockout-Tieren im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt; Injektionen von Ang-(1-7) führten bei Mas-

Knockout-Tieren zu einer signifikanten Anhebung des MCHC auf einen Wert, der dem basalen MCHC der mit Kochsalz behandelten Wildtypen entsprach (Abb. 38 F).

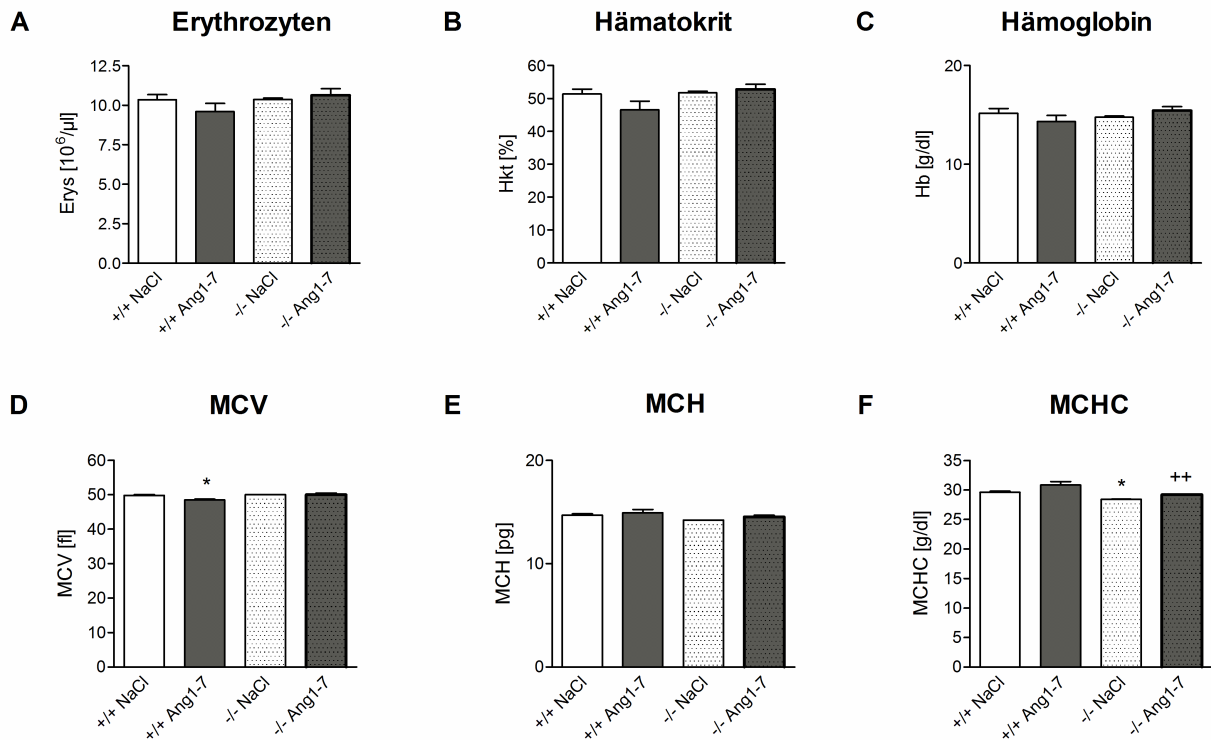


Abb. 38: Quantitative Bestimmung von Erythrozytenzahl (A), Hämatokrit (B) Hämoglobingehalt (C), Mean corpuscular volume (MCV, D), Mean corpuscular haemoglobin (MCH, E) und Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC, F) im Blut von Mas-Wildtypen (+/+) und Mas-Knockout-Mäusen (-/-) nach 21-tägiger subkutaner Injektion von Ang-(1-7) bzw. Kochsalzlösung als Kontrollgruppe. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Ang1-7= Ang-(1-7), Erys= Erythrozyten, Hkt= Hämatokrit, Hb= Hämoglobin. \*  $p < 0,05$  vs. Wildtyp (+/+) NaCl; \*\*  $p < 0,01$  vs. Mas-Knockout (-/-) NaCl. +/+NaCl N=4, +/+Ang1-7 N=4, -/-NaCl N=2, -/-Ang1-7 N=3.

#### 4.3.3.2. Charakterisierung von Leukozyten

Die in Abschnitt 4.3.1.2 beschriebene basale Erhöhung der Leukozytenzahl in Mas-defizienten Tieren ließ sich in diesem Versuch nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt). Während sich unter Ang-(1-7)-Behandlung bei den Wildtypen keine Änderungen in der Lympho-, Granulo- oder Monozytenzahl verzeichnen ließen, war bei den Knockout-Tieren der relative Anteil der Lymphozyten signifikant erhöht, der relative Anteil der Granulo- und Monozyten nach 21-tägiger Behandlung mit Ang-(1-7) signifikant vermindert ( $p < 0,01$  und  $p < 0,05$  respektive, Abb. 39 D-F). Die absolute Lymphozytenzahl war unverändert, sodass die Verschiebung der relativen Anteile durch eine niedrige absolute Granulozytenzahl ( $p = 0,07$ ) verursacht war (Abb. 39 A-C).

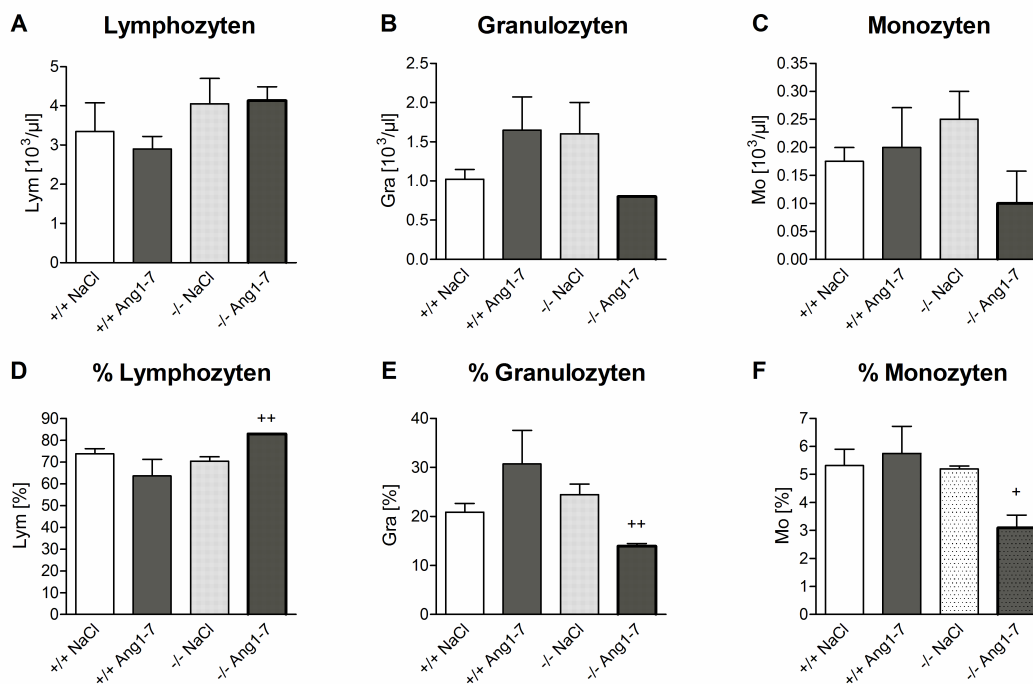


Abb. 39: Differentialblutbild: Quantitative Bestimmung der Lympho- (A), Granulo- (B) und Monozytenzahl (C) und jeweiliger prozentualer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl (D-F) im Blut von Mas-Wildtypen (+/+) und Mas-Knockout-Mäusen (-/-) nach 21-tägiger subkutaner Injektion von Ang-(1-7) bzw. Kochsalzlösung (NaCl) als Kontrollgruppe. NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Ang1-7= Ang-(1-7), Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. <sup>+</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>++</sup>  $p < 0,01$  vs. Mas- Knockout(-/-) NaCl. +/+NaCl N=4, +/+Ang1-7 N=4, -/-NaCl N=2, -/-Ang1-7 N=3.

#### 4.3.3.3. Quantitative Bestimmung von Thrombozyten

Eine wie in Abschnitt 4.3.1.3 beschriebenen Verringerung der Thrombozytenzahl bei basaler Mas-Defizienz ließ sich in diesem Versuchsaufbau nicht nachweisen. Die Injektionen von Ang-(1-7) führten weder bei den Wildtypen noch bei den Knockout-Tieren zu signifikanten Veränderungen.

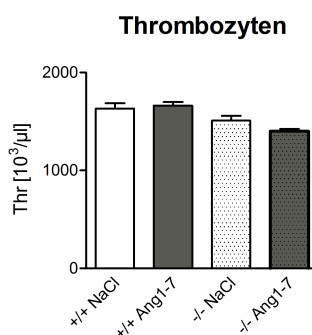


Abb. 40: Effekte einer 3-wöchigen Behandlung mit Ang-(1-7) auf die Thrombozytenzahl in Wildtypen (+/+) und Mas-Knockout-Mäusen (-/-). NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Ang1-7= Ang-(1-7), Thr= Thrombozytenzahl. +/+NaCl N=4, +/+Ang1-7 N=4, -/-NaCl N=2, -/-Ang1-7 N=3.

#### **4.3.4. Ang-(1-7)-Injektion bei induziertem Myokardinfarkt**

Die bisherigen Untersuchungen zur Ang-(1-7)/Mas-Achse legen nahe, dass dieser Teil des RAS auf vielschichtige Weise das Blutbild beeinflusst. Zum anderen gibt es in der Literatur verschiedene Hinweise darauf, dass Mas über Ang-(1-7) inflammatorische Prozesse moduliert (Benter *et al.*, 2008; Al-Maghrebi *et al.*, 2009). Die nun angestrebten Untersuchungen sollten anhand eines Myokardinfarkt-Modells in Mäusen zeigen, ob und auf welche Weise die systemische Wirkung von Ang-(1-7) unter pathophysiologischen Bedingungen modifiziert wird. Ein Myokardinfarkt führt im Organismus zu vielfältigen Reaktionen, die sowohl lokal am Herzen als auch systemisch stattfinden. Durch den Untergang von Herzmuskelgewebe kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die unter anderem zur Einwanderung von Entzündungszellen aus dem Blutkreislauf in das infarzierte Gebiet und zur Ausschüttung von Zytokinen führt. Dementsprechend kommt es in solch einem pathologischen Zustand zu einer Modifizierung der Blutbildung, was wiederum eine Abwandlung der Wirkweise von Ang-Metaboliten wie Ang-(1-7) zur Folge haben kann. Für diesen Versuch wurden Mäusen zwei Tage nach Ligatur des Ramus interventrikularis anterior für 3 Wochen täglich 50 µg (1,6 µg/g) Ang-(1-7) als subkutane Injektion verabreicht.

##### **4.3.4.1. Charakterisierung von Erythrozyten**

Tägliche Injektionen von Ang-(1-7) über 3 Wochen nach Induktion eines Myokardinfarkts führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Erythrozytenzahl oder des Hämatokrits (Abb. 41 A und B), jedoch zu einer signifikanten Steigerung des Hämoglobingehalts (Abb. 41 C). Damit einhergehend führte die Verabreichung von Ang-(1-7) nach Myokardinfarkt zu einer Erhöhung von MCH und MCHC (Abb. 41 E und F). Das Erythrozytenvolumen war in der Myokardinfarktgruppe mit Plazebobehandlung signifikant erhöht, während die Myokardinfarkt-Gruppe mit Ang-(1-7)-Behandlung ein gegenüber der Kontrollgruppe unverändertes MCV aufwies (Abb. 41 D).

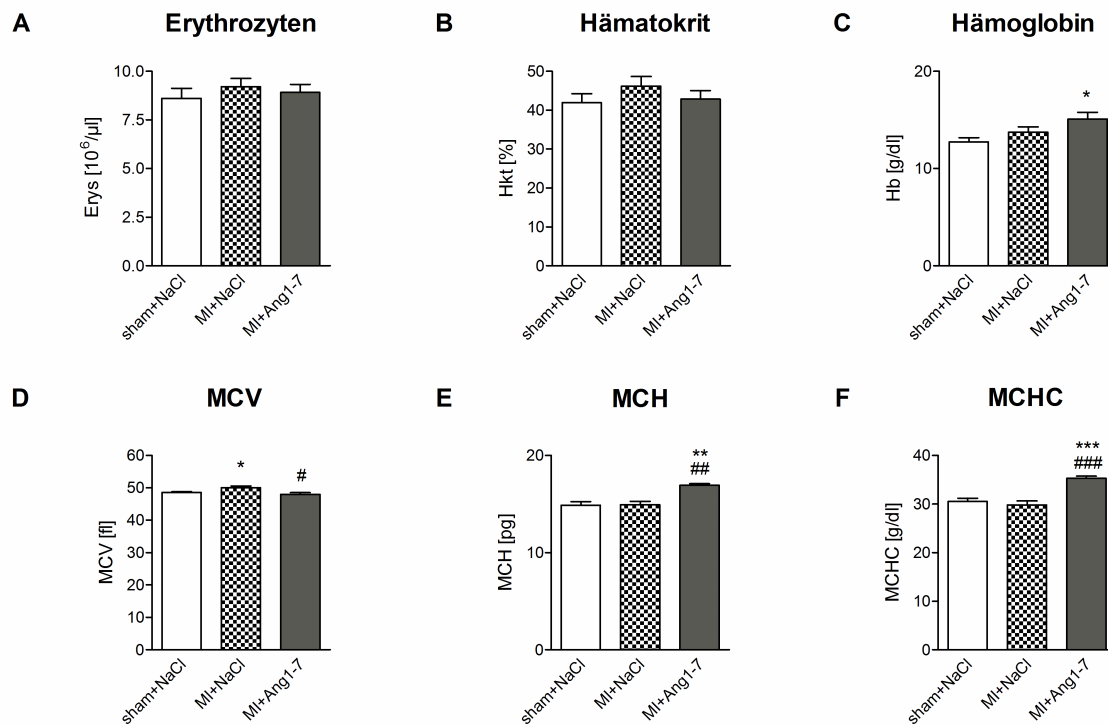


Abb. 41: Effekte von Ang-(1-7) auf Erythrozytenzahl (A), Hämatokrit (B), Hämoglobingehalt (C) und MCV, MCH und MCHC (D-F) 3 Wochen nach operativ induziertem Myokardinfarkt und täglichen Injektionen von 50 $\mu\text{g}$  Ang-(1-7). Sham=Kontrollgruppe mit Thorakotomie ohne Ligatur der Koronararterie, MI= Gruppe mit Myokardinfarkt durch Ligatur des Ramus interventrikularis anterior, NaCl= subkutane Injektion von Kochsalzlösung, Ang1-7= subkutane Injektion von 50  $\mu\text{g}$  Ang-(1-7), Erys= Erythrozyten, Hkt= Hämatokrit, Hb= Hämoglobin. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. sham+NaCl. #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  vs. MI+NaCl. Sham+NaCl N=5, MI+NaCl N=5, MI+Ang1-7 N=5.

#### 4.3.4.2. Charakterisierung von Leukozyten

Die Induktion eines Myokardinfarkts alleine führte zu keinen signifikanten Auswirkungen auf die Lympho-, Granulo- oder Monozytenzahl. Wie in 4.3.3.2 beschrieben, hatte eine Ang-(1-7)-Behandlung in wildtypischen Tieren keinen Einfluss auf die Leukozytenzahl, während es in Mas-defizienten Tieren zu einer Unterdrückung der Granulozyten kam. Nach einem Herzinfarkt hingegen führten Ang-(1-7)-Injektionen zu einer Leukozytose gegenüber der Myokardinfarktgruppe ohne Ang-(1-7)-Behandlung (Abb. 42 A), die alle drei Zelllinien betraf: Die Lymphozyten- und Monozytenzahl stieg signifikant ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,05$  respektive), die Granulozytenzahl tendenziell ( $p = 0,062$ ) gegenüber der Myokardinfarkt-Gruppe ohne weitere Behandlung an (Abb. 42 B-D). Das relative Verhältnis zwischen Lympho-, Granulo- und Monozyten veränderte sich nicht (nicht gezeigt).

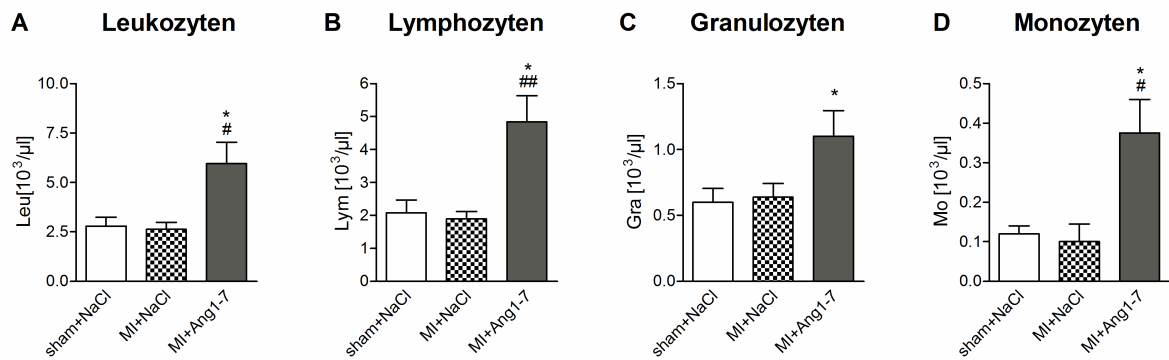


Abb. 42: Leukozytenzahl (A), Lympho- (B), Granulo- (C) und Monozytenzahl (D) 3 Wochen nach operativ induziertem Myokardinfarkt und täglichen Injektionen von 50 µg Ang-(1-7). MI= Myokardinfarkt, NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Ang1-7= Ang-(1-7), Leu= Leukozyten, Lym= Lymphozyten, Gra= Granulozyten, Mo= Monozyten. \*  $p < 0,05$ , vs. Sham+NaCl. sham+NaCl N=5, MI+NaCl N=5, MI+Ang1-7 N=4.

#### 4.3.4.3. Quantitative Bestimmung von Thrombozyten

Während Mäuse nach Myokardinfarkt ohne weitere Behandlung keine veränderte Thrombozytenzahl aufwiesen, ließ sich in der Gruppe mit Ang-(1-7)-Behandlung eine signifikante Steigerung der Thrombozytenzahl gegenüber der unbehandelten Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe verzeichnen. Da eine Ang-(1-7)-Behandlung in gesunden Mäusen keine Veränderungen zeigte (s. 4.3.3.3.), scheint die Wirkung des Peptids spezifisch durch den pathologischen Hintergrund modifiziert.

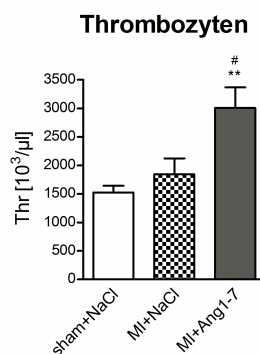


Abb. 43: Thrombozytenzahl im Blut 3 Wochen nach operativ induziertem Myokardinfarkt und täglichen Injektionen von 50 µg Ang-(1-7). MI= Myokardinfarkt, NaCl= 0,9% Kochsalzlösung, Ang1-7= Ang-(1-7), Thr= Thrombozytenzahl. \*\*  $p < 0,01$  vs. sham+NaCl, #  $p < 0,05$  vs. MI+NaCl. Sham+NaCl N=5, MI+NaCl N=6, MI+Ang1-7 N=5.

## 5. Diskussion

Die Erforschung des RAS war seit seiner Entdeckung Ende des 19. Jahrhunderts durch Tigerstedt (1898) für lange Zeit auf seine Effekte auf das Herzkreislaufsystem beschränkt. Erst in den letzten zwanzig Jahren wandelte sich das Verständnis über die Wirkungsweise des RAS vom systemisch wirkenden Hormonsystem mit AngII als Hauptendprodukt zum Multi-Mediator-System, das weitere metabolisch aktive Ang-Peptide wie AngIII, AngIV und Ang-(1-7) umfasst und neben seiner systemischen Wirkung auch lokal im Gewebe auto-, intra- und parakrine Funktionen ausübt (Fyhrquist und Saijonmaa, 2008). Aufgrund dieser Erkenntnisse rückten auch andere Organsysteme und Regulationskaskaden in den Fokus der RAS-Forschung. ACE-Hemmer und AT1-Blocker sind seit fast dreißig Jahren Standardmedikamente in der Behandlung von Bluthochdruck, Herz- und Niereninsuffizienz. Mit fortgeschrittenen Kenntnissen über weitere metabolisch aktive Peptide des RAS eröffnen sich neue Möglichkeiten, neue Pharmakotherapeutika zu entwickeln, die noch gezielter in den Pathomechanismus bei Zuständen wie Herzinsuffizienz eingreifen können. Gleichzeitig weiß man heute, dass das RAS nicht allein das Herzkreislaufsystem beeinflusst, sodass das Wissen um sämtliche Wirkungsbereiche essentiell für den klinischen Einsatz ist, sowohl in Hinsicht auf Nebenwirkungen im Rahmen bisheriger Therapien als auch bezüglich der Entwicklung neuer Anwendungsbereiche.

Das Knochenmark ist ein sehr komplexes Organ, das in seiner Regulation der Hämatopoese von vielen, zum Teil bisher nicht identifizierten Faktoren beeinflusst wird. Elemente des RAS lassen sich auf den meisten Knochenmarkszellen und auch in der primitiven Hämatopoese nachweisen und stellen damit die Grundlage eines lokal existierenden RAS im Knochenmark dar (Park und Zambidis, 2009). Bisherige Ergebnisse zeigen, dass die Effekte des RAS auf die Regulierung der hämatopoetischen Zelldifferenzierung zahlreich und verschieden sind. Neben AngII spielen auch andere Metabolite des RAS wie z.B. Ang-(1-7) eine Rolle (Rodgers *et al.*, 2002). Des Weiteren wurden bisher verschiedene Entwicklungsstufen in der Hämatopoese identifiziert, auf die das RAS Einfluss nimmt (Park und Zambidis, 2009), und noch immer sind die genauen Mechanismen, wie dieses Gleichgewicht zwischen RAS-Peptiden und anderen Wachstumsfaktoren reguliert wird, unklar. Eine Vielzahl der veröffentlichten Ergebnisse über die Wirkung von AngII auf die Hämatopoese beruht auf Experimenten mit Zellkulturen. Aufgrund der Komplexität des Knochenmarks bzw. der Regulation der Hämatopoese ist die Signifikanz dieser einzelnen *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse jedoch fragwürdig.

Das Wissen um den Einfluss des RAS auf die Regulation hämatopoetischer Stammzellen hat in pathophysiologischer Hinsicht große klinische Signifikanz, da es Hinweise gibt, dass das RAS auch bei Neoplasien des hämatopoetischen Systems eine Rolle spielt. ACE ist zum Beispiel auf leukämischen Blasten, auf erythroleukämischen Zellen und auf Makrophagen in befallenen Lymphknoten bei Morbus Hodgkin nachweisbar (Haznedaroglu und Beyazit, 2010). Auch Renin ist in verschiedenen Formen der Leukämie verstärkt aktiv, und AngII wirkt als autokriner Wachstumsfaktor in der akuten myeloiden Leukämie (Haznedaroglu und Beyazit, 2010). Das RAS des Knochenmarks ist damit als möglicher Angriffspunkt zur Behandlung von Leukämien und myelodysplastischen Krankheiten von großem Interesse. Diesen Schnittpunkt zwischen kardiovaskulärem System und Hämatopoese im Detail zu untersuchen ist damit in zweierlei Hinsicht signifikant, da sowohl der therapeutische Eingriff des RAS zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen sich auf die Hämatopoese auswirken kann, als auch Pathologien des hämatopoetischen Systems wie Anämie und Neoplasien mit kardiovaskulären Symptomen durch Fehlregulation des RAS einhergehen können. Die vorliegende Arbeit zielte in diesem Kontext darauf ab, anhand von *in vivo*-Experimenten mehr Erkenntnisse über die Rolle einzelner RAS-Komponenten in der Regulierung der Hämatopoese zu gewinnen. Besondere Aufmerksamkeit sollte dabei neben AngII und seinen Rezeptoren vor allem Ang-(1-7) und dem Mas-Rezeptor geschenkt werden. Folgende Hypothesen sollten anhand von Differentialblutbild und Durchflusszytometrie von Knochenmarkszellen überprüft werden:

1. AngII wirkt stimulierend auf die Erythropoese, dieser Effekt ist AT1-vermittelt.
2. AngII stimuliert hämatopoetische Progenitorzellen.
3. Ang-(1-7) stimuliert hämatopoetische Progenitorzellen und bewirkt damit eine Erhöhung aller Blutzellen im Blut.
4. Der Mas-Rezeptor nimmt als funktioneller Rezeptor von Ang-(1-7) Einfluss auf das Blutbild.

Zusätzlich sollten die Ergebnisse kurzfristiger pharmakologischer Interventionen mit den Blutbildern genetisch veränderter Tiere mit dauerhafter Defizienz bzw. Überexprimierung verschiedener RAS-Elemente verglichen werden, um zu untersuchen, ob die Ergebnisse der pharmakologischer Behandlung sich mit diesen Langzeiteffekten decken.



## 5.1. Effekte von AngII und seinen Rezeptoren auf die Hämatopoese

### 5.1.1. Effekte durch AngII auf Erythrozyten

Um die in dieser Arbeit formulierte erste Hypothese zu überprüfen, wurde die Versuchsreihe einer 10-tägigen Infusion mit AngII durchgeführt. Die Ergebnisse scheinen die erste Hypothese zu untermauern, da die Infusion von AngII in wildtypischen Mäusen eine signifikante Erhöhung der Erythrozytenzahl bewirkte (Abb. 15). Hämoglobingehalt und Hämatokrit stiegen proportional zur Erhöhung der Erythrozytenzahl an. Größe und mittlerer Hämoglobingehalt der Zellen blieben dabei unverändert. Bei einem erhöhten Hämatokrit können zwei verschiedene Zustände ursächlich sein: Eine absolute Erhöhung der Erythrozytenzahl bei gleichem Plasmavolumen, und eine relative Erythrozytose bei vermindertem Plasmavolumen und gleicher absoluter Zellzahl. Eine relative Erythrozytose durch Dehydrierung ist aber unwahrscheinlich, da eine RAS-Stimulierung zum gegenteiligen Effekt, also einer Retention von Wasser und damit einer Verdünnung und Erniedrigung des Hämatokrits führen sollte (Schmidt *et al.*, 2010). Klinisch wiesen die Tiere keine Zeichen einer Dehydrierung auf; und das Körpergewicht blieb im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert bzw. lag im Mittelwert etwas über dem der Kontrollgruppe (Abb. 13). Dementsprechend stellte sich als nächstes die Frage, ob die erhöhte Erythrozytenzahl durch eine verstärkte Produktion oder einen verminderten Abbau der Zellen zustande kommt. Die Lebensspanne muriner Erythrozyten beträgt je nach Quelle 38 bis 52 Tage (Horky *et al.*, 1978; Hoffmann-Fezer *et al.*, 1993). Durch komplette Hemmung des Abbaus von Erythrozyten könnte somit innerhalb von zehn Tagen die Zellzahl um maximal 25% erhöht werden, die Steigerung der Zellzahl durch 10-tägige Infusion von AngII betrug etwa 20% (Abb. 15). Berücksichtigt man jedoch, dass der Abbau von Erythrozyten in der Milz normalerweise aufgrund von Deformierungen und Defekten durch Alterung erfolgt (Schmidt *et al.*, 2010), ist es unwahrscheinlich, dass eine so starke Reduktion des Abbaus innerhalb von 10 Tagen erreicht werden kann. Die Neuproduktion von Erythrozyten dagegen erfolgt innerhalb weniger Tage; so normalisiert sich zum Beispiel der Hämatokrit nach einer durch Phenylhydrazin induzierten Anämie bereits nach 6 Tagen (Vannucchi *et al.*, 2001). Eine verstärkte Produktion von Erythrozyten ist daher bei einer 10-tägigen Behandlung anzunehmen. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Beschreibungen einer direkten Beeinflussung der Erythrozytenzahl durch AngII *in vivo* (Cole *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2005). Der Erythrozyt entwickelt sich aus der Linie der myeloiden Vorläuferzellen, die sich zunächst in MEP und GMP auftrennen. Aus den MEP differenzieren sich zunächst Epo-sensitive BFU-

E, danach werden verschiedene Entwicklungsstufen bis hin zum kernlosen Retikulozyt durchlaufen, der Vorstufe des reifen Erythrozyten (Tsiftoglou *et al.*, 2009). Die Erythropoese wird durch Hypoxie, den Eisenhaushalt und durch Wachstumsfaktoren reguliert, von denen der wichtigste das Epo ist. Um nachzuweisen, auf welcher Entwicklungsstufe die Stimulierung der Erythropoese erfolgte, wurde das Knochenmark der Tiere auf zwei verschiedenen Entwicklungsebenen der Hämatopoese mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Zum einen wurden Antikörper für multipotente hämatopoetische Progenitorzellen verwendet. Diese exprimieren die Oberflächenantigene CD117 (c-kit) und Sca-1 und können von den weiter differenzierten Vorläuferzellen durch fehlende Expression linienspezifischer Oberflächenmarker unterschieden werden (Lin<sup>-</sup>) (Morrison *et al.*, 1997). Die Zahl der frühen Progenitorzellen im Knochenmark erhöhte sich durch die AngII-Stimulation nicht (Abb. 21). Zum anderen wurde die determinierten Vorläuferzellen MEP und GMP in ihrem Verhältnis zueinander untersucht. Dabei zeigte sich keine Zunahme im Anteil der megakaryozytären/erythrozytären Zelllinie (Abb. 22). Ursprünglich war für diese Versuchsreihe auch die Untersuchung einer dritten Entwicklungsebene geplant gewesen. Um die erythroiden Vorläuferzellen darzustellen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Ter119- und CD71-Antikörpern durchgeführt. Diese zwei Epitope werden auf der Oberfläche erythrozytärer Vorläuferzellen ab der Entwicklungsstufe des Proerythroblasten exprimiert, wobei die Intensität der Expression abhängig vom Reifestadium variiert (Kina *et al.*, 2000; Socolovsky *et al.*, 2001). Bei der Durchführung der Durchflusszytometrie wurde jedoch ein fehlerhafter Ter119-Antikörper verwendet, sodass die Messergebnisse dadurch nicht mehr für eine Analyse verwendbar waren. Diese Experimente sollten dementsprechend wiederholt werden.

Neben dem Knochenmark findet ein Teil der murinen Hämatopoese in der Milz statt. Unter physiologischen Bedingungen wird dort circa ein Drittel des Blutes gebildet, während bei hämatopoetischem Stress der erhöhte Produktionsbedarf der Blutzellen vor allem von der Milz gedeckt wird (Fox, 2007). Um eine genauere Aussage bezüglich der Entwicklungsebene, auf der AngII die vermehrte Bildung von Erythrozyten hervorruft, zu erlangen, wäre eine weitere Versuchsreihe mit AngII-Infusion, bei der mit FACS-Analyse sowohl Knochenmarks- als auch der Milzzellen auf Erythrozytenvorläufer mit TER119 und CD71 charakterisiert werden, ein guter Ansatz.

Wie bereits erwähnt, wurde bei nierentransplantierten Patienten eine dauerhafte Erythrozytose beschrieben, die sich mit ACE-Hemmern und AT1-Antagonisten therapieren ließ (Vlahakos *et al.*, 2003). Aufgrund dieses erfolgreichen Therapieansatzes wurde vermutet, dass die

Posttransplantationserythrozytose vor allem durch eine pathologische Überaktivierung des RAS hervorgerufen wird. Um diese These weiter zu untersuchen kann man das Blutbild der Angiotensinogen-überexprimierenden Tiere heranziehen, deren AngII-Spiegel im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen dreifach erhöht ist (Kimura *et al.*, 1992). Dies führt unter anderem zu einem signifikant erhöhten Blutdruck. Im Blutbild zeigt sich jedoch keine Erythrozytose (Abb. 10). Bei diesen Tieren muss es also zu einer Gegenregulation kommen, die die Effekte durch AngII auf die Erythropoese dauerhaft unterdrückt. Die chronische Erythrozytose bei Nierentransplantierten hängt, auch wenn sie sich in der Regel effektiv mit einem AT1-Blocker oder ACE-Hemmer therapieren lässt, von einer Vielzahl weiterer Faktoren ab: Neben der Überaktivierung des RAS spielen auch die Art der Immunsuppression, die Funktion bzw. der Grad der Abstoßung des Transplantats, eine Überproduktion von Epo und weitere Wachstumsfaktoren wie der Insulin-growth-like factor (IGF-1) und Androgene eine Rolle (Vlahakos *et al.*, 2003). Es ist zwar möglich, dass AngII in diesem Fall auch die Produktion von Epo beeinflusst und aus diesem Grund den zentralen Angriffspunkt für eine Pharmakotherapie darstellt. Andererseits wiesen Vlahakos *et al.* nach, dass der hämatokritsenkende Effekt der AT1-Antagonisten bzw. ACE-Hemmer oft ohne signifikante Senkung des Epo-Spiegels einhergeht. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant, die in dieser Arbeit verwendeten Tiere mit Angiotensinogen-Überexpression auf ihre Epo-Konzentrationen im Blut zu untersuchen, um eine Aussage darüber zu erhalten, ob AngII vor allem einen direkten Effekt auf die Erythrozyten oder einen indirekten Effekt über die Epo-Produktion ausübt.

### **5.1.2. Sind die Effekte von AngII auf die Erythrozytenzahl AT1-Rezeptor-vermittelt?**

Im pharmakologischen Ansatz konnte klar gezeigt werden, dass die durch exogenes AngII stimulierte Erythrozytose nicht zustande kam, wenn den Tieren gleichzeitig ein AT1-Rezeptorblocker verabreicht wurde (Abb. 15). Zusätzliche AT2-Rezeptorblockade führte in gleichem Maße zu einer Erythrozytose wie alleinige AngII-Infusion und zeigte keinen additiven Effekt. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein, in der der AT1-Rezeptor generell als Hauptvermittler der AngII-Effekte beschrieben wird (Kato *et al.*, 2005; Charrier *et al.*, 2004; Rodgers *et al.*, 2000). Vergleicht man dazu aber die Blutbilder der in 4.1.2.1 besprochenen AT-Rezeptor-Doppel- und Triple-Knockout-Tiere, so widersprechen die Daten der postulierten Hauptvermittlerrolle des AT1-Rezeptors: Zwar führte die Abwesenheit aller drei Rezeptoren in den Triple-Knockout-Tieren zu einer Anämie, bei AT1a/AT1b-

Doppel-Knockout-Tieren ließ sich diese aber nicht nachweisen (Abb. 7). Effekte einer 10-tägigen pharmakologischen Intervention mit Effekten einer Gen-Defizienz zu vergleichen, ist angesichts der komplexen Entwicklung und Pathologie der genetisch manipulierten Tiere sicher nur eingeschränkt möglich. Da die Erythropoese über eine Vielzahl von Faktoren reguliert wird, könnte eine langfristige AT1-Defizienz, ähnlich wie bei den im vorigen Abschnitt erwähnten Angiotensinogen-überexprimierenden Tieren, durch andere Faktoren ausgeglichen werden. Damit stellt sich aber die Frage, wieso bei zusätzlichem Wegfall des AT2-Rezeptors dieser Ausgleichsmechanismus nicht mehr greift. Der AT2-Rezeptor spielt vor allem in der Entwicklung des Organismus eine herausragende Rolle (de Gasparo *et al.*, 2000), und auch im Zusammenhang mit der primitiven Hämatopoese wurde gezeigt, dass der AT2-Rezeptor notwendig für die Differenzierung der Hämangioblasten zu hämatopoetischen Vorläuferzellen ist (Zambidis *et al.*, 2008). Eine mögliche Erklärung wäre damit, dass es bei den Triple-Knockout-Tieren neben den Effekten einer AT1-Defizienz zusätzlich zu einer Hemmung der Erythropoese durch Störungen in der Entwicklung kommt, während man bei pharmakologischer Blockade im erwachsenen Tier keinen Effekt durch den AT2-Rezeptor beobachten kann. Da sich eine Entwicklungsstörung der primitiven Hämatopoese auch auf alle anderen Blutzellen auswirken sollte, muss man bei dieser Theorie auch die Leuko- und Thrombozyten in Betracht ziehen. Bei den Triple-Knockout-Tieren zeigten sich bei allen anderen Blutzellen keine signifikanten Veränderungen der Zellzahl, was den Erklärungsansatz unwahrscheinlicher macht. Eine andere Erklärung wäre eine weniger signifikante Beteiligung des AT2-Rezeptors, der den Wegfall des AT1-Rezeptors kompensiert, und dessen zusätzlicher Wegfall bei den Triple-Knockout-Tieren letztendlich zur Anämie führt. Wenn alle drei AT-Rezeptoren fehlen, kann AngII außerdem nicht mehr internalisiert werden, sodass möglicherweise die verstärkte Metabolisierung von AngII, z.B. zu Ang-(1-7), eine Rolle spielt. Als weiterführendes Experiment könnte man AT1a/AT1b-Doppel-Knockout-Tieren einen AT2-Blocker verabreichen. Dies sollte Hinweise darauf geben, ob eine gestörte Entwicklung bei Fehlen des AT2-Rezeptors sich auch später auf die Erythropoese auswirkt. Zusätzlich würde eine exogene Aktivierung des jeweils verbliebenen Rezeptors in Doppel-Knockout-Mäusen mit AngII-Infusion die Möglichkeit geben, die Funktion der einzelnen Rezeptoren auf AngII spezifisch darzustellen.

### **5.1.3. Diskrepanzen zwischen Angiotensinogen-Defizienz und Deletion aller AngII-Rezeptoren**

Das Fehlen von Agt und damit aller Ang-Metabolite in Agt-defizienten Tieren führte zu einer schweren Anämie (Abb. 4). Auch bei Tieren mit Defizienz des AT1a-, AT1b- und AT2-Rezeptors ließ sich eine Anämie nachweisen (Abb. 7). Auffällig war dabei jedoch die Tatsache, dass das Fehlen der drei AngII-Rezeptoren die Erythrozytenzahl nicht im gleichen Maße senkte wie die Abwesenheit von Agt. Eine mögliche Erklärung für die ausgeprägtere Anämie der Agt-defizienten Tiere wäre eine durch Niereninsuffizienz hervorgerufene renale Anämie. Diese Möglichkeit wird von Cole *et al.* in ihrer Publikation über Anämie in ACE-defizienten Tieren diskutiert (2000). Sie verglichen die Phänotypen zweier Mauslinien: Die erste, genannt ACE.1, war mit vollständiger Deletion des ACE generiert worden, die zweite, genannt ACE.2, nur mit einem verkürzten ACE-Protein, das im Blut zirkuliert, aber weder in Lunge noch Niere Aktivität aufweist. ACE.1-Knockout Tiere hatten mikroskopisch einen pathologischen renalen Phänotyp mit erniedrigter Kreatinin-Clearance, während die ACE.2-Knockout-Mauslinie einen normalen renalen Phänotyp aufwies. Hämatokrit und Hämoglobin waren in beiden Mauslinien in ähnlichem Ausmaß erniedrigt. Des Weiteren konnte bei beiden ein erhöhter Epo-Spiegel nachgewiesen werden. Wie in Abschnitt 1.3.3 erwähnt, kann man sowohl in Triple- als auch AT1a/AT1b-Doppel-Knockout-Tieren den gleichen pathologischen renalen Phänotyp wie in Agt-Knockout-Tieren finden. Im Gegensatz dazu steht die jeweils sehr unterschiedliche Ausprägung der Anämie: Während AT1a/AT1b-Doppel-Knockout-Tiere eine zum Wildtyp vergleichbare Erythrozytenzahl aufweisen, sind Triple Knockout-Tiere anäm. Die Anämie ist jedoch mit einer Verminderung des Hämatokrits um ca. 15% wesentlich geringer ausgeprägt als bei den Agt-defizienten Tieren mit einer Verminderung des Hämatokrits um durchschnittlich 36%. Eine renale Anämie ist insofern als Erklärung für die unterschiedliche Ausprägung der Anämie nicht ausreichend. Daher müssen zwei andere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: Zum einen, dass AngII nicht alleine für die Effekte auf die Erythropoese verantwortlich ist, denn seine Spaltprodukte, die in Kapitel 1.1.3 genauer beschrieben werden, sind ebenfalls metabolisch aktiv. Zum anderen ist es möglich, dass andere Rezeptoren neben den AT1- und AT2-Rezeptoren an der Vermittlung der AngII-Effekte beteiligt sind. Die in dieser Arbeit unter 4.3 beschriebenen Experimente, die sich auf die Ang-(1-7)/Mas-Achse konzentrierten, sollten diese im Bereich der Hämatopoese bisher wenig erforschten Bestandteile des RAS auf eine mögliche Beteiligung an der Steuerung der Erythropoese hin untersuchen. Die Ergebnisse werden in Kapitel 5.2 diskutiert.

#### 5.1.4. Leukozyten: Unterschiede zwischen Kurz- und Langzeiteffekt von AngII

AngII-Infusion führte nach 10 Tagen zu keiner signifikanten Veränderung der Lympho-, Mono- oder Granulozytenzahl (Kapitel 4.2.2.2). Bei den Granulozyten zeichnete sich jedoch eine tendenzielle Erhöhung ab. Es ist dabei nicht möglich herauszulesen, welcher Rezeptor diesen Effekt vermittelt, da bei der pharmakologischen AT1-/AT2-Rezeptorblockade durch zu starke Standardabweichungen keine klaren Tendenzen erkennbar sind (Abb. 8). Dauerhaft erhöhte AngII-Spiegel führten dagegen in Agt-überexprimierenden Tieren zu einer Erniedrigung der Leukozyten (Abb. 11). Betrachtet man die FACS-Analysen des Knochenmarks im pharmakologischen Versuch (Kapitel 4.2.3), so lassen sich weder bei den multipotenten Progenitorzellen, noch bei der Aufspaltung in GMP und MEP Unterschiede feststellen. Die in dieser Arbeit aufgestellte zweite Hypothese einer Stimulierung der frühen Progenitorzellen durch AngII konnte somit im Versuch einer 10-tägigen Stimulation durch AngII nicht bestätigt werden. Kurzfristige RAS-Aktivierung durch AngII scheint damit am ehesten zu einer verstärkten Mobilisierung der reifen Granulozyten zu führen. Erstaunlich ist, dass dauerhaft erhöhte Spiegel von AngII in Agt-überexprimierenden Tieren eine signifikante Erniedrigung der absoluten Lymphozyten- und Monozyten- und eine tendenzielle Erniedrigung der Granulozytenzahl bewirkten. *In vivo* wurde bisher gezeigt, dass AngII proliferationsfördernd auf die Hämatopoese nach Knochenmarksablation wirkt (Rodgers *et al.*, 2002). Die meisten verfügbaren Daten bezüglich der Wirkung von AngII auf hämatopoetische Progenitorzellen wurden durch *in vitro* durchgeführte Versuche gewonnen. Dabei wurde AngII größtenteils ein stimulierender Effekt auf die Zellen zugeschrieben. Es gibt jedoch auch widersprüchliche Daten, die zeigen, dass AngII unter bestimmten Umständen die Zellproliferation hemmt (Rodgers *et al.*, 2000; Brunet *et al.*, 2002). Zunächst müsste als weiteres Experiment eine Knochenmarksanalyse der Agt-überexprimierenden Tiere erfolgen um zu überprüfen, ob sich auch auf Ebene der Progenitorzellen ebenfalls eine Verminderung der Zellpopulation nachweisen lässt. Sollte dies so sein, so kann die Wirkung von AngII mit einem Langzeiteffekt im Sinne einer Proliferationshemmung früher Progenitorzellen interpretiert werden. Möglicherweise besteht dabei ein Zusammenhang mit der bei diesen Tieren gleichzeitig ausbleibenden Erythrozytose, die eigentlich bei erhöhten AngII-Plasmaspiegeln zu erwarten wäre. Vergleicht man diesen Langzeiteffekt mit dem der Agt-defizienten Tiere, so stimmen auch diese mit der Theorie der proliferationshemmenden Wirkung von AngII überein, da es bei den Tieren zu einer Erhöhung der Lympho-, Granulo- und Monozytenzahl kam (Abb. 5). Im Widerspruch dazu steht jedoch die erniedrigte Erythrozytenzahl, da dieser Effekt, wenn er sich auf der Ebene der frühen Progenitorzellen

abspielt, im gleichen Maße alle Blutzellen betreffen sollte. Um genauere Aussagen über die Ursache der erhöhten Leukozytenzahl in Agt-defizienten Tieren zu erhalten, könnte auch hier eine Charakterisierung des Knochenmarks mit Quantifizierung der frühen und determinierten Progenitorzellen weiteren Aufschluss geben.

Weiterhin stellt sich die Frage, über welche Rezeptoren der langfristige proliferationshemmende Effekt von AngII vermittelt wird. Die Blutbildanalysen der AT1a/AT1b-Doppel-Knockout-Mäuse zeigten eine hochsignifikante Erhöhung aller drei gemessenen leukozytären Zellreihen gegenüber dem Wildtyp und sind damit vereinbar mit der These eines proliferationshemmenden Effekts durch AngII, der über den AT1-Rezeptor vermittelt wird. Bei zusätzlichem Wegfall des AT2-Rezeptors in den Triple-Knockout-Tieren blieb die Leukozytenzahl dagegen unverändert. Wenn AngII also langfristig zu einer Suppression hämatopoetischer Progenitorzellen führt, so müsste dieser Effekt AT1-vermittelt sein, während der AT2-Rezeptor eine antagonistische Rolle einnimmt, sodass es bei den Triple-Knockout-Tieren zu einem Ausgleich der jeweiligen Effekte kommt. Um diese These weiter zu verfolgen, sollten, wie bereits erwähnt, zunächst FACS-Analysen der Angiotensinogen-defizienten und überexprimierenden Tiere und der AT1-Knockout-Tiere erfolgen um zu bestimmen, auf welcher Stufe der Hämatopoese die hemmende Wirkung von AngII erfolgt. Eine Analyse des Blutbildes von AT2-Knockout-Tieren sollte helfen, die Rolle des AT2-Rezeptors klarer zu bestimmen.

#### **5.1.5. Keine eindeutig nachweisbaren Einflüsse durch AngII auf die Thrombozytenzahl**

Die Wirkung von AngII auf die Thrombozyten geht aus den vorliegenden Ergebnissen nicht klar hervor und die Ergebnisse können auf verschiedene Weise ausgelegt werden. Dauerhaft erhöhte AngII-Spiegel in transgenen Mäusen oder der komplette Wegfall von AngII in Angiotensinogen-defizienten Tieren führten zunächst zu keinerlei Veränderungen. Wurde im 10-tägigen pharmakologischen Experiment jedoch AngII mit einem AT1- oder AT2-Rezeptorblocker verabreicht, so führte dies im direkten Vergleich jeweils zu einer signifikanten Erniedrigung der Thrombozytenzahl (Abb. 20). Die Blutbilder der AT1-/ AT2-Knockout-Tiere zeigten im Gegensatz dazu keinerlei Tendenzen zur Erniedrigung der Thrombozytenzahl (Abb. 9). Es handelt sich also um einen kurzfristigen Effekt, der sich vermutlich in den Endstadien der Produktion der Thrombozyten abspielt bzw. durch verminderte Ausschüttung oder verstärkten Abbau der Thrombozyten zustande kommt, da keine der anderen Zellreihen ein ähnliches Muster aufweisen. Einerseits wäre es möglich,

dass eine AngII-Infusion keinen Effekt auf die Thrombozyten hat, die Blockade des AT1- bzw. AT2-Rezeptors in Kombination mit AngII jedoch die Zahl der Thrombozyten senkt. Eine alternative Leseart dieser Ergebnisse wäre die Hypothese, dass AngII zu einer Erniedrigung der Thrombozytenzahl führt, da sich diese bei zusätzlicher AT1- bzw. AT2-Blockade nur signifikant von der Kontrollgruppe, jedoch nicht von der AngII-Gruppe unterschied. So lässt sich die Erniedrigung unter AT1-, AT2- und Mas-Rezeptorblockade damit erklären, dass die Antagonisten keinen Effekt auf die Wirkung von AngII haben. Thrombopenien durch AngII, AT1-Blocker-Therapie oder ACE-Hemmer wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Da die AngII/AT1-Achse bei fehlenden Langzeiteffekten keinen herausragenden Einfluss auf die Thrombozyten zu nehmen scheint, widmet sich diese Diskussion vor allem der Wirkung von AngII auf die Erythro- und Leukozyten.

## **5.2. Der Einfluss der Ang-(1-7)/Mas-Achse auf das Blutbild**

### **5.2.1. Die Rolle des Mas-Rezeptors**

Mit wachsenden Kenntnissen über die Wirkung von Ang-(1-7) rückte der Mas-Rezeptor ins Licht der Aufmerksamkeit. Die Arbeitsgruppen von Santos und Walther identifizierten diesen 2003 als funktionellen Rezeptor von Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2003). Bisherige Forschungsergebnisse, die sich wiederum vorwiegend mit der Funktion des Mas-Rezeptors im kardiovaskulären Gebiet beschäftigen, postulieren, dass eine Vielzahl von Ang-(1-7)-Effekten wie Vasodilatation, Diurese und Natriurese, Stimulation von NO und Vasopressin-Ausschüttung über den Mas-Rezeptor vermittelt werden (Iwai und Horiuchi, 2009). Auch die anti-proliferative und anti-fibrotische Wirkung von Ang-(1-7) scheint durch den Mas-Rezeptor mediert zu werden. So wurde beschrieben, dass Mas-Defizienz zu Herzinsuffizienz und Mikroalbuminurie in Mas-knockout-Mäusen führt (Pinheiro *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2006). Neben seiner Rolle als funktioneller Rezeptor für Ang-(1-7) ist über den Mas-Rezeptor bekannt, dass er über Bildung eines hetero-oligomeren Komplexes mit dem AT1-Rezeptor die Funktion des AT1-Rezeptors antagonisieren kann (Kostenis *et al.*, 2005). Gleichzeitig konnte von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Mas eine konstitutive Aktivität hat (Kostenis *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2005). Aufgrund dieser offensichtlich komplexen Wirkungsweisen des Mas-Rezeptors sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob der Rezeptor über Interaktion mit dem AT1-Rezeptor bzw. als funktioneller Rezeptor von Ang-(1-7) in die Regulation der Hämatopoese eingreift. Da das Ang-(1-7) hier laut des derzeitigen Forschungsstandes im Gegensatz zum kardiovaskulären



Gebiet keine antagonistische Stellung zu AngII einnimmt (Rodgers *et al.*, 2002), stellt sich die Frage, welche Signifikanz die konstitutive Aktivität des Mas-Rezeptors bzw. die funktionelle Antagonisierung des AT1-Rezeptor in diesem Zusammenhang haben. Durch Blockierung des Mas-Rezeptors mit A779 und mithilfe von Mas-Knockout-Tieren, deren Blutbild sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter Stimulation des RAS durch AngII und Ang-(1-7) analysiert wurde, sollte untersucht werden, ob sich die Rolle des Mas-Rezeptors im Verhältnis zu AT1-Rezeptor, AngII und Ang-(1-7) herauslesen lässt.

#### **5.2.1.1. Mögliche Ang-(1-7)-unabhängige Effekte von Mas auf die Erythropoese**

Bei Betrachtung des Blutbildes Mas-defizienter Tiere lässt sich zunächst feststellen, dass entsprechend der Versuche mit einer dreiwöchigen Behandlung mit Ang-(1-7) auch der Mas-Rezeptor langfristig keinen Einfluss auf die Erythropoese zu nehmen scheint (s. Kapitel 4.3.1). Im pharmakologischen Experiment mit zehntägiger AngII-Infusion, dessen Ergebnisse in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben werden, führte eine Blockierung des Mas-Rezeptors durch A779 ohne gleichzeitige Gabe von AngII dagegen zu einer signifikanten Erythrozytose. Diese war nicht so stark ausgeprägt wie die durch AngII hervorgerufene Erythrozytose, aber auch nicht signifikant niedriger. Die kombinierte Gabe von AngII und A779 brachte keinen additiven Effekt (Kapitel 4.2.2.1). Beim parallelen Versuchsaufbau mit Mas-Knockout-Tieren blieb die Erythrozytose bei alleiniger Gabe von A779 hingegen aus (Abb. 29), sodass angenommen werden kann, dass diese Erythrozytose durch eine fehlende Suppression durch den Mas-Rezeptor hervorgerufen wurde. Der Mas-Rezeptor muss also in diesem Zusammenhang, d.h. in der Regulation der Erythropoese, antagonistisch zu AngII wirken. Mit dieser Theorie sollte man außerdem erwarten, dass eine zweiwöchige AngII-Behandlung bei den Mas-Knockout-Mäusen zu einer stärker ausgeprägten Erythrozytose führt als bei Wildtypen. Dies war jedoch bei diesen Experimenten nicht der Fall (Abb. 29). Weiter wäre bei einer hemmenden Wirkung des Mas-Rezeptors möglich, dass es im Falle einer Stimulierung des Mas-Rezeptors durch Ang-(1-7) zu einer Anämie kommt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Ang-(1-7)-Behandlung von wildtypischen Mäusen und Tieren mit Zustand nach Herzinfarkt führten jeweils zu keiner Senkung der Erythrozytenzahl (Kapitel 4.3.3.1 und 4.3.4.1). Dies schließt eine mögliche antagonistische Wirkung des Mas-Rezeptors gegenüber AngII jedoch nicht aus, da diese sich unabhängig von Ang-(1-7) abspielen könnte. So wäre ein Erklärungsansatz, dass die Interaktion mit dem AT1-Rezeptor für den antagonistischen Effekt verantwortlich ist. Allerdings müsste man dann erwarten, dass das Fehlen des Rezeptors durch Gendeletion zu sichtbaren Effekten, d.h. in diesem Fall dem Wegfall der hemmenden Wirkung durch Mas auf den AT1-Rezeptor, führen sollte. Das in dieser Arbeit analysierte

basale Blutbild von Mas-Knockout-Tieren wies jedoch keine erhöhte Erythrozytenzahl auf (Abb. 24), und wie bereits zuvor erwähnt, führte auch exogenes AngII in Mas-Knockout-Tieren ebenfalls zu keiner verstärkten Erythrozytose (Abb. 29). Andererseits ist es möglich, dass die fehlende supprimierende Wirkung von Mas durch Gendeletion langfristig ausgeglichen wird, da die Erythropoese ein fein reguliertes System ist, in das viele weitere Faktoren eingreifen. In der FACS-Analyse der Mas-Knockout-Tiere nach AngII-Behandlung zeigte sich eine Verschiebung der determinierten Vorläuferzellen hin zu den MEP, die im parallelen Versuchsaufbau mit wildtypischen Mäusen nicht zu beobachten war (Abb. 36 und 22). Da sich bei den Wildtypen unter AngII-Behandlung auf dieser Ebene nichts veränderte, könnte dies als Hinweis gedeutet werden, dass es neben dem vermuteten Angriffspunkt auf der Ebene der Erythrozytenvorläufer AngII die Erythropoese noch auf einer zweiten, früheren Entwicklungsstufe beeinflusst, modifiziert durch den Mas-Rezeptor. Bei pharmakologischer Blockade von Mas mit A779 führte die AngII-Behandlung jedoch nicht zu einer signifikanten Verschiebung zugunsten der MEP (Abb. 23), sodass diese Theorie nicht ausreichend untermauert werden kann.

Eine 10-tägige Behandlung mit AngII führte sowohl in Tieren mit Defizienz des Mas-Rezeptors als auch in Wildtypen zu einer Erythrozytose. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass eine AT1-Blockade in den Mas-Knockout-Tieren weniger effektiv war als in den wildtypischen Tieren, denn in Mas-Knockout-Tieren konnte Irbesartan die Wirkung von AngII nicht komplett aufheben (vgl. Kapitel 4.2.2.1 und 4.3.2.2.1). So unterschieden sich der Hämatokrit und der Hämoglobingehalt bei AngII-Infusion und gleichzeitiger AT1-Blockade nicht signifikant von der Gruppe mit AngII. Der Hämatokrit in der Gruppe mit AngII-Infusion und gleichzeitiger AT1-Blockade war außerdem gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Für dieses Phänomen kann man verschiedene Erklärungsansätze heranziehen. Zum einen könnte der Mas-Rezeptor, wie bereits im vorigen Abschnitt diskutiert, die Wirkung des AT1-Rezeptors modulieren – seine Defizienz könnte beispielsweise die Bindungsaffinität von Irbesartan verändern, wodurch die Blockierung des AT1-Rezeptors durch Irbesartan weniger effektiv würde. Zum anderen wurde bereits beschrieben, dass AT1-Antagonisten die Aktivität und Expression der ACE2 in der Aorta und im Myokard von Ratten erhöhen und es damit zu einer verstärkten Metabolisierung von AngII zu Ang-(1-7) kommt (Ferrario *et al.*, 2005). Ginge man davon aus, dass Ang-(1-7) in diesem Fall die Wirkung von AngII antagonisiert, so könnte bei Mas-Defizienz die Effektivität der AT1-Blockade durch Irbesartan herabgesetzt werden, da ein Teil der Wirkung durch die AT1-Blockade, nämlich die Hochregulation von ACE2 und damit die verstärkte Bildung von Ang-(1-7), wirkungslos würde. Die Rolle von

Ang-(1-7) im Rahmen dieser Beobachtungen ist jedoch fragwürdig, da bei Behandlung mit Ang-(1-7) kein hemmender Effekt auf die Erythropoese festgestellt werden konnte. Man muss dementsprechend annehmen, dass die Effekte von Mas Ang-(1-7)-unabhängig sind, und damit würde der zweite Erklärungsansatz wegfallen. Zieht man den ersten Erklärungsansatz, also die Bildung eines hetero-oligomeren Komplexes von AT1- und Mas-Rezeptor in Betracht, so spricht dafür, dass sowohl eine Behandlung mit A779 in Wildtypen zu einer Erythrozytose führt, als auch eine Behandlung mit dem AT1-Blocker in Mas-Knockout-Tieren die durch AngII hervorgerufene Erythrozytose nicht unterbinden kann. Im Rahmen dieses Erklärungsansatzes könnte man andererseits erwarten, dass es bei AngII-Behandlung von Mas-Knockout-Tieren zu einem additiven Effekt kommen sollte, genauso wie bei der Verabreichung von A779 zu AngII. Beides konnte bei den Experimenten dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Möglicherweise führt die Behandlung mit AngII bereits zu einer maximal möglichen Neubildung von Erythrozyten, sodass es zu einem *ceiling*-Effekt kommt und ein additiver Effekt deshalb nicht mehr möglich ist, weil er die Kapazitäten der Erythropoese übersteigen würde.

#### **5.2.1.2. Die Auswirkung der Mas-Defizienz auf die Leukozytenzahl**

Mas-Defizienz führte sowohl bei der myeloiden als auch der lymphoiden Zelllinie zu einer basalen Erhöhung der Zellzahlen (Abb. 25). Im Gegensatz dazu zeigten Mas-defiziente Tiere, die als Kontrollgruppe im Experiment mit 21-tägiger Ang-(1-7)-Behandlung dienten, keine klar erhöhten Leukozytenzahlen (Abb. 39). Ursächlich dafür könnte die Reaktion der Tiere auf die 21-tägige Behandlung mit täglichen Injektionen von Kochsalzlösung sein, die sowohl körperlichen als auch psychischen Stress auslösen und somit zu Veränderungen des Immunsystems führen kann. Die kurzzeitige Blockierung des Mas-Rezeptors durch A779 führte wie im vorigen Kapitel beschrieben zu einer Erythrozytose, hatte aber weder alleine noch in Kombination mit einer AngII-Infusion einen Effekt auf die Leukozytenzahl (Kapitel 4.2.2). Auch bei der Knochenmarksanalyse mittels Durchflusszytometrie zeigten sich nach 10-tägiger Behandlung mit A779 keine Veränderungen in der Anzahl der multipotenten Progenitorzellen oder im Verhältnis der GMP-/ MEP-Populationen zueinander (Kapitel 4.2.3). So scheint die kurzfristige Blockierung des Mas-Rezeptors nur auf die determinierten Vorläuferzellen der Erythropoese zu wirken. Die Erhöhung der myeloiden und lymphoiden Leukozyten in Mas-Knockout-Mäusen würde für eine hemmende Wirkung des Mas-Rezeptors sprechen, die bei Defizienz wegfällt und damit zu einer verstärkten Zellproliferation auf einer Entwicklungsstufe vor Trennung der lymphoiden und myeloiden Zelllinien führt. Dieser Effekt lässt sich aber nur bei den unbehandelten Mas-Knockout-

Tieren und nicht bei 10-tägiger pharmakologischer Blockade des Rezeptors mit A779 nachweisen (Kapitel 4.2.2.2). Des Weiteren steht im Gegensatz zu dieser Beobachtung sowohl die Tatsache, dass AngII in Mas-Knockout-Tieren zu einer tendenziellen Verringerung des Anteils multipotenter Progenitorzellen führt, als auch die Beobachtung, dass Ang-(1-7) zumindest unter pathologischen Umständen zu einem proliferationsfördernden Effekt, also einer Erhöhung der Leukozytenzahl führt, was ebenfalls mit Beschreibungen in der Literatur übereinstimmt (Rodgers *et al.*, 2002). Die Möglichkeit, dass die Effekte des Mas-Rezeptors Ang-(1-7)-unabhängig und stattdessen durch Modulation des AT1-Rezeptors bzw. durch seine konstitutive Aktivität zu erklären sind, muss wiederum in Betracht gezogen werden. Die bisher vorherrschende Auffassung, AngII beeinflusse die Hämatopoese auf der Stufe der frühen Progenitorzellen und dieser Effekt werde über den AT1-Rezeptor vermittelt, würde mit der Hypothese zusammenpassen, dass der Mas-Rezeptor durch Bildung von hetero-oligomeren Komplexen mit dem AT1-Rezeptor diesen hemmt. Seine Defizienz würde damit zu einem verstärkten AT1-vermittelten Effekt von AngII führen. Generell ließ sich bei den pharmakologischen Versuchen jedoch keine proliferationsfördernde Wirkung von AngII auf Progenitorzellen und Leukozyten beobachten, sodass der Blick auf die mit AngII behandelten Mas-Knockout-Mäuse und die Wildtypen mit gleichzeitiger AngII- und A779-Behandlung nicht weiter wegweisend zur Untermauerung dieser Theorie ist (Kapitel 4.3.2.2.2). Die Tatsache, dass AngII in Mas-Knockout-Mäusen sogar tendenziell zu einer Verringerung des Anteils der frühen Progenitorzellen führt, müsste weiter untersucht werden. Eine Erhöhung der Fallzahlen in diesem Versuchsaufbau könnte klären, ob der Unterschied letztendlich Signifikanz erreicht. Zusätzlich besteht die Frage, ob die Erniedrigung des Anteils früher Progenitorzellen nicht der Erhöhung anderer Populationen im Knochenmark geschuldet ist. Am naheliegendsten wäre dabei eine Erhöhung der erythrozytären Population. Die bereits angesprochene Knochenmarksfärbung mit TER119 und CD71 wäre zur Klärung dieser Frage ebenfalls hilfreich.

Des Weiteren bleibt zu erforschen, welche Rolle der Mas-Rezeptor im Zusammenhang mit der Wirkung von Ang-(1-7) einnimmt und ob die Effekte, die durch Ang-(1-7) im pathologischen Zustand hervorgerufen wurden, über den Mas-Rezeptor vermittelt werden. Dafür könnte man eine Versuchsreihe mit Mas-Knockout-Tieren, die nach Myokardinfarkt mit Ang-(1-7) behandelt werden, entsprechend des in 4.3.4. beschriebenen Versuchs durchführen, um zu zeigen, ob die in 5.2.2 diskutierten Ang-(1-7)-Effekte über den Mas-Rezeptor vermittelt werden.

### **5.2.1.3. Hinweise für Mas-vermittelte Effekte auf die Thrombozytenzahl**

In der Literatur wurde bisher noch nicht beschrieben oder nachgewiesen, dass Komponenten des RAS einen Einfluss auf die Thrombozytenzahl haben. Es gibt jedoch Daten, die zeigen, dass die Funktion der Thrombozyten durch den Mas-Rezeptor beeinflusst wird - wie bereits in Abschnitt 5.2.1 erwähnt, zeigten Fraga-Silva *et al.* (2008), dass der Mas-Rezeptor über NO-Freisetzung antithrombotische Wirkung hat. Sowohl Mas-Defizienz als auch Mas-Blockade mit A779 führen laut dieser Arbeitsgruppe zu einer verkürzten Blutungszeit. In dieser Arbeit war die Thrombozytenzahl in Mas-Knockout-Tieren signifikant erniedrigt (Kapitel 4.3.1.3), was sich allerdings wieder bei der in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Versuchsreihe mit Ang-(1-7)-Injektionen bei der Mas-Knockout-Kontrollgruppe nicht nachweisen ließ (Abb. 40). Eine kurzfristige Mas-Rezeptorblockade mit A779 führte zwar nicht alleine, jedoch mit AngII-Infusion zu einer Verringerung der Thrombozytenzahl (Abb. 20). Im Gegensatz dazu hatte eine AngII-Infusion in Mas-Knockout-Tieren keinen Effekt (Kapitel 4.3.2.2.3). Ang-(1-7) hatte in gesunden Tieren keinen Einfluss auf die Thrombozyten (Kapitel 4.3.3.3). Bei Tieren mit 3-wöchiger Ang-(1-7)-Behandlung nach Myokardinfarkt erhöhte sich hingegen die Thrombozytenzahl signifikant (Abb. 43), sodass die Vermutung nahe liegt, dass dieser Effekt über den Mas-Rezeptor vermittelt wird und es bei dessen Defizienz zu einer Thrombozytopenie nach Myokardinfarkt kommt.

### **5.2.2. Die Wirkung von Ang-(1-7) im gesunden und pathologischen Modell**

Seit mehr als zwei Jahrzehnten wird die Rolle des Ang-Metaboliten Ang-(1-7) erforscht. Die meisten Publikationen beschäftigen sich mit dessen Wirkung im kardiovaskulären Bereich, wobei postuliert wird, dass das Peptid eine entscheidende Rolle als Gegenspieler zu AngII einnimmt (Ferreira *et al.*, 2010). Auch im Bereich der Hämatopoese wurde nachgewiesen, dass Ang-(1-7) die Zellproliferation beeinflusst. Im Gegensatz zum kardiovaskulären System scheint Ang-(1-7) in diesem Fall AngII nicht zu antagonisieren, denn von beiden Peptiden gibt es Hinweise auf eine proliferationsfördernde Wirkung. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Ang-(1-7) die Proliferation humaner CD34<sup>+</sup> HPC *in vitro* stimuliert (Heringer-Walther *et al.*, 2009). Die gleiche Arbeitsgruppe transplantierte Mäusen CD34<sup>+</sup> HPC nach Knochenmarksablation durch Bestrahlung. Eine anschließende 28-tägige Behandlung mit Ang-(1-7) führte zu einer verstärkten Proliferation dieser Zellen in Knochenmark und Milz. Auch Rodgers *et al.* (2003) demonstrierten einen proliferationssteigernden Effekt von Ang-(1-7) und AngII auf die Regeneration des Knochenmarks nach Ablation durch Chemotherapie. Sämtliche Zelllinien wiesen dabei eine erhöhte Wachstumsrate auf, die dosisabhängig anstieg.

Nach Behandlung des Knochenmarks mit dem stammzelltoxischen Cyclophosphamid führte Ang-(1-7) ebenfalls zu einer verstärkten Proliferationsrate der Leukozyten und myeloiden Progenitorzellen. Daher vermuten Rodgers *et al.* (2003) die frühen hämatopoetischen Progenitorzellen als möglichen Wirkungsort des Ang-(1-7).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei Versuche zur Wirkung von Ang-(1-7) durchgeführt. Der erste Versuchsaufbau sollte den Effekt an gesunden Mäusen, der zweite an Mäusen mit induziertem Myokardinfarkt untersuchen.

Die Hypothese, dass Ang-(1-7) durch eine Stimulation der Progenitorzellen zu einer Erhöhung aller Zellzahlen im Blut führt, konnte nicht bestätigt werden. Es zeigte sich nach Behandlung mit Ang-(1-7) keine Erhöhung der Erythrozytenzahlen in gesunden Tieren (Abb. 38). Auch bei den Leukozyten und Thrombozyten ließen sich keine Änderungen der Zellzahlen verzeichnen (Abb. 39). Damit lässt sich sicherlich nicht der Umkehrschluss ziehen, dass es ebenfalls zu keiner Stimulation der Hämatopoese in den frühen Stadien kam. Um dies nachzuweisen, wären weitere FACS-Analysen von Knochenmark bzw. der Nachweis einer erhöhten Proliferation mittels Zellkulturen notwendig.

Erstaunlich sind die Ergebnisse der Ang-(1-7)-Wirkung auf Mäuse nach Herzinfarkt. Zwar zeigte sich keine Änderung der Erythrozytenzahl, es zeigte sich jedoch eine signifikante Steigerung sowohl der myeloiden als auch der lymphoiden Zellreihen und der Thrombozyten. Dieser Effekt lässt sich nicht einer einfachen Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt zuschreiben, da sich die Gruppe der infarzierten Tiere mit Ang-(1-7)-Behandlung signifikant von der Myokardinfarkt-Gruppe mit Plazebo-Behandlung unterschied. Da in gesunden Tieren keine Veränderungen des Blutbildes durch Ang-(1-7) beobachtet wurden, muss der pathologische Zustand zu einer Modifizierung der Wirkung von Ang-(1-7) führen. Abgesehen von der Untersuchung des Blutbildes wurden bei den Tieren nach Herzinfarkt das Ausmaß der Herzinsuffizienz und die Morphologie des infarzierten Herzmuskels untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass zirkulierendes Ang-(1-7) nach Myokardinfarkt zu einer verstärkten Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen (c-kit-positive Zellen) und endothelialen Progenitorzellen (VEGF-positive Zellen) in den untergegangenen Herzmuskel führt. Da diese Tiere post Myokardinfarkt ebenfalls eine verbesserte linksventrikuläre Funktion aufwiesen, lässt sich vermuten, dass der Vorgang der Revaskularisierung und des Remodellings im infarzierten Gebiet durch die verstärkte Einwanderung der endothelialen und hämatopoetischen Progenitorzellen positiv beeinflusst wurde, da gleichzeitig demonstriert wurde, dass kardiales Ang-(1-7) diesen positiven Effekt auf das infarzierte Myokard nicht hat (Wang *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang könnte die erhöhte Zahl

der im Blut zirkulierenden Leuko- und Thrombozyten im Rahmen einer Mobilisierung von Zellen aus dem Knochenmark erfolgt sein. Dass dabei die Erythrozyten nicht betroffen sind, könnte damit erklärt werden, dass es sich in diesem Fall um eine durch Ang-(1-7) über Zytokine medierte Mobilisierung der Knochenmarkszellen im Gegensatz zu einer proliferationsfördernden Wirkung handelt. In diesem Fall wäre es wiederum interessant, das Knochenmark von Tieren mit Myokardinfarkt und Ang-(1-7)-Behandlung im Vergleich mit Tieren ohne Myokardinfarkt und Tieren mit Myokardinfarkt ohne anschließende Ang-(1-7) auf mögliche Veränderungen der Zellpopulationen hin zu untersuchen. Dabei wäre vor allem von Interesse, die frühen Progenitorzellen und die differenzierten Zellenreihen zu untersuchen, um einen proliferativen Effekt auszuschließen.

Die Thrombozytenzahl erhöhte sich unter Ang-(1-7)-Behandlung post Myokardinfarkt um etwa 60% im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen nach Herzinfarkt. Da Ang-(1-7) durch seine nachgewiesenen kardioprotektiven und hämatoproliferativen Effekte zur Zeit als potentiell Therapeutikum diskutiert wird (Iwai und Horiuchi, 2009), könnte eine Thrombozytose eine signifikante Nebenwirkung darstellen, da sie möglicherweise ein erhöhtes Thromboserisiko mit sich bringen kann. Griesshammer *et al.* (1999) untersuchten die klinische Signifikanz einer Thrombozytose auf das Risiko eines thrombembolischen Ereignisses hin. Sie unterschieden dabei zwischen primären und sekundären Thrombozytosen. Als primäre Thrombozytosen wird die Gruppe der klonalen Thrombozytosen bezeichnet, die im Rahmen myelodysplastischer oder myeloproliferativer Krankheiten auftreten, während die sekundären als reaktive Thrombozytosen nach Gewebetrauma, bei Inflammation oder Malignität zu verstehen sind. Die Studie zeigte, dass Patientin mit primärer Thrombozytose eine signifikant höhere Inzidenz von arteriellen und venösen thrombembolischen Ereignissen hatten (12,4%), während die Wahrscheinlichkeit eines thrombembolischen Ereignisses bei sekundären Thrombozytosen äußerst gering war (1,6%). Die Fälle in der Gruppe der sekundären Thrombozytosen, bei denen es zu einem thrombembolischen Ereignis kam, wiesen gleichzeitig noch andere thrombembolische Risikofaktoren wie eine vorangegangene Operation oder eine maligne Grundkrankung auf. Im Falle einer Thrombozytose unter Gabe von Ang-(1-7) ist das Risiko demnach kontextabhängig: Im gesunden Individuum sollte dies zu keinem erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse führen, soll das Peptid jedoch als Therapeutikum bei hämatologischen und kardialen Erkrankungen eingesetzt werden, erhöht sich das Risiko wieder im Zusammenhang mit den zugrunde liegenden Erkrankungen. Es gibt jedoch mittlerweile auch Publikationen, in denen demonstriert wurde, dass Ang-(1-7) die Plättchenaggregation hemmt und damit eine antithrombotische Wirkung ausübt. Über den

Mas-Rezeptor vermittelt Ang-(1-7) in Thrombozyten eine vermehrte Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung, das Stickstoffmonoxid wiederum führt zu einer verminderten Plättchenaggregation (Fraga-Silva *et al.*, 2008). So sollte eine Thrombozytose unter Ang-(1-7)-Therapie ein niedrigeres Risiko für ein thrombembolisches Ereignis mit sich führen, da Ang-(1-7) gleichzeitig aggregationshemmend auf die Thrombozyten wirkt. Diese Annahme muss jedoch zunächst experimentell überprüft werden.



## 6. Literaturverzeichnis

**Akishita, M., Ito, M., Lehtonen, J. Y. et al.** (1999) "Expression of the AT2 receptor developmentally programs extracellular signal-regulated kinase activity and influences fetal vascular growth". *J.Clin.Invest* **103**(1): 63-71.

**Aksu, S., Beyazit, Y., Haznedaroglu, I. C. et al.** (2006) "Over-expression of angiotensin-converting enzyme (CD 143) on leukemic blasts as a clue for the activated local bone marrow RAS in AML". *Leuk.Lymphoma* **47**(5): 891-896.

**Ambroz, C., Clark, A. J., und Catt, K. J.** (1991) "The mas oncogene enhances angiotensin-induced  $[Ca^{2+}]_i$  responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors". *Biochim.Biophys.Acta* **1133**(1): 107-111.

**Benninghoff, A. und Drenckhahn, D.** (2004) "Anatomie". 16. Auflage, Band 2

**Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S. et al.** (1992) "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**(7): 2804-2808.

**Bernstein, I. D., Andrews, R. G., und Zsebo, K. M.** (1991) "Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin- cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34+lin- cells cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". *Blood* **77**(11): 2316-2321.

**Beyazit, Y., Aksu, S., Haznedaroglu, I. C. et al.** (2007) "Overexpression of the local bone marrow renin-angiotensin system in acute myeloid leukemia". *J Natl.Med.Assoc.* **99**(1): 57-63.

**Brunet, d. I. G., Ivanovic, Z., Leprivey-Lorgeot, V. et al.** (2002) "Angiotensin II that reduces the colony-forming ability of hematopoietic progenitors in serum free medium has an inverse effect in serum-supplemented medium". *Stem Cells* **20**(3): 269-271.

**Cesari, M., Rossi, G. P., und Pessina, A. C.** (2002) "Biological properties of the angiotensin peptides other than angiotensin II: implications for hypertension and cardiovascular diseases". *J Hypertens.* **20**(5): 793-799.

**Charrier, S., Michaud, A., Badaoui, S. et al.** (2004) "Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells". *Blood* **104**(4): 978-985.

**Clark, S. C. und Kamen, R.** (1987) "The human hematopoietic colony-stimulating factors". *Science* **236**(4806): 1229-1237.

**Cole, J., Ertoy, D., Lin, H. et al.** (2000) "Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice". *J Clin.Invest* **106**(11): 1391-1398.

- Collister, J. P. und Hendel, M. D.** (2003) "The role of Ang (1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats". *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.* **4**(3): 176-179.
- Comte, L., Lorgeot, V., Volkov, L. et al.** (1997) "Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril on blood haematopoietic progenitors and acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro concentrations". *Eur.J Clin.Invest* **27**(9): 788-790.
- Crabos, M., Bertschin, S., Buhler, F. R. et al.** (1993) "Identification of AT1 receptors on human platelets and decreased angiotensin II binding in hypertension". *J Hypertens.Suppl* **11**(5): S230-S231.
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T. et al.** (2000) "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors". *Pharmacol.Rev.* **52**(3): 415-472.
- De Simone, G., Devereux, R. B., Chien, S. et al.** (1990) "Relation of blood viscosity to demographic and physiologic variables and to cardiovascular risk factors in apparently normal adults". *Circulation* **81**(1): 107-117.
- Dinh, D. T., Frauman, A. G., Johnston, C. I. et al.** (2001) "Angiotensin receptors: distribution, signalling and function". *Clin.Sci.(Lond)* **100**(5): 481-492.
- Ducloux, D., Saint-Hillier, Y., und Chalopin, J. M.** (1997) "Effect of losartan on haemoglobin concentration in renal transplant recipients--a retrospective analysis". *Nephrol.Dial.Transplant.* **12**(12): 2683-2686.
- Ferrario, C. M.** (1998) "Angiotensin-(1-7) and antihypertensive mechanisms". *J Nephrol.* **11**(6): 278-283.
- Ferreira, A. J., Santos, R. A., Bradford, C. N. et al.** (2010) "Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases". *Hypertension* **55**(2): 207-213.
- Ferreira, A. J., Shenoy, V., Yamazato, Y. et al.** (2009) "Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension". *Am.J Respir.Crit Care Med.* **179**(11): 1048-1054.
- Freudenthaler, S., Benohr, P., Grenz, A. et al.** (2003) "Do alterations of endogenous angiotensin II levels regulate Epo production in humans?". *Br.J Clin.Pharmacol.* **56**(4): 378-387.
- Fyhrquist, F. und Saijonmaa, O.** (2008) "Renin-angiotensin system revisited". *J Intern.Med.* **264**(3): 224-236.
- Gao, L., Wang, W., Wang, W. et al.** (2008) "Effects of angiotensin type 2 receptor overexpression in the rostral ventrolateral medulla on blood pressure and urine excretion in normal rats". *Hypertension* **51**(2): 521-527.
- Gembardt, F., Heringer-Walther, S., van Esch, J. H. et al.** (2008) "Cardiovascular phenotype of mice lacking all three subtypes of angiotensin II receptors". *FASEB J* **22**(8): 3068-3077.

- Grady, E. F., Sechi, L. A., Griffin, C. A. et al.** (1991) "Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus". *J.Clin.Invest* **88**(3): 921-933.
- Harding, J. W., Wright, J. W., Swanson, G. N. et al.** (1994) "AT4 receptors: specificity and distribution". *Kidney Int.* **46**(6): 1510-1512.
- Haznedaroglu, I. C., Tuncer, S., und GURSOY, M.** (1996) "A local renin-angiotensin system in the bone marrow". *Med.Hypotheses* **46**(6): 507-510.
- Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E. et al.** (1995) "Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice". *Nature* **377**(6551): 744-747.
- Heringer-Walther, S., Eckert, K., Schumacher, S. M. et al.** (2009) "Angiotensin-(1-7) stimulates hematopoietic progenitor cells in vitro and in vivo". *Haematologica* **94**(6): 857-860.
- Hilchey, S. D. und Bell-Quilley, C. P.** (1995) "Association between the natriuretic action of angiotensin-(1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I2 release". *Hypertension* **25**(6): 1238-1244.
- Horiuchi, M., Hayashida, W., Akishita, M. et al.** (1999) "Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk". *Circ.Res.* **84**(8): 876-882.
- Hubert, C., Savary, K., Gasc, J. M. et al.** (2006) "The hematopoietic system: a new niche for the renin-angiotensin system". *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.* **3**(2): 80-85.
- Huckle, W. R. und Earp, H. S.** (1994) "Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II". *Prog.Growth Factor Res.* **5**(2): 177-194.
- Hunyady, L. und Catt, K. J.** (2006) "Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II". *Mol.Endocrinol.* **20**(5): 953-970.
- Ichiki, T. und Inagami, T.** (1995) "Expression, genomic organization, and transcription of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene". *Circ.Res.* **76**(5): 693-700.
- Ito, M., Oliverio, M. I., Mannon, P. J. et al.** (1995) "Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**(8): 3521-3525.
- Iwai, N., Inagami, T., Ohmichi, N. et al.** (1996) "Renin is expressed in rat macrophage/monocyte cells". *Hypertension* **27**(3 Pt 1): 399-403.
- Iyer, S. N., Yamada, K., Diz, D. I. et al.** (2000) "Evidence that prostaglandins mediate the antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) during chronic blockade of the renin-angiotensin system". *J Cardiovasc.Pharmacol.* **36**(1): 109-117.
- Jackson, T. R., Blair, L. A., Marshall, J. et al.** (1988) "The mas oncogene encodes an angiotensin receptor". *Nature* **335**(6189): 437-440.
- Julian, B. A., Brantley, R. R., Jr., Barker, C. V. et al.** (1998) "Losartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, lowers hematocrit in posttransplant erythrocytosis". *J Am.Soc.Nephrol.* **9**(6): 1104-1108.

- Karamyan, V. T. und Speth, R. C.** (2007) "Enzymatic pathways of the brain renin-angiotensin system: unsolved problems and continuing challenges". *Regul.Pept.* **143**(1-3): 15-27.
- Kato, H., Ishida, J., Imagawa, S. et al.** (2005) "Enhanced erythropoiesis mediated by activation of the renin-angiotensin system via angiotensin II type 1a receptor". *FASEB J* **19**(14): 2023-2025.
- Keller, S. R., Davis, A. C., und Clairmont, K. B.** (2002) "Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis". *J Biol.Chem.* **277**(20): 17677-17686.
- Kim, S., Soltani-Bejnood, M., Quignard-Boulangé, A. et al.** (2006) "The adipose renin-angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal renin-angiotensin system". *J Biomed.Biotechnol.* **2006**(5): 27012-
- Kimura, S., Mullins, J. J., Bunnemann, B. et al.** (1992) "High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene". *EMBO J* **11**(3): 821-827.
- Lin, K., Chan, S. H., und Chan, J. Y.** (2001) "Tonic suppression of spontaneous baroreceptor reflex by endogenous angiotensins via AT(2) subtype receptors at nucleus reticularis ventrolateralis in the rat". *Synapse* **40**(1): 85-94.
- Lochard, N., Silversides, D. W., van Kats, J. P. et al.** (2003) "Brain-specific restoration of angiotensin II corrects renal defects seen in angiotensinogen-deficient mice". *J Biol.Chem.* **278**(4): 2184-2189.
- Lokuta, A. J., Cooper, C., Gaa, S. T. et al.** (1994) "Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells". *J Biol.Chem.* **269**(7): 4832-4838.
- Loot, A. E., Roks, A. J., Henning, R. H. et al.** (2002) "Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats". *Circulation* **105**(13): 1548-1550.
- Machado, R. D., Santos, R. A., und Andrade, S. P.** (2000) "Opposing actions of angiotensins on angiogenesis". *Life Sci.* **66**(1): 67-76.
- Miller-Wing, A. V., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F. et al.** (1993) "Central angiotensin IV binding sites: distribution and specificity in guinea pig brain". *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **266**(3): 1718-1726.
- Mizuri, S., Hemmi, H., Arita, M. et al.** (2008) "Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls". *Am.J Kidney Dis.* **51**(4): 613-623.
- Mrug, M., Stopka, T., Julian, B. A. et al.** (1997) "Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors". *J Clin.Invest* **100**(9): 2310-2314.
- Muthalif, M. M., Benter, I. F., Uddin, M. R. 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): 388-398.

- Neves, L. A., Averill, D. B., Ferrario, C. M. et al.** (2003) "Characterization of angiotensin-(1-7) receptor subtype in mesenteric arteries". *Peptides* **24**(3): 455-462.
- Niimura, F., Labosky, P. A., Kakuchi, J. et al.** (1995) "Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation". *J Clin. Invest* **96**(6): 2947-2954.
- Nomura, S., Sugihara, T., Tomiyama, T. et al.** (1996) "Polycythaemia vera: response to treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor". *Eur.J Haematol.* **57**(1): 117-119.
- Nussberger, J., Brunner, D. B., Nyfeler, J. A. et al.** (2001) "Measurement of immunoreactive angiotensin-(1-7) heptapeptide in human blood". *Clin.Chem.* **47**(4): 726-729.
- Oliverio, M. I., Kim, H. S., Ito, M. et al.** (1998) "Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**(26): 15496-15501.
- Parker, A. N. und Pragnell, I. B.** (1995) "Inhibitors of haemopoiesis and their potential clinical relevance". *Blood Rev.* **9**(4): 226-233.
- Pinheiro, S. V., Ferreira, A. J., Kitten, G. T. et al.** (2009) "Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria". *Kidney Int.* **75**(11): 1184-1193.
- Reich, H. N., Oudit, G. Y., Penninger, J. M. et al.** (2008) "Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease". *Kidney Int.* **74**(12): 1610-1616.
- Reid, I. A., Morris, B. J., und Ganong, W. F.** (1978) "The renin-angiotensin system". *Annu.Rev.Physiol* **40**(377-410).
- Rell, K., Koziak, K., Jarzyo, I. et al.** (1994) "Correction of posttransplant erythrocytosis with enalapril". *Transplantation* **57**(7): 1059-1063.
- Roberts, K. A., Krebs, L. T., Kramar, E. A. et al.** (1995) "Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding sites and differential c-Fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats". *Brain Res.* **682**(1-2): 13-21.
- Rodgers, K., Xiong, S., und diZerega, G. S.** (2003) "Effect of angiotensin II and angiotensin(1-7) on hematopoietic recovery after intravenous chemotherapy". *Cancer Chemother.Pharmacol.* **51**(2): 97-106.
- Rodgers, K. E., Xiong, S., und diZerega, G. S.** (2002) "Accelerated recovery from irradiation injury by angiotensin peptides". *Cancer Chemother.Pharmacol.* **49**(5): 403-411.
- Rodgers, K. E., Xiong, S., Steer, R. et al.** (2000) "Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation". *Stem Cells* **18**(4): 287-294.
- Rodriguez-Campos, M., Kadarian, C., Rodano, V. et al.** (2000) "AT-1 receptor and phospholipase C are involved in angiotensin III modulation of hypothalamic noradrenergic transmission". *Cell Mol.Neurobiol.* **20**(6): 747-762.

- Rousseau-Plasse, A., Wdzieczak-Bakala, J., Lenfant, M. et al.** (1998) "Lisinopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, prevents entry of murine hematopoietic stem cells into the cell cycle after irradiation in vivo". *Exp.Hematol.* **26**(11): 1074-1079.
- Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., und Andrade, S. P.** (2000) "Angiotensin-(1-7): an update". *Regul.Pept.* **91**(1-3): 45-62.
- Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., Baracho, N. C. 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): 293-298.
- Santos, R. A., Castro, C. H., Gava, E. 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., Simoes e Silva AC, Maric, C. 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): 8258-8263.
- Savary, K., Michaud, A., Favier, J. et al.** (2005) "Role of the renin-angiotensin system in primitive erythropoiesis in the chick embryo". *Blood* **105**(1): 103-110.
- Sayitoglu, M., Haznedaroglu, I. C., Hatirnaz, O. et al.** (2009) "Effects of imatinib mesylate on renin-angiotensin system (RAS) activity during the clinical course of chronic myeloid leukaemia". *J Int.Med.Res.* **37**(4): 1018-1028.
- Schmidt, R., Lang, F., und Heckmann, M.** (2010) "Physiologie des Menschen". **31. Auflage**
- Strawn, W. B., Richmond, R. S., Ann, T. E. et al.** (2004) "Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells". *Br.J Haematol.* **126**(1): 120-126.
- Tallant, E. A., Ferrario, C. M., und Gallagher, P. E.** (2005) "Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor". *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **289**(4): H1560-H1566.
- Tanimoto, K., Sugiyama, F., Goto, Y. et al.** (1994) "Angiotensinogen-deficient mice with hypotension". *J Biol.Chem.* **269**(50): 31334-31337.
- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T. et al.** (1993) "Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists". *Pharmacol.Rev.* **45**(2): 205-251.
- Trask, A. J., Averill, D. B., Ganten, D. 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-H3024.
- van Esch, J. H., Gembardt, F., Sterner-Kock, A. et al.** (2010) "Cardiac phenotype and angiotensin II levels in AT1a, AT1b, and AT2 receptor single, double, and triple knockouts". *Cardiovasc.Res.* **86**(3): 401-409.

- Walther, T., Balschun, D., Voigt, J. P. et al.** (1998) "Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene". *J Biol.Chem.* **273**(19): 11867-11873.
- Walther, T., Wessel, N., Kang, N. et al.** (2000) "Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene". *Braz.J Med.Biol.Res.* **33**(1): 1-9.
- Wang, Y., Qian, C., Roks, A. J. et al.** (2010) "Circulating rather than cardiac angiotensin-(1-7) stimulates cardioprotection after myocardial infarction". *Circ.Heart Fail.* **3**(2): 286-293.
- Wright, J. W., Bechtholt, A. J., Chambers, S. L. et al.** (1996) "Angiotensin III and IV activation of the brain AT1 receptor subtype in cardiovascular function". *Peptides* **17**(8): 1365-1371.
- Wright, J. W., Mizutani, S., und Harding, J. W.** (2012) "Focus on Brain Angiotensin III and Aminopeptidase A in the Control of Hypertension". *Int.J Hypertens.* **2012**(124758-
- Wright, J. W., Stuble, L., Pederson, E. S. et al.** (1999) "Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning". *J Neurosci.* **19**(10): 3952-3961.
- Xu, P., Sriramula, S., und Lazartigues, E.** (2011) "ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good". *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **300**(4): R804-R817.
- Yatabe, J., Yoneda, M., Yatabe, M. S. et al.** (2011) "Angiotensin III stimulates aldosterone secretion from adrenal gland partially via angiotensin II type 2 receptor but not angiotensin II type 1 receptor". *Endocrinology* **152**(4): 1582-1588.
- Yeh, T. Y., Sbodio, J. I., Tsun, Z. Y. et al.** (2007) "Insulin-stimulated exocytosis of GLUT4 is enhanced by IRAP and its partner tankyrase". *Biochem.J* **402**(2): 279-290.
- Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C. et al.** (1986) "Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains". *Cell* **45**(5): 711-719.
- Zhu, M., Gelband, C. H., Moore, J. M. et al.** (1998) "Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid". *J Neurosci.* **18**(2): 679-686.

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Mai Viebahn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchungen zu Effekten des Renin-Angiotensin-Systems auf die Blutbildung selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sarah Mai Viebahn (geb. Schumacher) hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Heringer-Walther S, Eckert K, Schumacher S-M, Uharek L, Wulf-Goldenberg A, Gembardt F, Fichtner I, Schultheiss H-P, Rodgers K, and Walther T. Angiotensin-(1-7) stimulates hematopoietic progenitor cells in vitro and in vivo. *Haematologica* 2009.

Beitrag im Einzelnen: Assistenz in den Versuchen, Gewinnung von Blut und Knochenmarkszellen, Blutbildanalyse und FACS-Analyse.

Publikation 2: Wang Y., Qian C., Roks A., Westermann D., Schumacher S.-M., Escher F., Schoemaker R., Reudelhuber T.L., van Gilst W., Schultheiss H.-P., Tschöpe C., and Walther T. (2010). Circulating rather than cardiac angiotensin-(1-7) stimulates cardioprotection post myocardial infarction. *Circ. Heart Failure* 2010

Beitrag im Einzelnen: Assistenz in den Versuchen, Gewinnung von Blut und Knochenmarkszellen, Blutbildanalyse und FACS-Analyse.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin



## **8. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht



## 9. Publikationsliste

Publikation 1: Heringer-Walther S, Eckert K, Schumacher S-M, Uharek L, Wulf-Goldenberg A, Gembardt F, Fichtner I, Schultheiss H-P, Rodgers K, and Walther T. Angiotensin-(1-7) stimulates hematopoietic progenitor cells in vitro and in vivo. *Haematologica* 2009.

Publikation 2: Wang Y, Qian C, Roks A., Westermann D, Schumacher S-M, Escher F, Schoemaker R, Reudelhuber TL, van Gilst W, Schultheiss H-P, Tschöpe C, and Walther T (2010). Circulating rather than cardiac angiotensin-(1-7) stimulates cardioprotection post myocardial infarction. *Circ. Heart Failure* 2010.