

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum Hamburg
Klinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie
Prof. Dr. Stefan Blankenberg

Bedeutung des endogenen NO-Synthase Inhibitors asymmetrisches Dimethylarginin in der Pathogenese des arteriellen Hypertonus – Untersuchungen am Modell der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase1-transgenen Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Christine Elisabeth Schmitz
aus Münster

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.12.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. R. Böger

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Wenzel

Meinen Eltern

Burkhard und Gabrielle



INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	8
1.1 Der Blutdruck.....	8
1.1.1 Bedeutung und Regulation des Blutdruckes	8
1.1.2 Bedeutung der Niere bei der Regulation des Blutdruckes	9
1.1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	10
1.2 Der arterielle Hypertonus	12
1.2.1 Definition und Ätiologie.....	12
1.2.2 Hypertonusassoziierte Schäden an den Nieren	14
1.2.3 Hypertonusassoziierte Schäden am Herzen	15
1.2.4 Hypertonusassoziierte Schäden am Gefäßsystem.....	17
1.3 Bedeutung von NO im Rahmen der Gefäßhomöostase	17
1.4 Asymmetrisches Dimethylarginin.....	20
1.4.1 Funktion von ADMA und pathophysiologische Relevanz	20
1.4.2 Synthese von ADMA.....	21
1.4.3 Abbau von ADMA	22
1.4.4 Das Modell der hDDAH1-transgenen Maus.....	24
1.5 Ziel der Arbeit.....	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Versuche am hDDAH1-transgenen Mausmodell.....	28
2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung.....	28
2.1.2 Genotypisierung der Mäuse	28
2.1.3 Versuchsaufbau	31
2.1.4 Operationen	32
2.1.4.1 Einseitige Nephrektomie.....	33
2.1.4.2 Implantation der DOCA-Pellets.....	33
2.1.4.3 Vorbereitung und Implantation der Angiotensin II-Pumpen	33
2.1.4.4 Postoperative Überwachung der Tiere	34
2.1.5 Blutdruckmessung mittels <i>Tail-Cuff</i> -Plethysmographie.....	34
2.1.6 Uringewinnung im Stoffwechsellkäfig	35
2.1.7 Sakrifizierung und Organentnahme	35
2.2 Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1 RNA-Isolierung aus Herz- und Nierengewebe	36

2.2.2	cDNA-Gewinnung und Qualitätskontrolle über GAPDH-PCR.....	36
2.2.3	Quantitative RT-PCR	38
2.3	Organbad.....	39
2.3.1	Prinzip	39
2.3.2	Durchführung	39
2.3.2.1	Endothelabhängige Vasodilatation	40
2.3.2.2	Endothelunabhängige Vasodilatation	40
2.4	Histologische Organverarbeitung.....	41
2.4.1	Fixierung des Gewebes und Anfertigung der Schnitte	41
2.4.2	PAS-Färbung	41
2.5	Klinische Chemie	42
2.5.1	Bestimmung der ADMA-Plasmakonzentrationen	42
2.5.2	Bestimmung der Cholesterin- und Harnstoffkonzentration im Plasma	43
2.5.3	Albuminurie.....	43
2.6	Statistik.....	43
2.7	Materialien	45
2.7.1	Tierexperimentelle Arbeiten	45
2.7.2	Kits	45
2.7.3	Puffer und Lösungen	45
2.7.4	Primer	46
3	Ergebnisse	48
3.1	Einteilung der Mausgruppen	48
3.2	Verlaufsparemeter	48
3.2.1	Veränderungen des Blutdruckes	48
3.2.2	Veränderungen des Körpergewichtes	50
3.2.3	ADMA- und SDMA-Plasmakonzentrationen.....	51
3.3	Einfluss der hDDAH1-Überexpression auf hypertonusassoziierte Endorganschäden	53
3.3.1	Entwicklung hypertonusassoziiierter Schäden an der Niere	53
3.3.1.1	Funktionsleistung der Niere	53
3.3.1.2	Relative Expression proinflammatorischer Marker	56
3.3.1.3	Relative Expression fibrotischer Marker	58
3.3.1.4	Histopathologische Darstellung des renalen Gewebes.....	61
3.3.2	Entwicklung hypertonusassoziiierter Schäden am Herzen	63
3.3.2.1	Postmortales relatives Herzgewicht	63
3.3.2.2	Relative Expression profibrotischer und fibrotischer Marker	64
3.3.2.3	Relative Expression natriuretischer Peptide.....	67
3.3.2.4	Histopathologische Darstellung des kardialen Gewebes.....	70

3.3.3	Entwicklung hypertonusassoziierter Schäden am Gefäßsystem	72
4	Diskussion.....	74
4.1	Verlauf des Blutdruckes während des Versuchsansatzes.....	75
4.2	Hypertonusassozierte Schäden an der Niere	76
4.3	Hypertonusassozierte Schäden am Herzen	81
4.4	Hypertonusassozierte Schäden am Gefäßsystem	82
4.5	ADMA und Inflammation.....	85
4.6	Limitationen des eingesetzten Mausmodells.....	86
5	Zusammenfassung	89
6	Literaturverzeichnis	90
7	Danksagung.....	106
8	Publikation	107
9	Lebenslauf	108
10	Eidesstattliche Versicherung	109

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.

Abb. 2: Todesursachen in Deutschland 2009, Quelle: Daten des Statistischen Bundesamtes.

Abb. 3: Funktionen von NO am Gefäß.

Abb. 4: L-Arginin und methylierte L-Arginin-Analoga.

Abb. 5: Schematische Darstellung der Synthese und Freisetzung von ADMA und SDMA.

Abb. 6: Synthese, Abbau und Wirkung von ADMA.

Abb. 7: Näherungsformel zur Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur.

Abb. 8: Darstellung der Bandenmuster auf dem Agarosegel.

Abb. 9: Einteilung der Mausgruppen.

Abb. 10: Agarosegel zur Kontrolle der cDNA-Synthese.

Abb. 11: Bild einer Organbadkammer.

Abb. 12: Entwicklung des Blutdruckes über den Zeitraum des Versuchsansatzes.

Abb. 13: Entwicklung des Körpergewichtes über den Zeitraum des Versuchsansatzes.

Abb. 14: ADMA-Plasmakonzentrationen in den Mausgruppen nach Versuchsende.

Abb. 15: SDMA-Plasmakonzentrationen in den Mausgruppen nach Versuchsende.

Abb. 16: Albuminurie in den Mausgruppen.

Abb. 17: Cholesterinplasmakonzentrationen in den Mausgruppen.

Abb. 18: Harnstoffplasmakonzentrationen in den Mausgruppen.

Abb. 19: Relative Expression von MCP-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Abb. 20: Relative Expression von VCAM-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Abb. 21: Relative Expression von PAI-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Abb. 22: Relative Expression von Kollagen I im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Abb. 23: Glomerulosklerose-Score in den Mausgruppen.

Abb. 24: Histopathologische Darstellung des renalen Schadens an den Glomeruli in den Mausgruppen.

Abb. 25: Postmortales relatives Herzgewicht in den Mausgruppen.

Abb. 26: Relative Expression von PAI-1 im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Abb. 27: Relative Expression von Fibronectin im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Abb. 28: Relative Expression von Kollagen III im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Abb. 29: Relative Expression von BNP im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Abb. 30: Relative Expression von ANP im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Abb. 31: Herzfibrose-Score in den Mausgruppen.

Abb. 32: Histopathologische Darstellung des kardialen Gewebes in den Mausgruppen.

Abb. 33: Endothelabhängige, Acetylcholin-induzierte Vasodilatation.

Abb. 34: Endothelunabhängige, Nitroglycerin-induzierte Vasodilatation.

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Überblick über die Mausgruppen.

Tab. 2: ADMA- und SDMA-Plasmakonzentrationen in den Mausgruppen nach Versuchsende.

Tab. 3: Albuminurie in den Mausgruppen.

Tab. 4: Cholesterin- und Harnstoffplasmakonzentration in den Mausgruppen.

Tab. 5: Relative Expression von MCP-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Tab. 6: Relative Expression von VCAM-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Tab. 7: Relative Expression von PAI-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Tab. 8: Relative Expression von Kollagen I im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Tab. 9: Glomerulosklerose-Score in den Mausgruppen.

Tab. 10: Postmortales relatives Herzgewicht in den Mausgruppen.

Tab. 11: Relative Expression von PAI-1 im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Tab. 12: Relative Expression von Fibronectin im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Tab. 13: Relative Expression von Kollagen III im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Tab. 14: Relative Expression von BNP und ANP im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Tab. 15: Herzfibrose-Score in den Mausgruppen.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzyme</i>
ACh	Acetylcholin
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivator Protein-1
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOCA	Deoxy-Kortikosteronacetat
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Fa	Firma

FGF	<i>Fibroblastic Growth Factor</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
hDDAH1	Humane DDAH1
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
$_{ox}$ LDL	Oxidiertes <i>Low Density Lipoprotein</i>
L-NAME	N^G -Nitro-L-Arginin-Methylester
L-NMMA	N^G -Monomethyl-L-Arginin
MCP-1	Monozytäres chemotaktisches Protein-1
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid

NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor κB
nm	Nanometer
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NTG	Nitroglycerin
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OD	Optische Dichte
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii
PRMT	Protein-Arginin-N-Methyltransferase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>Real Time</i> -Polymerasekettenreaktion
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>

T	Thymin
tg	Transgen
TGF- β	<i>Transforming-Growth-Factor-β</i>
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor- α
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsions-Molekül-1
vs.	Versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 DER BLUTDRUCK

1.1.1 Bedeutung und Regulation des Blutdruckes

Der arterielle Blutdruck wird definiert durch die Kraft, mit der das Blut auf die Endotheloberfläche der Blutgefäße wirkt (Kuschinsky, 2005). Er entspricht damit dem Produkt aus Herzminutenvolumen und Gefäßwiderstand. Der höchste messbare Druck entsteht in der systolischen Phase des Herzens, in der die Pulswelle ihr Maximum erreicht und wird systolischer Druck genannt. In der diastolischen Phase des Herzens strebt die Pulswelle ein Minimum an, das als diastolischer Druck bezeichnet wird (Kuschinsky, 2005). Von einem regelhaften Blutdruck spricht man, wenn der systolische Wert zwischen 100-140mmHg und der diastolische zwischen 60-90mmHg liegt.

Da sowohl ein zu hoher als auch ein zu niedriger Blutdruck dem Organismus auf Dauer schadet, muss die Blutversorgung wechselnden Umgebungs- und Belastungsbedingungen angepasst werden. Dazu verfügt der Körper über kurz- und langfristige Regulationsmechanismen. Kreislaufreflexe dienen zur kurzfristigen Kreislaufregulation, wie sie beispielsweise im Rahmen der Orthostase notwendig ist. Über Pressorezeptoren im Karotissinus und Aortenbogen werden Änderungen des mittleren arteriellen Druckes sowie eine Änderung der Blutdruckamplitude wahrgenommen und über den Nervus (N.) vagus bzw N. glossopharyngeus an kreislaufsteuernde Neurone in der Medulla oblongata weitergegeben (Kuschinsky, 2005). Alle Afferenzen laufen über den Nucleus tractus solitarii zusammen. Dabei führt eine Blutdruckerhöhung zu einer Hemmung des sympathischen sowie einer Stimulierung des parasympathischen Nervensystems, die über efferente Nervenfasern ihre Wirkung auf Herz, Widerstandsgefäße und Kapazitätsgefäße vermitteln (La Rovere et al., 2008). Unterstützt werden die Pressorezeptoren durch synergistisch wirksame, kardiopulmonale Rezeptoren, die ebenfalls druckempfindlich reagieren und über ihr Entladungsmuster Einfluss auf

Sympathikusaktivität und Volumenregulation nehmen. Da Pressorezeptoren sich jedoch innerhalb weniger Tage an konstante Veränderungen adaptieren können, ist diese Art der Blutdruckregulation nur als kurzfristige Möglichkeit geeignet. Eine langfristige Blutdruckregulation bedarf einer Anpassung des Blutvolumens durch kontrollierte Flüssigkeitsausscheidung bzw. -retention. Dadurch wird die Niere zum zentralen Steuerelement eines dauerhaft konstanten Blutdruckes (Kuschinsky, 2005).

1.1.2 Bedeutung der Niere bei der Regulation des Blutdruckes

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ im menschlichen Körper und erfüllt als solches die Aufgabe, den Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt zu kontrollieren, Stoffwechselendprodukte und Fremdstoffe aus dem Körper zu eliminieren und endokrine Funktionen, wie die Erythropoietin-Synthese, wahrzunehmen.

Die besondere Anatomie der Niere ermöglicht ihr dabei die Fähigkeit zur Harnbildung. Funktionelle und strukturelle Einheit stellt das Nephron dar, das aus dem Malpighi-Körperchen und dem Nierentubulus, der sich in einen proximalen, intermediären und distalen Tubulus unterteilt, besteht. Eine Niere verfügt über ca. 1 Million Nephrone, die über Verbindungstubuli in Sammelrohre zusammenlaufen und gemeinsam im Nierenbecken münden. Der Raum zwischen den Nierentubuli und Sammelrohren wird Interstitium genannt. Er besteht aus Bindegewebe mit nur wenigen Kollagenfibrillen und hat einen hohen Anteil an wasserreichen Proteoglykanen.

Das Malpighi-Körperchen eines Nephrons setzt sich zusammen aus der Bowman-Kapsel, dem Glomerulum und dem Mesangium. Aufgrund ihrer speziellen Anatomie können die Malpighi-Körperchen täglich ca. 180-200l Primärharn filtrieren. Der Primärharn ist frei von Proteinen und Blutzellen und enthält Wasser sowie andere im Blut gelöste Stoffe, wie Glukose und Elektrolyte. Über komplexe Resorptions- und Sekretionsmechanismen im Tubulussystem ist es der Niere möglich, den Harn zu konzentrieren und dadurch die Elektrolyt- und Wasserausscheidung zu regulieren.

Desweiteren kommt der Niere eine große Bedeutung bei der Langzeitregulation des Blutdruckes zu. Dabei wird das Blutvolumen durch Flüssigkeitsausscheidung oder -retention über die Niere den längerfristigen Anforderungen des Körpers angepasst. Bei hohen systolischen Blutdrücken kommt es so zu einer über Natriurese und Druckdiurese vermittelten Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens. Das Herz passt sich dieser Veränderung funktionell an und vermindert sein Herzminutenvolumen, so dass es zu einer Senkung des arteriellen Blutdruckes kommt. Das Zusammenwirken dieser beiden Organe wird durch hormonelle Regelkreise weiter gefördert und im Rahmen einer systemischen Blutdruckregulation optimiert. Zu diesen Hormonen gehört neben natriuretischen Peptiden und Atrialdiuretin (ADH) auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS; Kuschinsky, 2005).

1.1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das RAAS ist in der Lage, durch eine Abfolge proteolytischer Aktivierungen von Peptiden Einfluss auf Blutdruck und Extrazellulärvolumen des Organismus zu nehmen. Stimuliert durch eine Minderperfusion der Niere, wie sie im Rahmen einer Hypotonie oder Hypovolämie auftritt, wird aus dem juxtaglomerulären Apparat zunächst Renin freigesetzt, welches von Angiotensinogen das N-terminale Dekapeptid abspaltet. Durch das *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) wird die Bildung von Angiotensin I zu Angiotensin II katalysiert (Perazella und Setaro, 2003). Angiotensin II befindet sich damit in seiner biologisch wirksamsten Form und kann eine Vielzahl von Funktionen wahrnehmen. Zum einen wirkt Angiotensin II stark vasokonstriktorisch und kann über diesen Mechanismus den Gefäßwiderstand anheben (Perazella und Setaro, 2003). Weiterhin fördert es eine vermehrte Freisetzung von ADH aus dem Hypophysenhinterlappen. ADH erhöht die Resorption von Wasser in den Sammelrohren der Niere. Ebenso steigert Angiotensin II zentral den Wasser- und Salzappetit und erzielt über diese Wege eine Erhöhung des Blutvolumens. Eine zusätzlich wichtige Funktion von Angiotensin II ist die Stimulierung der Nebennierenrinde zur Aldosteronfreisetzung. Aldosteron erhöht die Natriumresorption im distalen Nephron, was zu einer vermehrten Wasserretention führt (Perazella und Setaro, 2003).

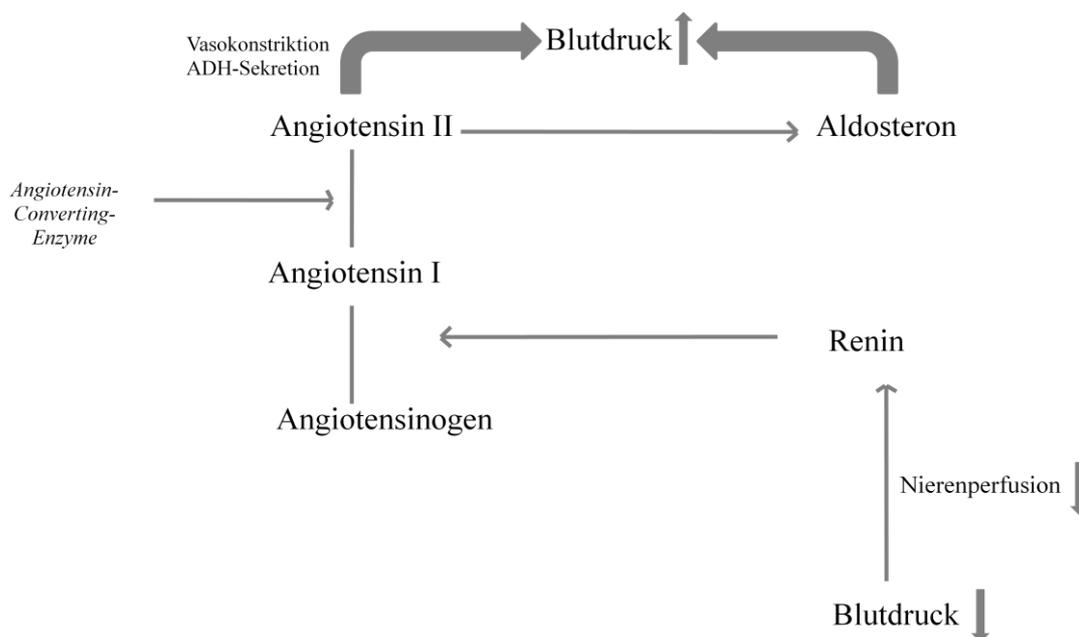


Abb.1: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Unter physiologischen Bedingungen führt ein erniedrigter Blutdruck über eine verminderte renale Perfusion zu einer erhöhten Synthese von Renin. Renin steigert die Synthese von Angiotensin II, welches zum einen direkt, zum anderen über eine erhöhte Aldosteron-Freisetzung zu einem Anstieg des Blutdruckes führt.

Neben der Regulation des Blutdruckes ist Angiotensin II in der Lage, die Genexpression der NADPH-Oxidase zu stimulieren und die Aktivität dieses Enzyms zu erhöhen. Die NADPH-Oxidase katalysiert die Synthese von Sauerstoffradikalen, die zu einem erhöhten oxidativen Stress führen (Mollnau et al., 2002). Erhöhter oxidativer Stress im Herz und Gefäßsystem wurde in vielen Hypertonus-Modellen nachgewiesen (Jacobi et al., 2008; Rajagopalan et al., 1996; Viridis et al., 2004). Dass oxidativer Stress auch pathophysiologisch eine wichtige Rolle spielt, konnte von Zhao et al. gezeigt werden. Diese Arbeitsgruppe konnte am Herzen nachweisen, dass oxidativer Stress zu einer erhöhten Expression des *Transforming-Growth-Factors-β* (TGF-β) führt, der stark profibrotische Eigenschaften besitzt (Zhao et al., 2008). Gleichzeitig trägt oxidativer Stress im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen erheblich zu der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion bei (Cai und Harrison, 2000).

1.2 DER ARTERIELLE HYPERTONUS

1.2.1 Definition und Ätiologie

Da kardiovaskuläre Erkrankungen die durchschnittliche Lebenserwartung einer Person um 15 Jahre senken, ist die Forschung auf diesem Gebiet von erheblichem individuellen, gesellschaftspolitischen und ökonomischen Interesse.

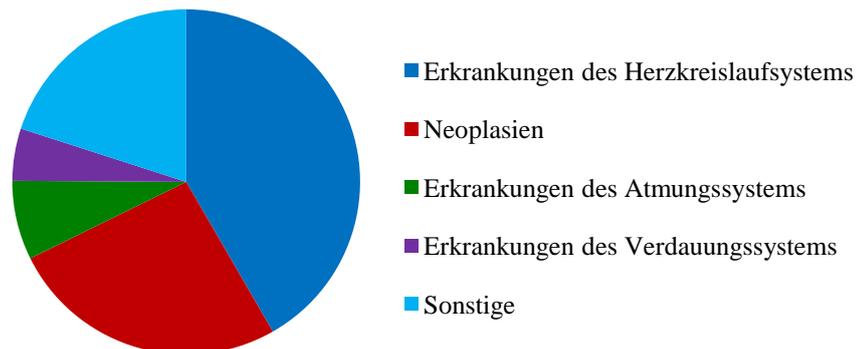


Abb.2: Todesursachen in Deutschland 2009, Quelle: Daten des Statistischen Bundesamtes. Dargestellt sind die 5 häufigsten Todesursachen. 41,7% der Todesfälle waren auf eine Erkrankung des Herzkreislaufsystems zurückzuführen. Auf Platz 2-4 folgten Neoplasien (26,0%) sowie Erkrankungen der Atemwege (7,4%) und des Verdauungssystems (4,9%). Auf sonstige Ursachen entfielen 20,0% der Todesfälle.

Der arterielle Hypertonus ist definiert als chronische Erhöhung des arteriellen Blutdruckes mit einem systolischen Blutdruck $>140\text{mmHg}$ und/oder einem diastolischen Blutdruck $>90\text{mmHg}$. Der Hypertonus gilt als einer der wichtigsten und häufigsten Risikofaktoren für das Auftreten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, zu denen zum Beispiel (z.B.) die Herzinsuffizienz oder die koronare Herzkrankheit gehören (Kannel, 1993). In westlichen Industrienationen leiden mehr als 50% der über 50jährigen an arteriellem Hypertonus. Davon ist einem Drittel der Betroffenen die eigene Erkrankung nicht bekannt, mehr als 40% aller Hypertoniker werden gar nicht oder in zwei Drittel der Fälle nur unzureichend therapiert (Chobanian et al., 2003). Die Folgen eines nicht diagnostizierten oder unzureichend therapierten arteriellen Hypertonus sind dabei gravierend. Nach Erhebungen des Statistischen Bundesamtes gehörte die hypertensive Herzkrankheit 2009 zu den zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland.

Nach ätiologischen Gesichtspunkten unterscheidet man zwei Formen der arteriellen Hypertonie; die sogenannte primäre, essentielle Form und die sekundäre Form. An der primären, essentiellen Form leiden etwa 90% aller Erkrankten. Es handelt sich um eine multifaktorielle Erkrankung, deren genaue Pathophysiologie nicht geklärt ist. Bekannt ist, dass Faktoren wie Konstitution, Ernährung, Stress, Bewegungsmangel, Rauchen und endokrine Parameter eine wichtige Rolle bei der Manifestation und Ausprägung des Hochdruckes einnehmen. In dieser Gruppe eingeschlossen ist auch ein Kollektiv salzsensitiver Patienten. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei ihnen der Blutdruck bei salzarmer Diät signifikant abnimmt und bei entsprechender Zufuhr von Natriumchlorid (NaCl) deutlich ansteigt (Weinberger et al., 1986). Abhängig vom ethnischen Hintergrund und Alter leidet ein unterschiedlich hoher Prozentsatz der primären Hypertoniker an dieser Salzsensitivität (Franco und Oparil, 2006). Bei der sekundären Form des Bluthochdruckes ist die Ätiologie bekannt. Oft liegen dieser Form der Hypertonie renale Erkrankungen, wie etwa eine Nierenarterienstenose, oder endokrine Dysfunktionen, zum Beispiel ein primärer Hyperaldosteronismus zugrunde. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt die arterielle Hypertonie unabhängig von ihrer Genese nach dem Schweregrad der Organschäden und Begleiterkrankungen in drei Stadien (Whitworth, 2003).

Stadium I Hypertonie ohne Endorganschäden

Stadium II Hypertonie mit Endorganschäden

Stadium III Hypertonie mit kardiovaskulären Folgeerkrankungen

Eine dauerhafte Erhöhung des arteriellen Blutdruckes kann unbehandelt zu bleibenden Schäden an einer Vielzahl von Organen führen. Besonders stark betroffen sind dabei die Nieren, das Herz und das Gefäßsystem.

1.2.2 Hypertonusassoziierte Schäden an den Nieren

Eine Hypertonie führt zu einer Schädigung des Nierenparenchyms. Die Schwere des Nierenschadens korreliert dabei nicht nur mit der Höhe, sondern auch mit der Dauer der Hypertonie (Hörl, 2006). Neben vaskulären Schäden kommt es zur Ausprägung einer Glomerulosklerose, einer tubuläre Atrophie sowie einer interstitiellen Fibrose (Meyrier und Simon, 1996).

Die genauen molekularbiologischen Mechanismen, die zur Ausprägung der hypertensiven Nephropathie führen, sind äußerst komplex (Hörl, 2006). Aus experimentellen Versuchen an Mäusen, die transgen für Renin und Angiotensinogen sind, hat man wichtige Erkenntnisse über die Rolle von Angiotensin II gewinnen können. Angiotensin II führt demnach über die NADPH-Oxidase zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; Rajagopalan et al., 1996). Über ROS kommt es zu einer Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors κ B (NF- κ B), der die Expression einer Vielzahl redoxsensitiver Gene reguliert. Zu diesen Genen gehört der Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1). PAI-1 wirkt prokoagulatorisch und ist ein Schlüsselement für die Fibrinolyse und Umstrukturierung der Extrazellulärmatrix, indem es die Degradation von Kollagen vermindert. Damit verbunden sind eine renale Fibrosierung sowie eine fortschreitende Reduktion der Nierenfunktion bis zur terminalen Niereninsuffizienz (Rerolle et al., 2000). Auch proinflammatorischen Marker, wie das monozytäre chemotaktische Protein-1 (MCP-1), das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) sowie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) werden durch NF- κ B reguliert. MCP-1 ist in der Lage, über eine Aktivierung von TGF- β und *Fibroblast Growth Factor* (FGF) Monozyten zur Kollagensynthese zu stimulieren und damit das fibrogenetische Potential zu fördern (Sakai et al., 2006). Gleichzeitig kommt es durch MCP-1 zu einer Proliferation glatter Muskelzellen (Luft et al., 1999).

Auf eine chronische Druckerhöhung reagiert das Glomerulum zunächst mit einer Hypertrophie, um die Filtrationsfläche zu vergrößern. Dieser Adaptationsmechanismus führt langfristig zu Schäden des Glomerulums und es kommt zu einer

glomerulären Filtration von Albumin und höhermolekularen Proteinen. Diese können sich ablagern und so zu einer Glomerulosklerose führen. Die Albuminausscheidung im Urin gibt einen Hinweis auf das Ausmaß der glomerulären Schädigung. Studien zeigen, dass bei Patienten mit arteriellem Hypertonus bereits eine Albuminausscheidung von $>5\mu\text{g}/\text{min}$ ausreicht, um das Risiko an einer koronaren Herzkrankheit zu erkranken auf das Zweifache zu erhöhen (Klausen et al., 2005). Die Mikroalbuminurie ist somit ein wichtiger Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen.

Durch Progredienz der druckassoziierten Schäden an der Niere nimmt die Filtrationsfähigkeit der Niere ab. Es kommt zu einer Wasser- und Natriumretention, welche zu einer erhöhten Volumenbelastung des Herzens führt. Gleichmaßen führt ein erhöhter intraglomerulärer Druck zu einer vermehrten Aktivierung des RAAS und es kommt zu einer Chronifizierung der Hypertonie. Die Prognose der renalen Schädigung ist dabei weitestgehend abhängig von dem Ausmaß der interstitiellen Fibrose (Hörl, 2006).

1.2.3 Hypertonusassoziierte Schäden am Herzen

Ein nicht bzw. nur unzureichend behandelter arterieller Hypertonus führt zu strukturellen und funktionellen Veränderungen am Herzen. Morphologische Korrelate sind dabei eine Kardiomyozytenhypertrophie, eine interstitielle Fibrose sowie das Vorkommen entzündlicher Infiltrate (Pavlopoulos und Nihoyannopoulos, 2008).

Die chronische Druckerhöhung resultiert in einer konzentrischen Hypertrophie des Myokards, die zu einer Einschränkung der Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels führen kann. Aufgrund der physiologischen Druckverteilung ist besonders der linke Ventrikel von diesem *Remodeling* betroffen. Man spricht in diesem Zusammenhang daher von der linksventrikulären Hypertrophie. Da Kardiomyozyten sich nicht mehr teilen können, kommt es durch Vermehrung kontraktiler Filamente zu einer Zunahme des Zellvolumens. Dazu verfügen die Kardiomyozyten über dehnungssensitive Ionenkanäle in ihren Plasmamembranen. Die Stimulierung dieser Ionenkanäle bewirkt eine Induktion der Synthese und Sekretion humoraler

Substanzen, wie Angiotensin II und Endothelin-1 (Sadoshima und Izumo, 1997). Mechanischer Stress aktiviert zusätzlich die Angiotensin II-Rezeptoren der Kardiomyozyten (Zou et al., 2004).

Eine interstitielle Fibrose führt darüber hinaus zu Veränderungen der Herzleistung im Sinne einer diastolischen Funktionsstörung. Es wurde nachgewiesen, dass es unter den Bedingungen eines arteriellen Hypertonus zu einer gesteigerten interstitiellen und perivaskulären Deposition von Kollagen kommt (Querejeta et al., 2000). Vermittelt wird dieser Prozess über einen erhöhten mechanischen Stress sowie über unterschiedliche humorale Substanzen. Besondere Bedeutung kommen hier dem RAAS sowie dem Endothelin-1 zu (Weber, 2000).

Die linksventrikuläre Hypertrophie kann zusammen mit der perivaskulären und interstitiellen Fibrose sowie einer gestörten endothelialen Gefäßfunktion zu einer Minderperfusion des Myokards führen mit der Gefahr der Entstehung einer ischämischen Kardiomyopathie (Youn et al., 2006; Anderson et al., 2000; Treasure et al., 1993). Gleichzeitig birgt eine Ischämie des Myokards das Risiko des Auftretens von Herzrhythmusstörungen, insbesondere von Vorhofflimmern (Kannel et al., 1998).

Darüberhinaus konnten mehrere Arbeiten zeigen, dass es bei dem arteriellen Hypertonus einen Zusammenhang zwischen entzündlichen Vorgängen und kardialer Schädigung gibt. So führten Hypertonusmodelle an Ratten, hervorgerufen durch eine Behandlung mit Angiotensin II oder Aldosteron, zu einer frühzeitigen vaskulären Infiltration von Monozyten und Makrophagen. Ausserdem konnte eine vermehrte Expression proinflammatorischer Proteine, wie z.B. MCP-1, gemessen werden (Rocha et al., 2002b; Rocha et al., 2002a).

Der durch die chronische Druckerhöhung entstehenden Schädigung versucht das Herz entgegen zu wirken, indem es reflektorisch zu einer vermehrten Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und des *Brain Natriuretic Peptides* (BNP) kommt. Diese Proteine wirken antiproliferativ, antifibrotisch und fördern die renale Wasser- und Natriumexkretion. Desweiteren sind die natriuretischen Peptide in der Lage, die Aldosteronsynthese und Sekretion von Renin zu reduzieren und damit den RAAS vermittelten Herzschäden entgegenzuwirken (Nishikimi et al., 2006).

1.2.4 Hypertonusassoziierte Schäden am Gefäßsystem

Die arterielle Hypertonie führt zur Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion und arteriosklerotisch veränderten Gefäßen, die Grundlage für Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind (Tegos et al., 2001). Angiotensin II nimmt bei der Entstehung des vaskulären Endothelschadens eine wichtige Rolle ein. Zum einen ist es in der Lage, über die NADPH-Oxidase die Synthese von ROS zu steigern (Mollnau et al., 2002). Zum anderen bewirkt es eine verstärkte Expression redoxsensitiver Gene, so z.B. von VCAM-1 und MCP-1. Hierdurch kommt es zu einer gesteigerten Infiltration und Adhäsion von Monozyten und Leukozyten. Sowohl der durch Angiotensin II erhöhte oxidative Stress als auch die durch Angiotensin II hervorgerufene proinflammatorische Reaktion können das Endothel schädigen und so in einer Arteriosklerose enden.

1.3 BEDEUTUNG VON NO IM RAHMEN DER GEFÄßHOMÖOSTASE

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges, anorganisches Molekül, das als freies Radikal eine Vielzahl von Aufgaben im menschlichen Organismus wahrnimmt (Kubes, 2000). Es dient der Immunaktivierung, der neuronalen Signaltransduktion sowie der endothelabhängigen Vasodilatation. Eine besondere Bedeutung kommt NO im Rahmen der physiologischen und pathophysiologischen Gefäßhomöostase zu (Kubes, 2000). Aufgrund einer Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden und einer geringen Reichweite von etwa 100µm ist eine ständige Neusynthese dieses hochreaktiven Moleküls notwendig.

NO wird aus L-Arginin synthetisiert (Palmer et al., 1988). Für die Katalyse dieser Reaktion sind NO-Synthasen zuständig, die unter Verbrauch von O₂ und NADPH L-Arginin zu L-Citrullin und NO umsetzen (Moncada und Higgs, 1993). Als Dimere verfügen die NO-Synthasen N-terminal über eine Oxidase-Domäne zur Bindung von L-Arginin und dem Kofaktor Tetrahydrobiopterin und C-terminal über eine Reduktase-Domäne zur Bindung von NADPH und weiteren Kofaktoren (Andrew und Mayer, 1999). Zu der Klasse der NO-Synthasen gehören insgesamt drei

Isoformen (Andrew und Mayer, 1999). Zum einen findet man im Endothel die membrangebundene endotheliale NO-Synthase (eNOS) sowie im neuronalen Gewebe die zytosolische Isoform des Enzyms, die nNOS. Diese beiden Enzyme liegen konstitutiv vor und sind in ihrer Aktivität Ca^{2+} -abhängig. Demgegenüber steht die induzierbare Isoform (iNOS). Diese kann in glatten Muskelzellen, glomerulären Mesangiumzellen, neutrophilen Granulozyten sowie im Endothel exprimiert werden und ist unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Stimuliert wird die Expression der iNOS-Isoform über Zytokine, TNF- α , Interleukine sowie bakterielle Endotoxine (Andrew und Mayer, 1999). Die Produktionsleistung der iNOS übertrifft die der konstitutiven Enzyme dabei um mehr als das 1000fache.

Im Rahmen der physiologischen Gefäßhomöostase ist NO ein wichtiger Gegenspieler der durch Angiotensin II und das sympathische Nervensystem vermittelten Reaktionen. Unter Ruhebedingungen wird der normale Gefäßtonus durch das Zusammenspiel von lokalen Faktoren, hormonalen und neuronalen Signalen bestimmt. Das sympathiko-adrenerge System bewirkt dabei eine Konstriktion der Gefäße. Lokale Mechanismen wirken dieser Konstriktion entgegen. So führen lokale Metabolite, wie Adenosin, oder ein verminderter O_2 -Partialdruck im Gefäß zu einer Dilatation des betreffenden Gefäßabschnittes. Hormonale Signale, wie etwa Bradykinin und Prostazyklin, wirken über eine vermehrte NO-Freisetzung am Endothel ebenfalls vasodilatatorisch (Sprague und Khalil, 2009). Auch mechanische Kräfte, die auf das Endothel einwirken, können zu einer vermehrten NO-Freisetzung aus dem Endothel führen. NO diffundiert in diesem Fall als parakrines Hormon in benachbarte Zellen und führt über eine cGMP-vermittelte Signaltransduktion zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und damit zu einer Vasodilatation (Li und Förstermann, 2000). Die vermehrte Freisetzung von NO durch eine erhöhte Schubspannung am Endothel dient der Optimierung einer lokalen Durchblutungskontrolle.

NO hemmt zugleich die Proliferation glatter Muskelzellen (Scott-Burden und Vanhoutte, 1994) sowie die zytokinabhängige Expression der endothelabhängigen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. Dies hat einen hemmenden Effekt auf die Leukozytenadhäsion (Kubes et al., 1991). Weiterhin wird durch Einfluss von NO

die Thrombozytenaggregation deutlich erschwert (Radomski et al., 1991) und die Oxidation von *Low Density Lipoprotein* (LDL) gehemmt (Li und Förstermann, 2000). Die Gesamtheit dieser Funktionen unterstreicht die Bedeutung von NO für eine langfristige Vasoprotektion.

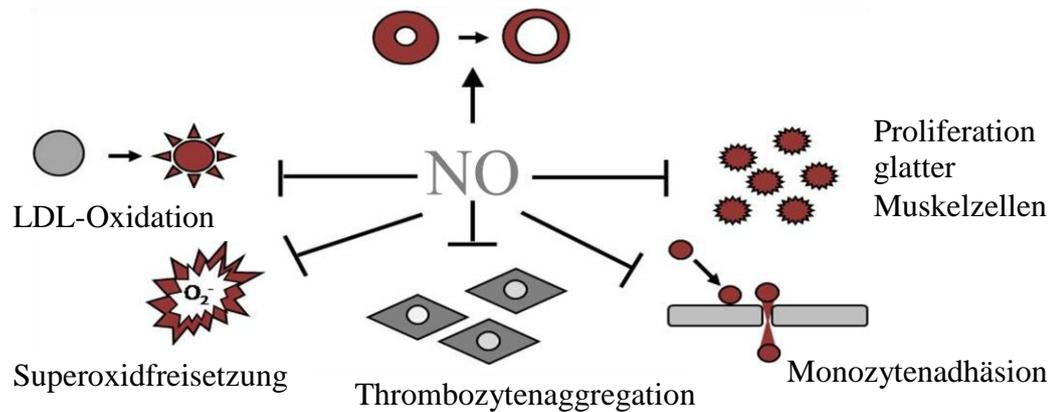


Abb.3: Funktionen von NO am Gefäß.

Eine Beeinträchtigung der NO-Bioverfügbarkeit führt demnach zu einer endothelialen Dysfunktion (Endemann und Schiffrin, 2004). Die endotheliale Dysfunktion ist definiert als eine Störung der physiologischen Gefäßhomöostase, ohne dass bereits sichtbare morphologische Veränderungen vorliegen müssen. Sie ist im Wesentlichen gekennzeichnet durch vier Punkte. Zum einen kommt es zu einer eingeschränkten endothelabhängigen Gefäßrelaxation. Dies ist Folge einer gestörten Vasoreaktivität. Darüber hinaus wird das Endothel permeabler für Plasmaproteine und es kommt zu einer vermehrten Freisetzung chemotaktischer Substanzen. Dies führt zu einem vermehrten Einstrom und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten sowie zu einer gesteigerten Thrombozytenaggregation.

Eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit kann vielfältig begründet sein und wird vermehrt in Anwesenheit kardiovaskulärer Risikofaktoren und im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen beobachtet. Dabei ist sowohl eine gesteigerte Inaktivierung von bereits gebildetem NO durch eine vermehrte Sauerstoffradikalproduktion als auch eine verminderte Bildung von NO durch endogene NO-Synthase-Inhibitoren, wie dem asymmetrischen Dimethylarginin

(ADMA), für eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit verantwortlich (Harrison, 1997; Böger, 2003).

1.4 ASYMMETRISCHES DIMETHYLARGININ

1.4.1 Funktion von ADMA und pathophysiologische Relevanz

Das asymmetrische Dimethylarginin ist ein endogener Inhibitor der NO-Synthase (Vallance et al., 1992a). Dabei verdrängt es im Rahmen einer kompetitiven Hemmung L-Arginin vom aktiven Zentrum des Enzyms. In der Folge kommt es zu einer Reduktion der NO-Bildung. ADMA ist eine modifizierte Aminosäure, die im Rahmen der posttranslationalen Proteinbiosynthese generiert wird (McDermott, 1976). Es ist, wie sein Stereoisomer symmetrisches Dimethylargin (SDMA) und das einfach methylierte *N*-Monomethylarginin (L-NMMA), ein Substrat der Protein-Arginin-*N*-Methyltransferasen (PRMTs). Die PRMTs katalysieren hierbei die Übertragung von Methylgruppen auf endständige Stickstoffgruppen proteingebundener L-Arginine (Paik und Kim, 1968). Unter physiologischen Bedingungen werden täglich etwa 300µmol ADMA generiert (Achan et al., 2003).

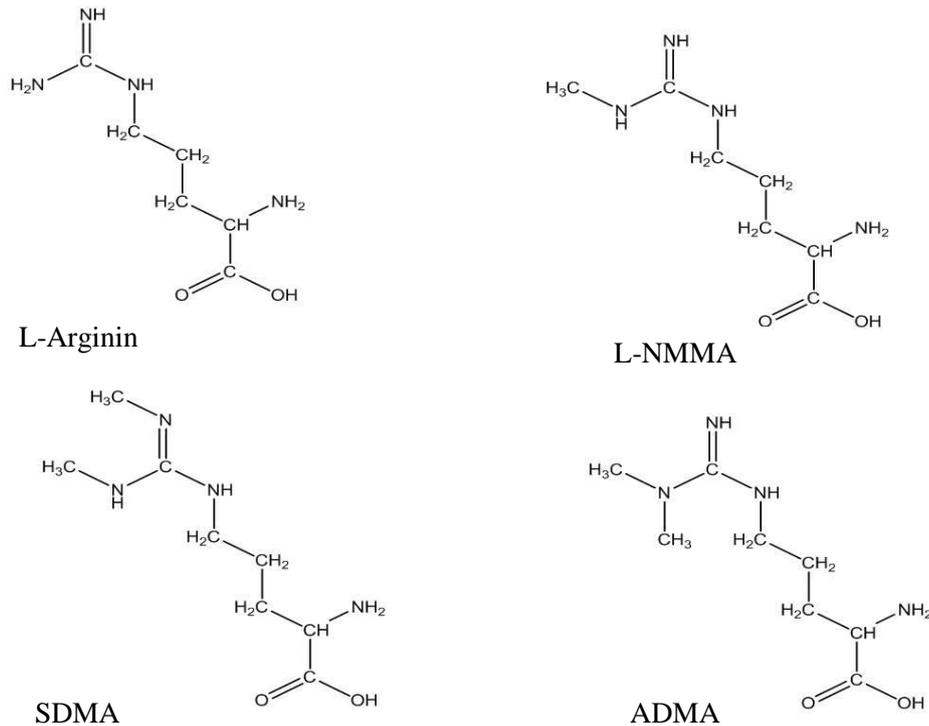


Abb.4: L-Arginin und methylierte L-Arginin-Analoga.

Eine Vielzahl von Erkrankungen und kardiovaskulären Risikofaktoren gehen mit erhöhten ADMA-Konzentrationen einher (Vallance und Leiper, 2004). So findet man unter anderem bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Valkonen et al., 2001), Niereninsuffizienz (Kielstein et al., 1999), pulmonaler Hypertonie (Gorenflo et al., 2001), Hypercholesterinämie (Chan et al., 2000) und Diabetes mellitus Typ II (Abbasi et al., 2001) erhöhte ADMA-Werte. Auch bei hypertensiven Patienten wurden über die Norm erhöhte ADMA-Konzentrationen gemessen (Surdacki et al., 1999). Ursachen eines ADMA-Anstiegs im Plasma können dabei zum einen durch eine gesteigerte Neusynthese und zum anderen durch einen verminderten enzymatischen Abbau bzw. eine verminderte renale Ausscheidung von ADMA bedingt sein.

1.4.2 Synthese von ADMA

Insgesamt existieren 11 Subtypen der PRMT, von denen 8 mittlerweile genauer erforscht sind und in zwei Klassen unterschieden werden (Wolf, 2009). Typ I der PRMTs mono- und dimethylieren endständige Argininreste asymmetrisch. Dadurch

kommt es zur Bildung von ADMA. PRMTs vom Typ II monomethylieren und dimethylieren die beiden endständigen Stickstoffe symmetrisch, so dass es zur Bildung von SDMA kommt (Vallance und Leiper, 2004). Die Bildung von L-NMMA erfolgt sowohl durch PRMTs Typ I als auch Typ II, weshalb angenommen wird, dass es sich hierbei um eine Zwischenstufe in der Synthese der beiden Dimethylarginine handelt (Tran et al., 2003). Allen PRMTs gemein ist die Nutzung von S-Adenosyl-L-Methionin als Methylgruppendonator. Damit ADMA seine Funktion als endogener Inhibitor der NO-Synthase erfüllen kann, muß es zunächst durch Proteolyse vom gebundenen Protein freigesetzt werden.

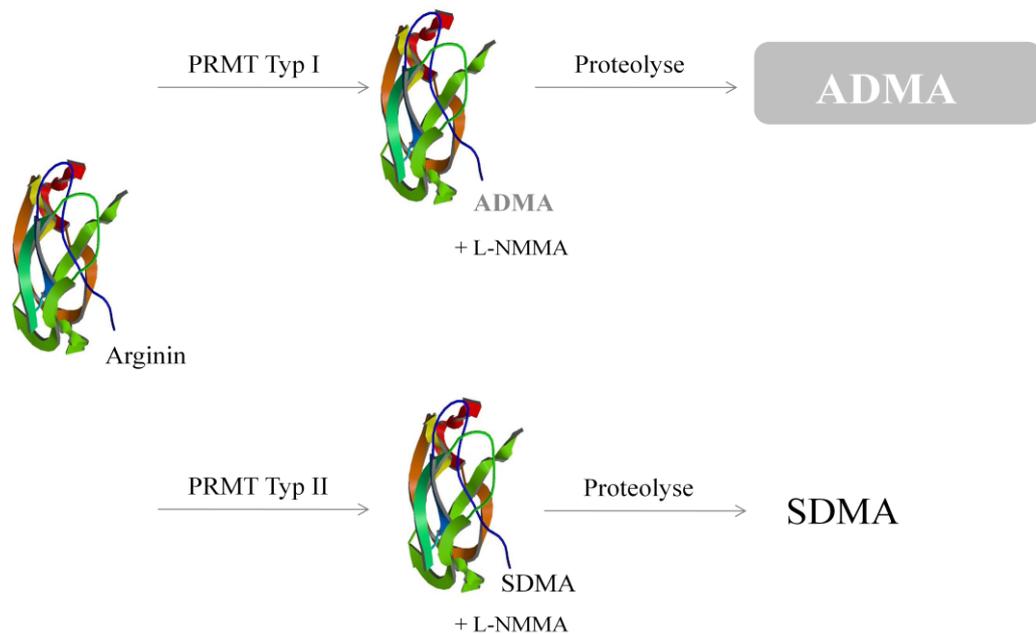


Abb.5: Schematische Darstellung der Synthese und Freisetzung von ADMA und SDMA.

1.4.3 Abbau von ADMA

Aminosäuren, die im Rahmen einer posttranskriptionalen Modifikation methyliert werden, werden beim Abbau metabolisiert oder renal ausgeschieden. SDMA wird fast ausschließlich über die Niere ausgeschieden, seine Elimination wird daher weitestgehend von der Funktionsfähigkeit der Niere bestimmt (Tran et al., 2003). ADMA hingegen wird größtenteils enzymatisch metabolisiert (Ogawa et al., 1989).

Dabei wird anfallendes ADMA hydrolytisch in L-Citrullin und Dimethylamin gespalten. Verantwortlich hierfür ist das Enzym Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH; Ogawa et al., 1989). Obwohl das ubiquitär gebildete ADMA in allen Körperzellen durch die DDAH abgebaut werden kann, findet der Hauptteil des enzymatischen Metabolismus von ADMA in Niere und Leber statt (Palm et al., 2007).

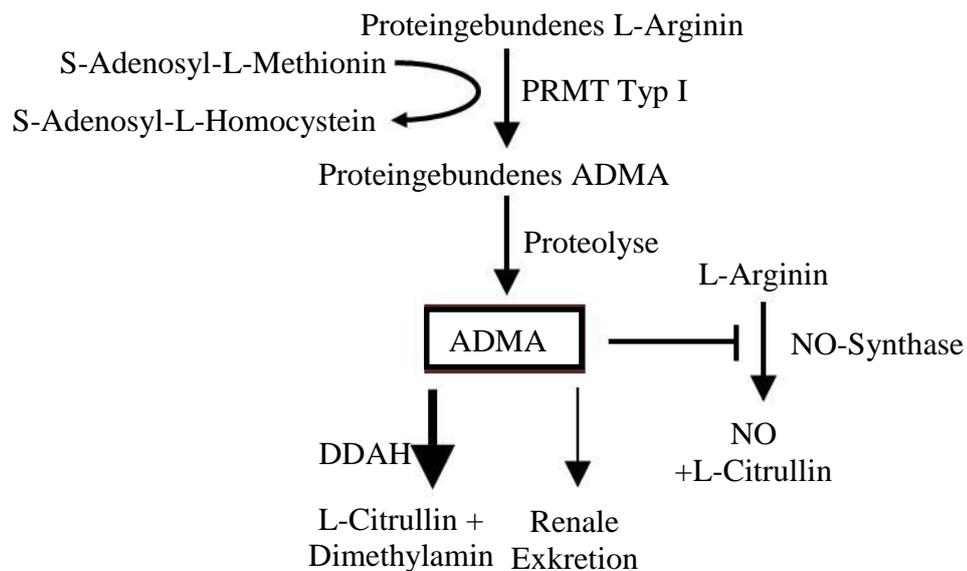


Abb.6: Synthese, Abbau und Wirkung von ADMA. Über posttranslationale Methylierung wird ADMA zunächst proteingebunden gebildet und schließlich durch Proteolyse freigesetzt. ADMA hemmt kompetitiv die NO-Synthase und wird größtenteils über die DDAH enzymatisch abgebaut. Nur ein kleiner Teil wird renal ausgeschieden (Cooke, 2004).

Die DDAH liegt in zwei Isoformen vor (Leiper et al., 1999). Beiden Isoformen gemein ist eine zelluläre Koexpression mit NO-Synthasen (Tojo et al., 1997), sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihres Expressionsmusters in den Geweben. Es wird daher vermutet, dass die DDAH-Isoformen über ihre Aktivität die zellulären ADMA-Konzentrationen und somit die Bioverfügbarkeit von NO regulieren. Die DDAH1 hat ihre höchste Expression in der Leber (Nijveldt et al., 2003) und in der Niere (Ogawa et al., 1989). Aber auch in der Aorta, neutrophilen Granulozyten (Kimoto et al., 1993) und kolokalisiert zu allen Isoformen der NO-Synthasen kann die

DDAH1 nachgewiesen werden (Tojo et al., 1997). Hohe Konzentrationen von DDAH2 findet man vor allem in Endothelzellen, in fetalem Gewebe, im Herzen und in der Plazenta (Tran et al., 2000). Die DDAH1 unterliegt in ihrer Aktivität redoxsensitiven Einflüssen. Oxidativer Stress (Palm et al., 2007), oxidiertes LDL (oxLDL; Ito et al., 1999) sowie Lipopolysaccharide (Xin et al., 2007) können die Aktivität der DDAH1 herabsetzen, während Hormone und Medikamente mit antioxidativen Eigenschaften, wie z.B. Estradiol (Monsalve et al., 2007) und Pravastatin (Yin und Xiong, 2005) die Aktivität des Enzyms steigern. Auch die Genexpression der DDAH1 kann reprimiert bzw. stimuliert werden. So verringern oxLDL, TNF- α und Angiotensin II eine Expression des Enzyms, während z.B. Interleukin-1 β (IL-1 β) zu einer vermehrten Expression von DDAH1 führt (Palm et al., 2007).

1.4.4 Das Modell der hDDAH1-transgenen Maus

Mit wachsendem Wissen über die Korrelation von ADMA mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen wuchs das Interesse an der Generierung eines Mausmodells, um die zugrundeliegenden Mechanismen, über die ADMA seine Effekte ausübt, näher untersuchen zu können. Mit Generierung einer hDDAH1-transgenen Maus, also dem Enzym, dessen exklusive Wirkung auf den Abbau von ADMA und L-NMMA beruht, gelang es der Arbeitsgruppe um John Cooke der Stanford University auf dem Hintergrund der C57BL/6J-Maus eine Mauslinie zu erschaffen, die heterozygot für das humane DDAH1-Gen ist (Dayoub et al., 2003). Diese hDDAH1-transgenen Mäuse zeigen unter basalen Bedingungen signifikant niedrigere ADMA- bei unveränderten SDMA-Plasmakonzentrationen. Hämodynamisch zeigten sie einen signifikant niedrigeren systolischen Blutdruck, mit einer durchschnittlichen Differenz von ca. 6mmHg, am ehesten bedingt durch einen verminderten systemischen Widerstand. Dabei lag die Herzfrequenz in Ruhe bei den transgenen Mäusen im Schnitt um 10% höher als bei den Wildtypmäusen (WT). Das Herzminutenvolumen änderte sich mit der Überexpression an humaner DDAH1 jedoch nicht (Dayoub et al., 2003).

Mit der Generierung der hDDAH1-transgenen Maus konnte man nun die Bedeutung einer erhöhten basalen hDDAH1-Verfügbarkeit für den Organismus unter pathophysiologischen Stimuli erforschen. So zeigten die hDDAH1-transgenen Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen eine bessere Angiogenese nach Ischämie der Femoralarterien (Jacobi et al., 2005). Konishi et al. führten eine ähnliche Versuchsreihe durch, bei der jedoch keine Ischämie sondern eine isolierte transluminale Endothelverletzung der Femoralarterien vorgenommen wurde, um die Regenerationsfähigkeit des Endothels zu untersuchen. Hier zeigte sich in der Gruppe der hDDAH1-transgenen Mäuse in einem vierwöchigen Beobachtungszeitraum eine beschleunigte endotheliale Regenerationsfähigkeit (Konishi et al., 2007). Am Myokard zeigten die hDDAH1-transgenen Mäuse in einem Ischämie-Reperfusionversuch eine um 40-50% verminderte entzündliche Reaktion nach Reperfusion im Vergleich zu den WT-Mäusen (Stühlinger et al., 2007). Im Modell der heterotopen Herztransplantation fand sich eine signifikant verminderte Ausbildung einer Transplantationsvaskulopathie bei den transplantierten Herzen der hDDAH1-transgenen Empfängermäuse (Tanaka et al., 2005). Diese Ergebnisse sind deshalb so bedeutsam, da die Transplantatvaskulopathie die Haupttodesursache im ersten Jahr nach einer Herztransplantation darstellt (Weis und Cooke, 2003).

Weitere Arbeitsgruppen untersuchten die Auswirkung einer gesteigerten hDDAH1-Expression an zerebralen Gefäßen. Die Arbeitsgruppe um Dayoub et al. erforschte dazu den *in vivo*-Effekt einer lokalen ADMA-Infusion an zerebralen Arteriolen von hDDAH1-transgenen Mäusen. Hier konnte eine verbesserte endotheliale Funktion der zerebralen Gefäße unter Überexpression humaner DDAH1 nachgewiesen werden (Dayoub et al., 2008). Die Gruppe um Leypoldt et al. untersuchte, ob sich eine hDDAH1-Überexpression protektiv auf die zerebrale Infarktgröße nach temporaler Okklusion der A. cerebri media auswirkt. Diesbezüglich konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Mausgruppen nachgewiesen werden (Leypoldt et al., 2009). Für das Entstehen kardiovaskulärer Erkrankungen gilt eine gestörte Insulinresistenz als Risikofaktor (Reaven, 2005). Auf diesem Hintergrund wurde die Bedeutung einer hDDAH1-Überexpression in einem Mausmodell

untersucht. Hier zeigte sich eine erhöhte Sensitivität gegenüber Insulin in den hDDAH1-transgenen Mäusen (Sydow et al., 2003).

1.5 ZIEL DER ARBEIT

Der arterielle Hypertonus gilt als Risikofaktor in der Genese zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen. Exakte Kenntnisse der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie sind daher von großem Interesse, um durch neue Therapiekonzepte einer Entstehung und Progression der Hypertonie sowie der hypertonusassoziierten Organschädigung erfolgreich entgegenwirken zu können.

Studien belegen einen engen Zusammenhang zwischen dem endogenen NO-Synthase-Inhibitor ADMA und arterieller Hypertonie. Tierexperimentell zeigte sich nach Infusion von ADMA eine dosisabhängige Druckerhöhung sowohl auf lokaler Ebene der Nierenperfusion als auch im systemischen Kreislauf (Gardiner et al., 1993). An isolierten Nierenarterien konnte nach Gabe von ADMA *ex vivo* eine deutliche Vasokonstriktion beobachtet werden (Segarra et al., 2001).

In vivo führte eine arterielle ADMA-Infusion in den Unterarm von männlichen Probanden zu einer signifikanten Minderperfusion, die durch eine Arginin-Infusion reversibel war (Vallance et al., 1992b). Eine intravenöse ADMA-Infusion bewirkte einen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes sowie eine Reduktion des Schlagvolumens (Achan et al., 2003).

ADMA-Plasmakonzentrationen sind bei Patienten mit arteriellem Hypertonus gegenüber der Norm erhöht (Surdacki et al., 1999). Interessanterweise konnte bei Patienten mit arteriellem Hypertonus gezeigt werden, dass erhöhte ADMA-Konzentrationen mit einer vermehrten Schädigung an Herz und Niere assoziiert waren (Fujii et al., 2008).

In der folgenden Arbeit sollte daher in einem DOCA und Angiotensin II-Hochdruckmodell an der hDDAH1-transgenen Maus die Bedeutung von ADMA und des ADMA-abbauenden Enzyms DDAH in der Pathogenese des arteriellen Hypertonus untersucht werden. Dabei sollte die Hypothese geprüft werden, ob eine Überexpression des hDDAH1-Gens und somit niedrigere ADMA-Konzentrationen sich aufgrund einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit protektiv auf sklerotische und fibrotische Endorganschäden in Niere, Herz und Aorta im Rahmen einer arteriellen Hypertonie auswirkt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 VERSUCHE AM hDDAH1-TRANSGENEN MAUSMODELL

2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die hDDAH1-transgene Maus wurde auf dem Hintergrund der C57BL/6J-Mauslinie gezüchtet. Die Mäuse sind heterozygot für das humane DDAH1-Gen, dem der β -Aktin-Promoter vorgeschaltet ist und zeigen keine Normabweichungen hinsichtlich ihres äußeren Phänotyps. Es findet sich eine erhöhte Genexpression für die hDDAH1 in Aorta, Herz und Gehirn sowie eine signifikante Aktivitätserhöhung der NO-Synthase in der Herzmuskulatur (Schwedhelm et al., 2009). Weiterhin wurde ein signifikant niedrigerer Blutdruck gepaart mit einer erhöhten Herzfrequenz im Vergleich zu WT-Mäusen beschrieben (Dayoub et al., 2003).

Für die in dieser Dissertationsschrift zugrunde liegenden Experimente wurden ausschließlich männliche Tiere eingesetzt. Dabei dienten die nicht-transgenen Geschwistertiere als Kontrollkollektiv (*Littermates*). Die Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter artgerechten Bedingungen und täglicher fachpersoneller Betreuung gehalten. Sie erhielten Trockenpellets als Nahrung und Wasser ad libitum.

2.1.2 Genotypisierung der Mäuse

Da es sich bei den verwendeten hDDAH1-transgenen Mäusen um eine heterozygote Zucht handelte, erfolgte vor Versuchsbeginn zunächst eine Genotypisierung der Mäuse. Dazu wurden den Mäusen Schwanzbiopsien entnommen, aus denen die DNA isoliert, anschließend über eine Polymerasenkettenreaktion (PCR) spezifiziert und im Agarosegel analysiert werden konnte.

Für die Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsien wurde ein *DNeasyKit* (Qiagen) angewandt. Die Schwanzbiopsien wurden bei 56°C in Proteinase K-haltigem Lysepuffer inkubiert. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurde das gewonnene Lysat anschließend weiterverarbeitet und auf eine silikonhaltige Membran überführt.

Diese Membran ermöglichte es, die DNA spezifisch zu binden. Andere im Homogenat befindliche Substanzen, wie etwa Proteine, wurden nicht an die Membran gebunden. Dadurch war es möglich, unerwünschte Substanzen in einem mehrfach wiederholten Waschvorgang aus dem Homogenat zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mittels eines entsprechenden Puffers von der Silikonmembran befreit.

Die PCR diente der selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und erfolgte im *Thermocycler* in drei Schritten. In einem ersten Schritt wurden die Doppelstränge der DNA voneinander getrennt. Diese einminütige Phase der Denaturierung erfolgte bei einer Temperatur von 94°C. Im nächsten Schritt kam es zu einer Hybridbildung zwischen Oligonukleotidprimern und den DNA-Fragmenten. Diese Assoziation war Voraussetzung für den Syntheseschritt. Dazu erfolgte die Bildung eines Komplementärstranges durch die *Taq*-Polymerase. Der Vorteil im Einsatz der *Taq*-Polymerase liegt dabei in seiner Hitzestabilität, da dieses Enzym seine maximale Aktivität bei einer Temperatur von 72°C zeigt, ohne jedoch bei höheren Temperaturen, wie sie für den Denaturierungsschritt erforderlich sind, zu denaturieren.

Die Wahl der optimalen Hybridisierungstemperatur richtete sich nach den verwendeten Primern und liess sich durch folgende Gleichung näherungsweise für jeden Primer ermitteln:

$$T_m = (4 \times [G + C]) + 2 \times [A + T]) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Abb.7: Näherungsformel zur Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur. Die optimale Hybridisierungstemperatur liegt 5-10°C unter der Schmelztemperatur T_m , die sich für jeden Primer durch Kenntnis der exakten Anzahl der Nukleotide Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), sowie Thymin (T) ermitteln lässt.

Die bei der PCR verwendete *HotStar*-Polymerase war zunächst noch kovalent an ein Protein gebunden. Deshalb musste der Ansatz auf 95°C erhitzt werden. Nachdem der letzte Zyklus der PCR beendet worden war, verblieb der Ansatz für weitere 10min bei 72°C, damit noch inkomplette DNA-Fragmente vervollständigt werden konnten.

Die hDDAH1-transgenen Mäuse unterschieden sich anhand ihres DNA-Gehalts an humaner DDAH1 von ihren nicht transgenen *Littermates*. Daher wurde für die Genotypisierung ein Primer gewählt, der Sequenzen des hDDAH1-Gens enthielt. Da das hDDAH1-Gen in WT-Mäusen fehlte, sollte nur in den transgenen Mäusen ein entsprechendes Amplifikat entstehen. Zur Kontrolle, ob die DNA-Isolierung in allen Ansätzen erfolgreich verlaufen war, wurde parallel eine PCR mit einem unspezifischen Primer angesetzt. Als Primer eignete sich dabei das GAPDH, ein ubiquitär vorkommendes Gen, das in allen Zellen gleichermaßen exprimiert wird und sich im Agarosegel als Bande bei 200 Kilobasen präsentiert.

PCR-Ansatz für die Genotypisierung:

<i>Primer forward</i>	1µl
<i>Primer reverse</i>	1µl
<i>HotStar Mastermix</i>	15µl
Aqua bidest.	12µl
DNA	1µl

Die Phaseneinstellung am *Thermocycler* für die PCR:

95 °C	15min	} 34x
94 °C	1min	
57 °C	1min	
72 °C	1min	
72 °C	10min	

Es erfolgte anschließend eine Trennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurden die Proben mit einem Ladepuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel, das zuvor mit Ethidiumbromid versetzt worden war, aufgetragen. Durch Anlage eines Stroms von 120V für insgesamt 30 Minuten kam es zu einer Auftrennung der Proben in spezifische Banden, die durch das dem Gel hinzugefügte Ethidiumbromid detektiert werden konnten. Durch seine Fähigkeiten in die DNA zu interkalieren und unter UV-Licht zu fluoreszieren, erhielt man ein typisches Bandenmuster, mit dem man die transgenen Mäuse identifizieren konnte. Die Detektion und Dokumentation der Banden wurden mittels einer UV-Durchlichtapparatur und einer speziellen Computersoftware (BiodocAnalyse von

Biometra) ermöglicht. Die transgenen Mäuse zeigten bei 300 Basenpaaren eine spezifische Bande. Die Mäuse, die das Gen der humanen DDAH1 nicht in ihrem Genom trugen, hatten diese Bande nicht und wurden folglich als WT-Mäuse definiert. Das zur Kontrolle eingesetzte GAPDH sollte bei allen Proben zu einer Bande führen. Fehlte sie, konnte davon ausgegangen werden, dass die DNA-Isolierung in dem jeweiligen Ansatz nicht erfolgreich gewesen war.



Abb.8: Darstellung der Bandenmuster auf dem Agarosegel. Während GAPDH als sogenanntes *Housekeeping*-Gen sowohl bei den transgenen Mäusen als auch bei den Wildtypen amplifiziert wurde (A), zeigten nur die transgenen Mäusen eine Bande nach Zugabe eines humanen DDAH1-Primers (B).

2.1.3 Versuchsaufbau

Ziel der Arbeit war es, in den Mäusen einen chronischen Bluthochdruck zu provozieren, durch den die blutdrucksensitiven Organe Niere, Herz und Aorta, geschädigt werden. 2007 konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wenzel (Medizinische Klinik II, Nephrologie, UKE) ein Mausmodell etabliert werden, mit dem es gelang, in C57BL/6J-Mäusen hypertonusassoziierte Endorganschäden zu induzieren und molekulargenetisch und histologisch zu quantifizieren (Kirchhoff et al., 2008).

Für die aktuelle Arbeit erfolgte zunächst eine Aufteilung der Tiere in 4 Mausgruppen. Abgestimmt auf Alter und Gewicht wurden die WT- und hDDAH1-transgenen Mäuse jeweils in eine normotensive Kontrollgruppe und eine hypertensive Gruppe eingeteilt.

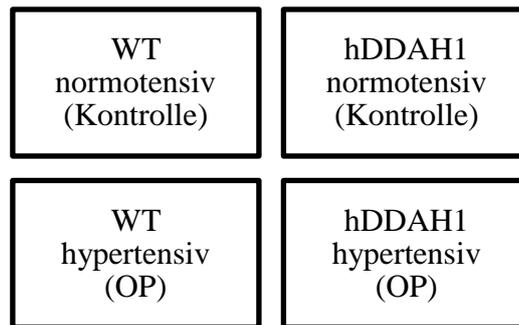


Abb.9: Einteilung der Mausgruppen. Sowohl die Wildtypmäuse als auch die hDDAH1-transgenen Mäuse wurden in eine normotensive Kontrollgruppe und eine hypertensive Gruppe unterteilt.

Alle Tiere, einschließlich der Tiere aus den beiden Kontrollkohorten, wurden zwei Wochen vor Beginn der eigentlichen Hochdruckinduktion rechtsseitig nephrektomiert. Am Tag 14 erfolgte in den OP-Gruppen die Implantation der Deoxy-Kortikosteronacetat (DOCA)-Pellets. DOCA ist ein Aldosteron-Agonist und kann als solches an die Mineralkortikoidrezeptoren binden. Da bekannt ist, dass der Zusatz von salzhaltigem Wasser einen Anstieg des Blutdruckes induziert ohne jedoch die Niere im Sinne einer Nephrosklerose zu schädigen (Heintz und Dobener, 1952), wurde den Mäusen fortan 1% NaCl-haltiges Trinkwasser gegeben. Um einen noch höheren Blutdruck zu erzielen und damit eine stärkere Endorganschädigung zu provozieren, wurde eine Woche nach DOCA-Pellet-Implantation zusätzlich eine osmotische Minipumpe in den hypertensiven Tieren eingesetzt, die kontinuierlich eine definierte Menge von 1,5 μ g Angiotensin II pro kg KG/min freisetzte. Nach 10tägiger Angiotensin II-Infusion wurden die Tiere getötet und die Organe für die weiteren Untersuchungen entnommen. Während der insgesamt fünfwöchigen Versuchsdauer wurde in regelmäßigen Abständen Urin gewonnen und die Gewichts- und Blutdruckverläufe erhoben.

2.1.4 Operationen

24 Stunden vor den geplanten Operationen bekamen die Mäuse 8 Tropfen Novaminsulfon pro 150ml Trinkwasser, um eine angemessene Analgesie zu gewährleisten. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte über ein 4-5%iges Isofluran-Sauerstoffgemisch, das als Inhalationsnarkotikum verabreicht wurde.

2.1.4.1 Einseitige Nephrektomie

Alle Versuchstiere wurden einer rechtsseitigen Nephrektomie unterzogen. Nach Rasur des Operationsfeldes im Bereich der rechten Flanke und Erreichen der erwünschten Narkosetiefe wurden die Tiere in Rückenlage auf der Operationsunterlage fixiert. Das entsprechende Operationsfeld wurde nun gründlich desinfiziert. Über einen Flankenschnitt wurde die Haut durchtrennt und die Bauchmuskulatur und Bauchfellfaszie durchschnitten, um Zugang zur Niere zu erlangen. Um eine akzidentelle Entnahme der Nebenniere zu verhindern, wurde die Organkapsel vorsichtig durchtrennt und abgestreift, die Niere am Gefäßstil abgebunden und entfernt. Um der Gefahr einer Peritonitis durch retrograden Harnfluss in die Bauchhöhle entgegenzuwirken, wurde der Ureter ligiert. Der Peritonealschnitt wurde genäht und die Haut an den Wundrändern geklammert.

2.1.4.2 Implantation der DOCA-Pellets

Die DOCA-Pellets wurden bei den Hochdrucktieren, nicht aber bei den normotensiven Kontrolltieren, unter sterilen Bedingungen implantiert. Nach Narkotisierung über ein 4-5%iges Isofluran-Sauerstoffgemisch wurde das Pellet subkutan über einen kleinen Hautschnitt in der rasierten linken Flanke platziert. Um lokale Entzündungen und Pelletkontakt zur Wundfläche weitestgehend zu vermeiden, wurde eine große Hauttasche geformt, in die das Pellet tief eingesetzt wurde. Der Wundverschluss erfolgte analog zur Nephrektomie mit Klammern.

2.1.4.3 Vorbereitung und Implantation der Angiotensin II-Pumpen

Die Angiotensin II-Pumpen wurden unter sterilen Bedingungen gewichtsadaptiert befüllt, so dass in jeder Maus 1,5µg Angiotensin II pro kg KG/min freigesetzt wurde. Nach Rasur des Nackens wurde durch einen Hautschnitt ein subkutaner Zugang erreicht. Nach Aufweiten der Hauttasche wurde die Pumpe implantiert und die Wunde geklammert.

2.1.4.4 Postoperative Überwachung der Tiere

Um die Mäuse während der Operationen vor einer etwaigen Auskühlung zu schützen, wurden sie auf eine Wärmedecke gesetzt. Die postoperative Analgesie erfolgte durch Zufuhr von 40 Tropfen Novaminsulfon (500mg/ml) über das Trinkwasser für etwa 4 Tage. Die Wundflächen wurden zunächst täglich, später alle zwei Tage auf Entzündungen und Nahtinsuffizienzen untersucht und ggf. mit Dexpanthenol zur Verbesserung der Wundheilung versorgt. Die Hautklammern wurden bei der jeweils nächsten Operation unter Narkose entfernt und die Körpergewichte in regelmäßigen Abständen ermittelt.

2.1.5 Blutdruckmessung mittels *Tail-Cuff*-Plethysmographie

Das Verfahren der *Tail-Cuff*-Plethysmographie beruht auf einer indirekten Messung des systolischen Blutdruckes über die Schwanzarterie an der wachen Maus. Dabei wurde die Maus zunächst auf eine Wärmeplatte gesetzt und in einem Metallgehäuse so fixiert, dass ihr keine Möglichkeit zur Flucht geboten wurde. Um den Schwanz der Maus wurde anschließend eine kleine Blutdruckmanschette gelegt. Über einen Detektor war es möglich den Puls zu erfassen, zu verstärken und graphisch zur Darstellung zu bringen. Dieser zeigte sich als Sinuskurve auf einem angeschlossenen Oszillographen. Wurde die Blutdruckmanschette über ein Quecksilbermanometer auf 200mmHg aufgepumpt, sistierte das Pulsieren der Schwanzarterie. Durch sukzessives Druckablassen um 10mmHg konnte der systolische Blutdruck anhand des erneuten Nachweises des Pulsierens bestimmt werden. Zur Verifizierung wurden die Messungen jeweils dreimal wiederholt und anschließend das arithmetische Mittel aus den Einzelwerten gebildet. Über den Zeitraum des Versuchsansatzes wurden die Blutdruckwerte wöchentlich und jeweils zur gleichen Uhrzeit erhoben. Um eine möglichst genaue Messung durchführen zu können, wurden die Mäuse vor Beginn des eigentlichen Versuchsansatzes an das Verfahren gewöhnt.

2.1.6 Uringewinnung im Stoffwechselkäfig

Für eine exakte Uringewinnung wurden die Tiere in einen speziell angefertigten Käfig mit muldenförmigen Ausbuchtungen zur Uringewinnung gesetzt. Da dieser keinen freien Zugang zu Nahrung zuliess, wurde die Verweildauer auf 6 Stunden begrenzt. Der gesammelte Urin wurde bei 10000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Da die zu erfassende Albuminurie aufgrund einer progressiven Nierenschädigung im Verlauf des Versuches stetig anstieg, wurden die Tiere 4 und 8 Tage nach der Implantation der osmotischen Angiotensin II-Minipumpen in den Stoffwechselkäfig gesetzt, um nachfolgend einen Mittelwert bezüglich der Albuminurie bestimmen zu können.

2.1.7 Sakrifizierung und Organentnahme

Die Sakrifizierung der Tiere erfolgte 10 Tage nach Implantation der Angiotensin II-Pumpen. Nach Narkotisierung der Mäuse wurde der Brust- und Bauchraum eröffnet und der operative Situs zur Darstellung gebracht. Die abdominelle Aorta wurde vorsichtig punktiert und anschließend über eine heparinisierte Spritze ca. 0,7ml Blut entnommen. Das Blut wurde bei 4°C für 10 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert, das Plasma in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Die Aorta wurde vollständig aus dem Situs entfernt und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Es folgte die Entnahme des Herzens mit anschließender Messung des Feuchtgewichtes. Die Herzvorhöfe wurden entfernt und verworfen. Anschließend wurde die Herzspitze abgeschnitten und in Formalin fixiert. Das verbleibende Herzgewebe wurde in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurde die noch verbliebene linke Niere abgetrennt und ihre Nierenkapsel entfernt. Eine mittlere Nierenscheibe wurde in Formalin fixiert, der restliche Teil des Nierengewebes wurde mit Flüssigstickstoff behandelt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1 RNA-Isolierung aus Herz- und Nierengewebe

Für die Untersuchung der Genexpression mittels quantitativer *Real Time*-PCR (RT-PCR) wurde zunächst RNA aus Nieren- und Herzgewebe isoliert. Das *High-Capacity RNeasy Kit*(Qiagen) ermöglichte es, RNA in einer relativ großen Menge aus dem Gewebe zu isolieren.

Zunächst wurde mit Hilfe einer Feinwaage 40mg Gewebe abgewogen. Dieses Gewebe wurde mittels RLT, einem Guanidinthiocyanit-haltigen Puffer, lysiert und anschließend im *Tissuelyser* für 2 Minuten bei 30 Hertz homogenisiert. Dem Homogenat wurde Ethanol zugegeben und anschließend auf eine Säule übertragen, die durch ihre Silikonmembran bis zu 10µg RNA mit einer Länge über 200 Basenpaare binden konnte, während andere Substanzen durchgelassen wurden. Nach Auswaschen des Homogenats wurde die RNA eluiert und über photometrische Messungen auf ihren Reinheitsgehalt getestet. Ermittelt wurden die Quotienten 260/280nm, sowie 260/230nm im Photometer. Beide Quotienten sollten zwischen 1,8-2,2 liegen.

Ansatz für die RNA-Isolierung:

RLT-Puffer	600µl
RW 1-Puffer	350µl
RPE-Puffer	2x500µl
RNAse freies Wasser	30µl
β-Mercaptoethanol	10µl je 1ml RLT
70% Ethanol	500µl

2.2.2 cDNA-Gewinnung und Qualitätskontrolle über GAPDH-PCR

Um aus den Gewebeproben später die Genexpression ermitteln zu können, musste die gewonnene RNA zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden, die später in die RT-PCR eingesetzt werden konnte. Für die cDNA-Synthese wurde ein *2xRT Master Mix*-Ansatz erstellt. Anschließend wurde eine definierte RNA-Menge

von 1 µg hinzugefügt und der Reaktionsansatz mit destilliertem Wasser so aufgefüllt, dass ein Reaktionsvolumen von 20 µl erreicht wurde.

Ansatz für den 2xRT *Master Mix*:

10xRT-Puffer	2,0 µl
25xdNTP-Mix	0,8 µl
10xRT <i>Random Primers</i>	2,0 µl
<i>MultiScribe</i> TM Reverse Transkriptase	2,0 µl

Die Reaktion wurde im *Thermocycler* gestartet. Die cDNA-Synthese umfasste dabei drei Phasen. Die erste Phase, das *Annealing*, dauerte 10 Minuten und diente der Anlagerung der *Random Primer* an den RNA-Strang. Anschließend wurden die eingesetzten Proben auf 37°C erhitzt. Diese Temperatur entsprach dem Temperaturoptimum der reversen Transkriptase, die daraufhin den komplementären cDNA-Strang synthetisierte. Schließlich erfolgte eine kurze Erhitzung des Ansatzes auf 85°C, die zur Denaturierung der reversen Transkriptase führte.

Phaseneinstellung am *Thermocycler* für die cDNA-Synthese:

25°C	10min
37°C	83min 20sec
85°C	0min 5sec

Nach der Reaktion wurde jedem Ansatz 150 µl nukleasefreies Wasser zugefügt, der Ansatz aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für eine anschließende PCR wurden jeweils 11 µl der verdünnten cDNA verwendet.

Um zu kontrollieren, ob die cDNA-Synthese in allen Ansätzen erfolgreich gewesen war und in jedem Ansatz die gleiche Menge RNA eingesetzt worden war, wurde 1 µl jeder Probe in eine GAPDH-PCR eingesetzt. GAPDH ist ein sogenanntes *Housekeeping*-Gen, das in allen Geweben gleichermaßen exprimiert wird. Durch Amplifikation der cDNA für dieses Gen war somit anzunehmen, dass in allen Proben aufgrund der identisch eingesetzten RNA-Menge eine vergleichbar große Menge GAPDH vorhanden war.

Ansatz für die GAPDH-PCR:

GAPDH <i>Primer forward</i>	1µl
GAPDH <i>Primer reverse</i>	1µl
<i>HotStar Mastermix</i>	15µl
Aqua bidest.	12µl
cDNA	1µl

Phaseneinstellung am *Thermocycler* für die GAPDH-PCR:

95°C	15min	} 36x
94°C	1min	
57°C	1min	
72°C	1min	
72°C	10min	

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurde das Gemisch zunächst mit 6ml 6x *Loading Buffer* versehen und auf ein 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Das Gel lief bei 120 Volt für 45 Minuten. Die durch die PCR vervielfältigten Fragmente konnten durch die Färbung mit Ethidiumbromid unter einer UV-Leuchte als Bande sichtbar gemacht werden.

Die Größe und Menge des Amplifikats wurde auf einem Agarosegel überprüft.



Abb.10: Agarosegel zur Kontrolle der cDNA-Synthese. In allen PCR-Ansätzen wurde eine vergleichbar große Menge GAPDH amplifiziert. Die cDNA-Synthese ist somit erfolgreich gewesen und konnte für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

2.2.3 Quantitative RT-PCR

Die RT-PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung und Quantifizierung genetischen Materials. Durch diese Methode ist es möglich, Expressionsunterschiede zwischen Gruppen zu ermitteln und als n-fachen Unterschied anzugeben. Die Messung unterliegt dabei dem *Taqman*-Prinzip von Applied Biosystems RT-PCR.

Für die quantitative Auswertung wurde GAPDH als interne Kontrolle gewählt. Der erhobene Ct-Wert der internen Kontrolle wurde zunächst vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (ΔCt). Diese ΔCt -Werte wurden unter den zu vergleichenden Gruppen (normotensiv/hypertensiv) abermals subtrahiert, so dass man den sogenannten $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert erhielt und die Expression mit $n=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ermitteln konnte.

2.3 ORGANBAD

2.3.1 Prinzip



Abb.11: Bild einer Organbadkammer.

Mittels Organbaduntersuchungen ist es möglich, die Relaxationsfähigkeit von Gefäßen *ex vivo* zu untersuchen und somit einen Rückschluss auf die Gefäßfunktion *in vivo* zu ziehen. Dazu werden die Gefäße in Ringe geschnitten und unterschiedlichen physiologischen Stimuli ausgesetzt. Da hierbei sowohl endothelabhängige (Acetylcholin) als auch endothelunabhängige Reize (Nitroglycerin) zum Einsatz kommen, ist es möglich, die Ursachen für einen eventuellen Gefäßschaden einzugrenzen. Die verwendete Apparatur macht es möglich, bis zu 8 Gefäßringe pro Versuchsreihe separat und gleichzeitig zu untersuchen.

2.3.2 Durchführung

Die entnommenen Aorten wurden zunächst in PBS-Puffer gespült, von umgebendem Binde- und Fettgewebe befreit und anschließend in ca. 5mm lange Ringe aufgeteilt. Ein solcher Ring wurde dann in ein mit 25ml Phosphatpuffer gefülltes Organbad so eingesetzt, dass es von intraluminal über zwei Stahldrähte fixiert wurde und in Kontakt mit einem isometrischen Kraftaufnehmer stand. Dieser Kraftaufnehmer diente dazu, Kräfteveränderungen im Gefäß, wie sie bei Vasodilatation bzw. –kon-

striktion vorkommen, zu registrieren und in elektrische Signale umzuwandeln. Diese Signale wurden dann über einen Verstärker graphisch umgesetzt. Die Aortenringe waren vollständig von Puffer umgeben und wurden zusätzlich mit einem Carbogen-Gemisch (95% O₂, 5% CO₂) inkubiert. Um physiologischen Bedingungen gerecht zu werden, wurde das Organbad durch einen externen, beheizten Wasserkreislauf konstant auf 37°C gehalten.

Mittels einer aufsteigenden Konzentration von Kaliumchlorid (KCl) wurde zunächst die maximal mögliche Kontraktionsmöglichkeit des Gefäßes gemessen. Dazu wurde eine ansteigende KCl-Dosiswirkungskurve von 5-80mM erstellt. Die dabei erreichte maximale Kontraktion wurde als 100% definiert und erlaubte damit eine qualitative Aussage über die nachfolgend erhobenen Daten zur Relaxationsfähigkeit.

2.3.2.1 Endothelabhängige Vasodilatation

Um die Relaxationsfähigkeit eines Gefäßringes zu messen, musste zunächst eine Tonisierung erfolgen. Dafür eignet sich bei murinen Gefäßen vor allem Prostaglandin F_{2α}. Die Konzentration wurde dabei so gewählt, dass eine halbmaximale Kontraktion erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Acetylcholin-Gabe, die in steigenden Dosen von log 10⁻⁹ bis log 10^{-5,5}M titriert wurde. Die dabei auftretende Relaxation wurde vom Kraftmesser erfasst und graphisch verarbeitet.

2.3.2.2 Endothelunabhängige Vasodilatation

Die Aortenringe wurden nun zweimal in Puffer gewaschen und abermals mit PGF_{2α} konstringiert. Anschließend wurde als endothelunabhängiger Reiz Nitroglycerin (NTG) verwendet. Durch Titration in Konzentrationen von log 10⁻⁹ bis log 10^{-4,5}M liess sich auch für den endothelunabhängigen Stimulus eine Dosiswirkungskurve erstellen.

2.4 HISTOLOGISCHE ORGANVERARBEITUNG

2.4.1 Fixierung des Gewebes und Anfertigung der Schnitte

Die feingewebliche Verarbeitung fand mit Hilfe des Histologielaors der Arbeitsgruppe Wenzel statt. Das gewonnene Organmaterial wurde über Nacht bei 4°C in 4% Formalin fixiert. Nach 24 Stunden wurde das Formalin in mehreren Waschschrirten mit PBS ausgespült, das Gewebe in Cacodylatpuffer gelegt und schließlich in Paraffin eingebettet. Mittels Mikrotom wurden 5-10µm große Schnitte auf Objektträgern angefertigt und anschließend gefärbt.

2.4.2 PAS-Färbung

Vor jeder Färbung wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger über Nacht auf 40°C erwärmt. Anschließend wurden die Objektträger für 3x 5 Minuten in Xylol gelegt und in einer Reihe absteigender Alkoholkonzentrationen (100%, 95%, 75%, 50%) für jeweils 2x 5 Minuten getaucht. Vor der Färbung wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült und mit PBS-Puffer gewaschen.

Für die PAS-Färbung wurden die Objektträger zunächst von 1% Periodsäure bedeckt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Es wurden die Schnitte dann für 40min in Schiff'sches Reagenz gelegt und abermals gespült. Es folgte eine Anfärbung der Kerne mittels Hämatoxylin (Gill et al., 1974). Nach Auswaschen des Färbemittels mit warmem Leitungswasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 75%, 95%, 100%) und anschließend in Xylol fixiert und mit Vitroclud eingedeckt.

Zum *Scoring* der Schnitte wurde ein verblindetes, semiquantitatives Auswerteverfahren angewandt. Zur Festlegung der histopathologischen Schädigung wurde dabei jeweils ein Score von 0-3 definiert:

Für die Glomerulosklerose galt dabei:

0= keine glomeruläre Sklerose nachweisbar

1= Sklerose an weniger als ¼ des Glomerulums nachweisbar

2= Sklerose mehr als $\frac{1}{4}$, aber nicht das ganze Glomerulum betreffend

3= Sklerose das ganze Glomerulum betreffend.

Ähnlich wurde für die kardiale Fibrose ein Score von 0 bis 3 festgelegt:

0 = keine Fibrosezeichen

1= vereinzelte Fibroseherde nachweisbar

2= konfluierende Fibrosefelder nachweisbar, aber nicht das ganze Myokard betroffen

3= gesamtes Myokard von Fibrose betroffen.

2.5 KLINISCHE CHEMIE

2.5.1 Bestimmung der ADMA-Plasmakonzentrationen

Die Messung der Plasmakonzentrationen von ADMA und SDMA wurde am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Methode beruht auf der Kombination einer Flüssigkeitschromatographie mit einer Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS-System). Dabei ist es anhand der Flüssigkeitschromatographie möglich, unterschiedliche Substanzen aufzutrennen, die anschließend mit der Massenspektrometrie identifiziert und mit [$^2\text{H}_6$]-ADMA bzw. [$^2\text{H}_6$]-SDMA als internen Standard quantifiziert werden können.

Je 100 μl des internen Standards wurden zu 25 μl der Plasmaproben hinzugefügt. Die in den Proben vorhandenen Proteine wurden präzipitiert und der Überstand eingengt. Der Überstand wurde nachfolgend durch Zusatz von 100 μl buthanolischer Salzsäure für 17 Minuten bei 65°C derivatisiert und anschließend getrocknet. Zum Einsatz in das LC-MS/MS-System wurde nun der Ansatz in 100 μl bidestilliertem Wasser resuspendiert.

2.5.2 Bestimmung der Cholesterin- und Harnstoffkonzentration im Plasma

Die Bestimmung der Cholesterin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma fand im Zentrallabor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mittels enzymatischer Farbtestreaktionen statt.

2.5.3 Albuminurie

Die murine Albuminausscheidung wurde mittels einer Sodiumdodecylsulfate (SDS)-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung bestimmt. Das SDS verleiht hydrophoben Proteinabschnitten durch ihre Bindung eine stark negative Eigenschaft. Dies ermöglicht ein Wandern der Proteine im elektrischen Feld. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in der Elektrophorese proportional zu ihrem Molekulargewicht, so dass ein Auftrennen der Proteine nach ihrer Größe möglich ist.

Verwendet wurde ein 10% Trenngel der Firma Lonza. Das bereits vorgegossene Gel wurde aus der Verpackung genommen, der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen mit Aqua bidest. gespült. Die Proben wurden mit 5x SDS-Puffer beladen und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Jeweils 15µl der aufbereiteten Proben wurden anschließend in die Taschen gefüllt. In die Anodenkammer wurden 200ml, in die Kathodenkammer 600ml Laufpuffer gegeben. Zusätzlich zu den Proben wurden zwei verschiedene Proteinstandards hinzugefügt. Das Gel lief für eine Stunde bei 30mA. Anschließend wurde das Gel in der Coomassie-Färbelösung für eine Stunde gefärbt und in die Entfärbelösung gelegt, so dass nur noch die Proteine, die den Farbstoff binden konnten, als blaue Banden erschienen. Abschließend wurden die Banden densitometrisch ausgemessen.

2.6 STATISTIK

Alle erhobenen Daten wurden als Mittelwert \pm *Standard Error of the Mean* (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen T-Test oder

dem *one-way* ANOVA-Test gefolgt von einem Bonferroni post hoc Test ermittelt. Dabei wurde eine statistische Signifikanz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ definiert. Daten, die um mehr als das Zweifache der Standardabweichung vom Mittelwert abweichen, wurden als Ausreißer definiert und von der Auswertung ausgeschlossen.

2.7 MATERIALIEN

2.7.1 Tierexperimentelle Arbeiten

DOCA-Pellet	<i>Doca Pellets, Innovative Research of America, 50mg, 21 day release</i>
Angiotensin II	Ang II 10mg Portionen, Fa. Sigma Aldrich
Osmotische Minipumpen	<i>Osmotic Minipumps, Modell 1002, Fa. Alzet</i>
Maus	C57BL/6J Tg (ACTB-DDAH1)1Jpck/J [Bereitstellung durch Prof. J.P. Cooke, Cardiovascular Medicine, Stanford University, USA]

2.7.2 Kits

DNA-Isolierung	<i>DNeasy Mini Kit, Qiagen</i>
RNA-Isolierung	<i>RNeasy Mini Kit, Qiagen</i>
cDNA-Synthese	<i>High-capacity cDNA Archive Kit, Qiagen</i>

2.7.3 Puffer und Lösungen

PBS-Puffer:

Zusammensetzung	8,00g NaCl 0,20g KCl 1,44g Na ₂ HPO ₄ 0,24g KH ₂ PO ₄ ad 1000ml Aqua dest.
-----------------	--

1% -iges Agarosegel:

Zusammensetzung	1g Agarose 5ml TBE ad 100ml Aqua bidest. 15µl Ethidiumbromid
-----------------	---

Ladepuffer	130mM Tris-HCl, pH 8,0 20% Glyzerol 4,6% SDS 0,02% Bromphenolblau 2,0% Dithiothreitol
------------	---

DNA ladder

100bp DNA ladder
1kb DNA ladder

Organbad-Puffer:

NaCl	28,9g
KCl	1,75g
CaCl ₂	1,835g
MgSO ₄	1,48g
NaHCO ₃	10,5g
KH ₂ PO ₄	0,7g
7-D-Glucose	10g
+ Indomethacin	15ml
+ 5° NaOH	Milipore

Organhomogenisierung:

Hg-Puffer
0,121g Tris-HCl
4,280g Saccharose
0,057g EGTA
0,292g EDTA
ad 50ml Aqua bidest. pH 7,5

Hg-Lösung
10ml Hg-Puffer
100µl Aprotinin
35µl Pepstatin
10µl Leupeptin
50µl 0,1 M PMSF
10µl 1 mM Cantharidin
100µl 1% Triton-X100

2.7.4 Primer

Primer zur Genotypisierung:

hDDAH1 *forward*: 5' – ATG CAA CTT TAG ATG GCG GAG – 3'

hDDAH1 *reverse*: 5' – TCA TCA GGC ACA GTG AGT TTG – 3'

GAPDH *forward*: 5' – GCA TCT GAG GGC CCA CTG AAG – 3'

GAPDH *reverse*: 5' – GTC CAC CAC GTT GCT GTA – 3'

Primer für RT-PCR:

ANP	Mm 01255748_g1
BNP	Mm 00435303_g1
Kollagen I	Mm 01165172_m1
Kollagen III	Mm 01254467_m1
Fibronektin	Mm 012567644_m1
MCP-1	Mm 00441242_m1
PAI-1	Mm 00435858_m1
VCAM-1	Mm 01320970_m1

3 ERGEBNISSE

3.1 EINTEILUNG DER MAUSGRUPPEN

Die Mausgruppen wurden in Abhängigkeit von Körpergewicht und Alter in jeweils vier Gruppen eingeteilt. Im Verlauf des Versuches verstarben in der Gruppe der hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäuse 7 von 16 Tieren sowie in der Gruppe der hypertensiven WT-Mäuse 9 von 20 Tieren. Dies entspricht einer Letalität von 44% bzw. 45%.

Tab. 1: Überblick über die Mausgruppen. Dargestellt sind die Anzahl der Mäuse je Versuchsgruppe sowie deren durchschnittliches Gewicht und Alter.

Mausgruppe		Anzahl gesamt	Ausgangsgewicht	Alter in Wochen
<i>normotensiv</i>	WT	12	26,0g ± 1,1g	8,8
	hDDAH1	10	27,8g ± 1,3g	9,4
<i>hypertensiv</i>	WT	11	26,0g ± 0,9g	9,0
	hDDAH1	9	26,0g ± 1,0g	8,8

3.2 VERLAUFSPARAMETER

3.2.1 Veränderungen des Blutdruckes

In regelmäßigen Abständen und jeweils zu identischen Uhrzeiten wurde der systolische Blutdruck mittels *Tail-Cuff*-Plethysmographie gemessen.

Zu Beginn einer Versuchsreihe gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des systolischen Blutdruckes unter den vier Mausgruppen. Nach Implantation der DOCA-Pellets an Tag 14 stieg der Blutdruck in den operierten hDDAH1-transgenen Tieren ($120,7 \pm 2,6\text{mmHg}$) bezogen auf ihre Kontrollgruppe ($95,1 \pm 2,4\text{mmHg}$) signifikant an ($p < 0,01$). Ein ähnliches Resultat ergab sich bei den WT-Mäusen, bei denen der Blutdruck der operierten Tiere bei $122,9 \pm 1,7\text{mmHg}$ lag und sich damit von der Kontrollgruppe ($93,3 \pm 1,6\text{mmHg}$) signifikant unterschied ($p < 0,01$).

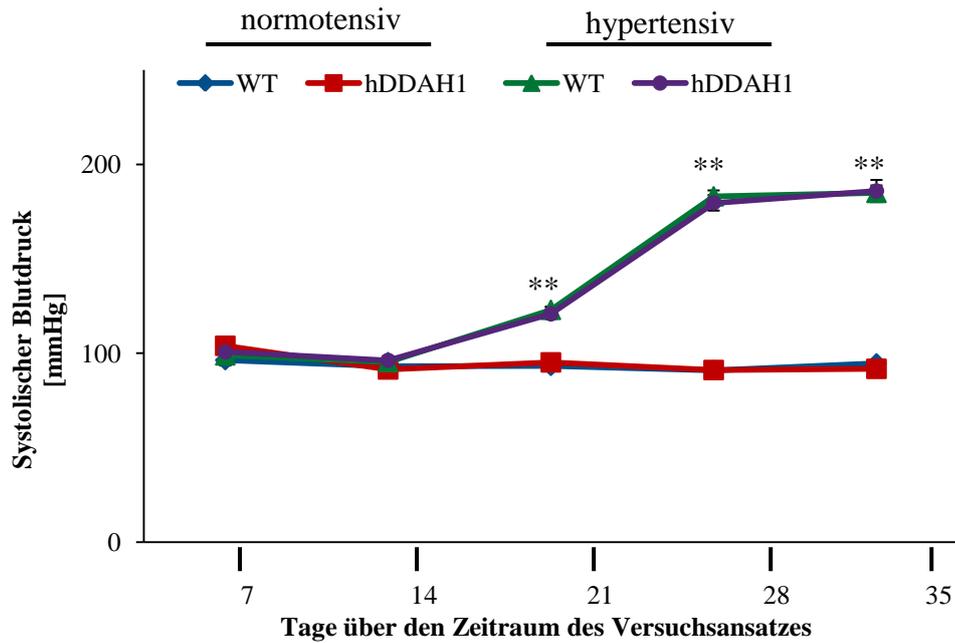


Abb.12: Entwicklung des Blutdruckes über den Zeitraum des Versuchsansatzes. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM (**p < 0,01 hypertensive WT-Gruppe vs. WT-Kontrollgruppe und hypertensive hDDAH1-transgene Gruppe vs. hDDAH1-transgene Kontrollgruppe).

Ab Tag 21 erfolgte durch Einsatz von osmotischen Minipumpen eine kontinuierliche Gabe von Angiotensin II in den hypertensiven Tieren. Hierdurch stieg der systolische Blutdruck sowohl in den hDDAH1-transgenen Mäusen ($179,5 \pm 4,1$ mmHg) als auch in den WT-Mäusen ($183,0 \pm 3,1$ mmHg) nochmals an, während die Blutdrücke in den Kontrollgruppen konstant blieben (hDDAH1 $91,0 \pm 1,0$ mmHg und WT $91,0 \pm 1,2$ mmHg). Diese Blutdruckerhöhung war sowohl bei den hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäusen wie auch bei der hypertensiven WT-Gruppe bezogen auf ihre jeweiligen Kontrollgruppen signifikant (p < 0,01).

Während der gesamten Versuchsdauer ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen normotensiven bzw. hypertensiven Gruppen.

3.2.2 Veränderungen des Körpergewichtes

Parallel zum Blutdruck wurde das Körpergewicht der Mäuse erfasst, um auch hier Änderungen erfassen und quantifizieren zu können.

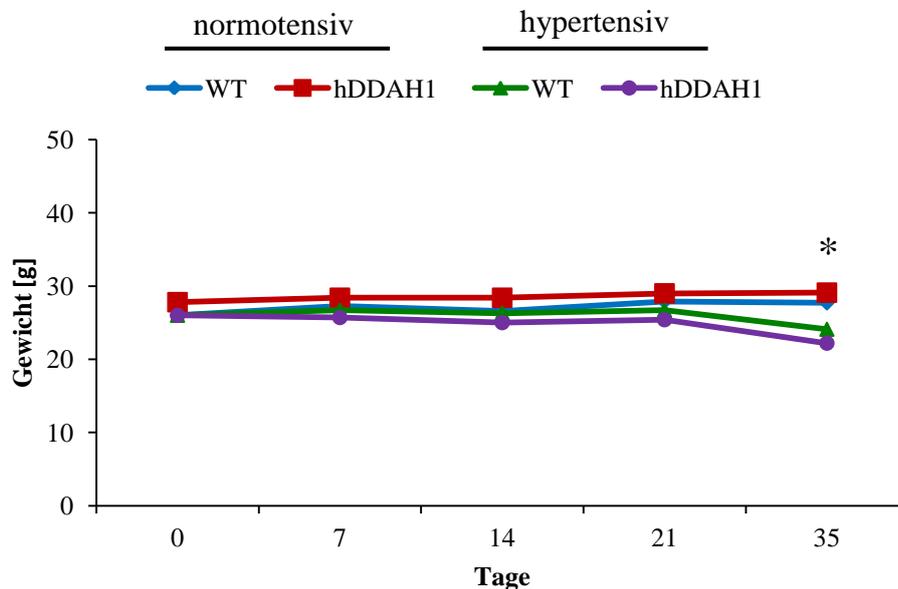


Abb.13: Entwicklung des Körpergewichtes über den Zeitraum des Versuchsansatzes. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM (* $p < 0,05$ hypertensive WT-Gruppe vs. WT-Kontrollgruppe und hypertensive hDDAH1-transgene Gruppe vs. hDDAH1-transgene Kontrollgruppe).

Bis Tag 21 blieben die Körpergewichte der Mäuse in allen vier Gruppen konstant ($p = n.s.$). Ab Tag 21 zeigte sich eine deutliche Reduktion des Körpergewichtes in beiden Gruppen der hypertensiven Tiere. Dabei sank das Körpergewicht bei den operierten hDDAH1-transgenen Mäusen von $26,0 \pm 1,0g$ bei Versuchsbeginn auf $22,2 \pm 1,0g$ bei Versuchsende und bei den WT-Mäusen von $26,0 \pm 0,9g$ an Tag 0 auf $24,1 \pm 0,9g$ an Tag 35 ab. Dieser Gewichtsabfall in den hypertensiven Gruppen war bezogen auf die entsprechenden Kontrollgruppen jeweils signifikant ($p < 0,05$).

3.2.3 ADMA- und SDMA-Plasmakonzentrationen

Tab. 2: ADMA- und SDMA-Plasmakonzentrationen in den Mausgruppen nach Versuchsende.

[$\mu\text{mol/l}$]	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
ADMA	<i>normotensiv</i>	WT	0,82	0,04	12
		hDDAH1	0,51	0,02	10
	<i>hypertensiv</i>	WT	0,85	0,04	11
		hDDAH1	0,57	0,05	9
SDMA	<i>normotensiv</i>	WT	0,18	0,01	12
		hDDAH1	0,17	0,01	10
	<i>hypertensiv</i>	WT	0,18	0,01	11
		hDDAH1	0,22	0,02	9

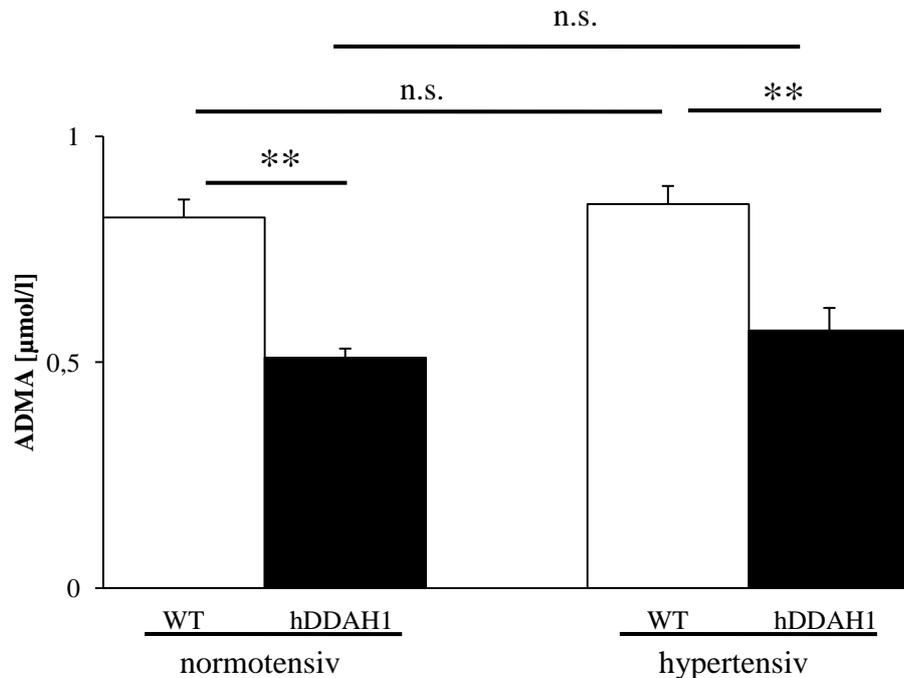


Abb.14: ADMA-Plasmakonzentrationen in den Mausgruppen nach Versuchsende. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 9-12 Versuchstieren (**p < 0,01).

Zwischen den WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen bestand sowohl in der hypertensiven Gruppe als auch in der normotensiven Gruppe ein signifikanter Unterschied bezüglich der ADMA-Plasmakonzentration (p < 0,01). Ein Anstieg von

ADMA unter hypertensiver Behandlung konnte weder innerhalb der WT-Gruppen noch innerhalb der hDDAH1-transgenen Gruppen beobachtet werden.

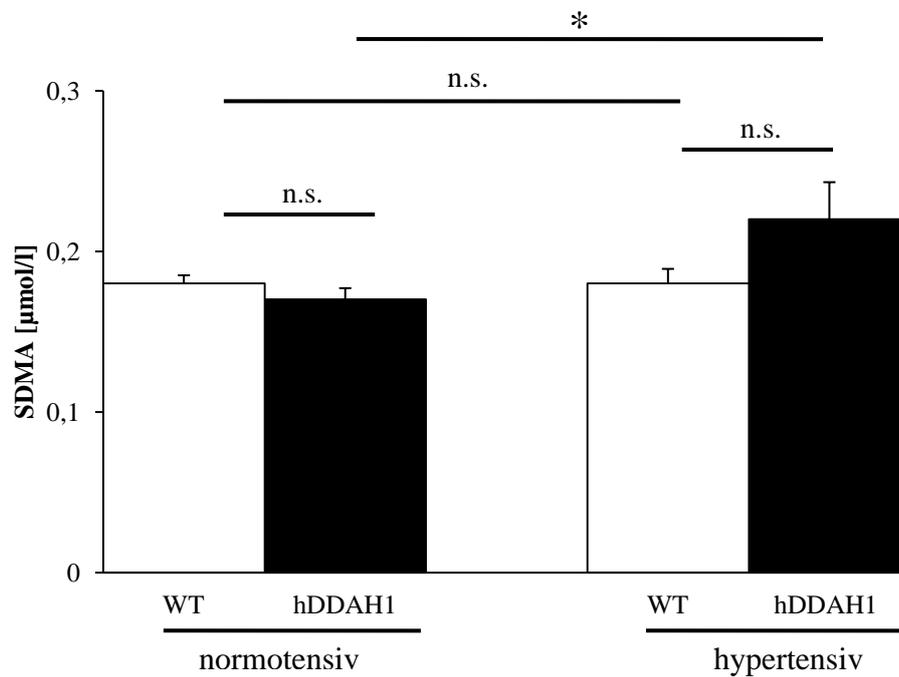


Abb.15: SDMA-Plasmakonzentrationen in den Mausgruppen nach Versuchsende. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 9-12 Versuchstieren (* $p < 0,05$).

Bezüglich der SDMA-Plasmakonzentrationen zeigten sich innerhalb der normotensiven Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Unter hypertensiven Blutdruckwerten kam es zu einem signifikanten Anstieg von SDMA in den hDDAH1-transgenen Mäusen ($p < 0,05$). Dieser Anstieg blieb in der hypertensiven WT-Gruppe aus.

3.3 EINFLUSS DER hDDAH1-ÜBEREXPRESSION AUF HYPERTONUS-ASSOZIIERTE ENDORGANSCHÄDEN

3.3.1 Entwicklung hypertonusassoziierter Schäden an der Niere

3.3.1.1 Funktionsleistung der Niere

Ein frühes Zeichen für hochdruckassoziierte Nierenschäden ist eine Albuminurie. Um den Eiweißverlust auszugleichen, reagiert der Organismus mit einer Steigerung der Cholesterinsynthese. Die Albuminurie und erhöhte Cholesterinplasmakonzentrationen sind daher Hinweise auf eine renale Funktionseinschränkung im Sinne eines nephrotischen Syndroms.

Albuminurie:

Die Albuminurie ist ein indirekter Hinweis für hochdruckassoziierte Schäden an den Glomerula und spiegelt eine eingeschränkte Filtrationsfähigkeit der Niere wider.

Tab. 3: Albuminurie in den Mausgruppen.

AUC	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
Albuminurie	<i>normotensiv</i>	WT	580	371	4
		hDDAH1	114	23	4
	<i>hypertensiv</i>	WT	10169	3491	4
		hDDAH1	13268	2575	4

Bei der densitometrischen Auswertung des Coomassie-Gels zeigte sich, dass die normotensiven WT-Mäuse eine signifikant geringere Menge Albumin als die hypertensiven WT-Mäuse ausschieden (580 ± 371 vs. 10169 ± 3491 AUC). Ebenso verhielt es sich zwischen den normo- und hypertensiven hDDAH1-transgenen Mausgruppen (114 ± 23 vs. 13268 ± 2575 AUC). Zwischen den hypertensiven WT-Mäusen und den hDDAH1-transgenen Mäusen konnten hingegen keine Unterschiede bezüglich der Albuminausscheidung gemessen werden ($p = n.s.$).

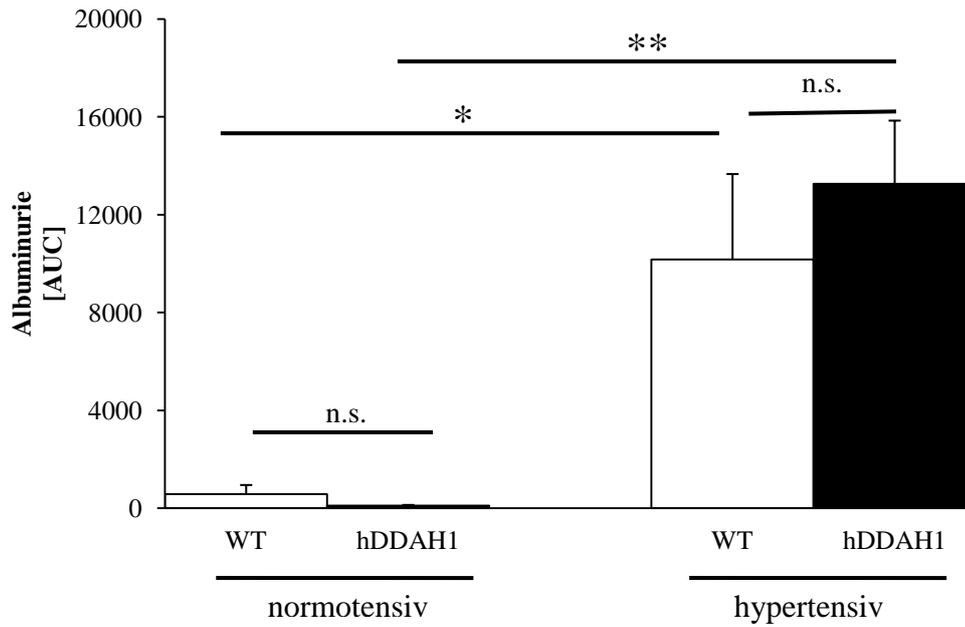


Abb.16: Albuminurie in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 4 Versuchstieren (*p < 0,05; **p < 0,01).

Cholesterin- und Harnstoffplasmakonzentration

Tab.4: Cholesterin- und Harnstoffplasmakonzentration in den Mausgruppen.

mg/dl	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
Cholesterin	<i>normotensiv</i>	WT	83,4	3,8	11
		hDDAH1	78,4	3,1	9
	<i>hypertensiv</i>	WT	141,4	26,0	11
		hDDAH1	190,0	37,4	8
Harnstoff	<i>normotensiv</i>	WT	43,3	1,6	10
		hDDAH1	41,6	2,9	10
	<i>hypertensiv</i>	WT	34,9	2,1	11
		hDDAH1	36,1	4,2	8

Unter hypertensiven Blutdrücken kam es sowohl in den hDDAH1-transgenen Mäusen als auch in den WT-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Cholesterinplasmakonzentration. Zwischen den beiden hypertensiven Mausgruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

Die Mäuse mit arteriellem Hypertonus zeigten zusätzlich eine Abnahme der Harnstoffkonzentrationen im Plasma. Diese betraf sowohl die hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäuse als auch die WT-Mäuse. Diese Abnahme war jedoch nur bei den hypertensiven WT-Mäusen im Vergleich zu den normotensiven WT-Mäusen signifikant ($p < 0,01$). Innerhalb der normotensiven Gruppen bzw. der hypertensiven Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

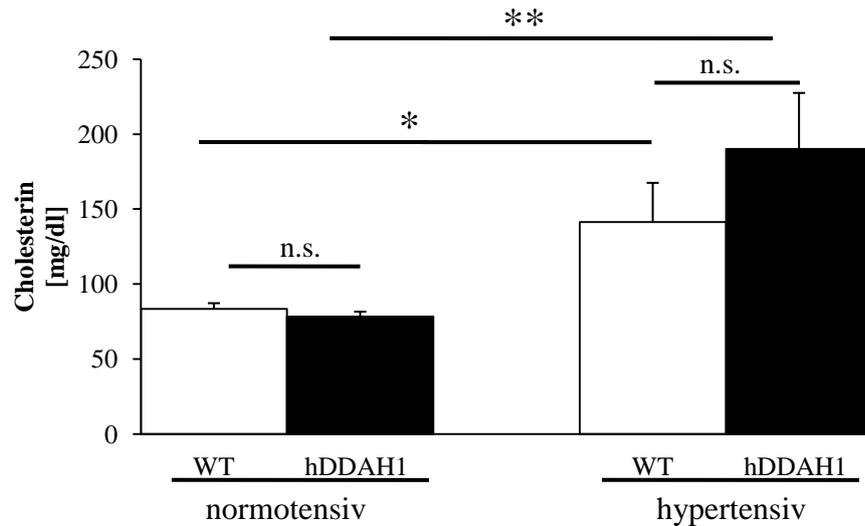


Abb.17: Cholesterinplasmakonzentrationen in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei $N = 8-11$ Versuchstieren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

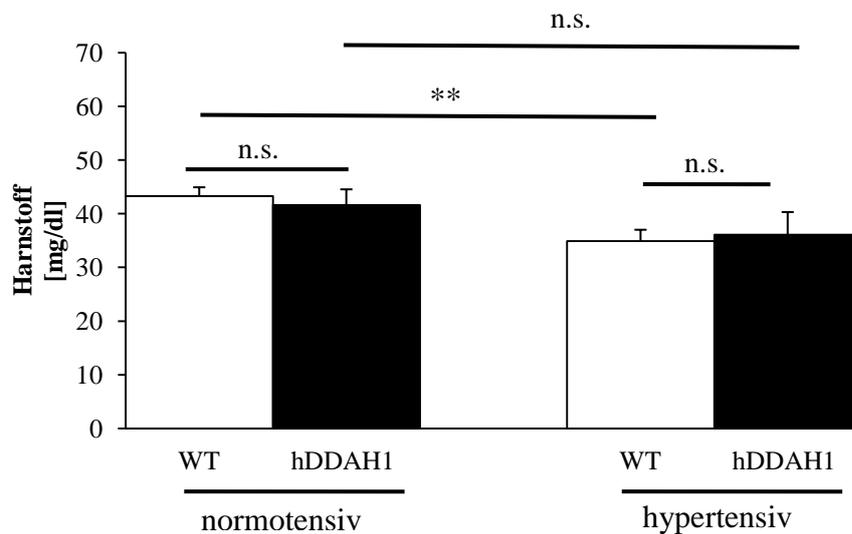


Abb. 18: Harnstoffplasmakonzentrationen in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei $N = 8-11$ Versuchstieren (** $p < 0,01$).

3.3.1.2 Relative Expression proinflammatorischer Marker

Ein arterieller Hypertonus führt in der Niere zu einer vermehrten Expression proinflammatorischer Proteine, wie dem MCP-1 und dem VCAM-1.

MCP-1

Das MCP-1 rekrutiert als Chemokin mononukleäre Zellen, wie Monozyten und Makrophagen.

Tab.5: Relative Expression von MCP-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Primer	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
MCP-1	<i>normotensiv</i>	WT	1,1	0,3	10
		hDDAH1	1,3	0,2	9
	<i>hypertensiv</i>	WT	5,1	0,8	10
		hDDAH1	1,9	0,6	9

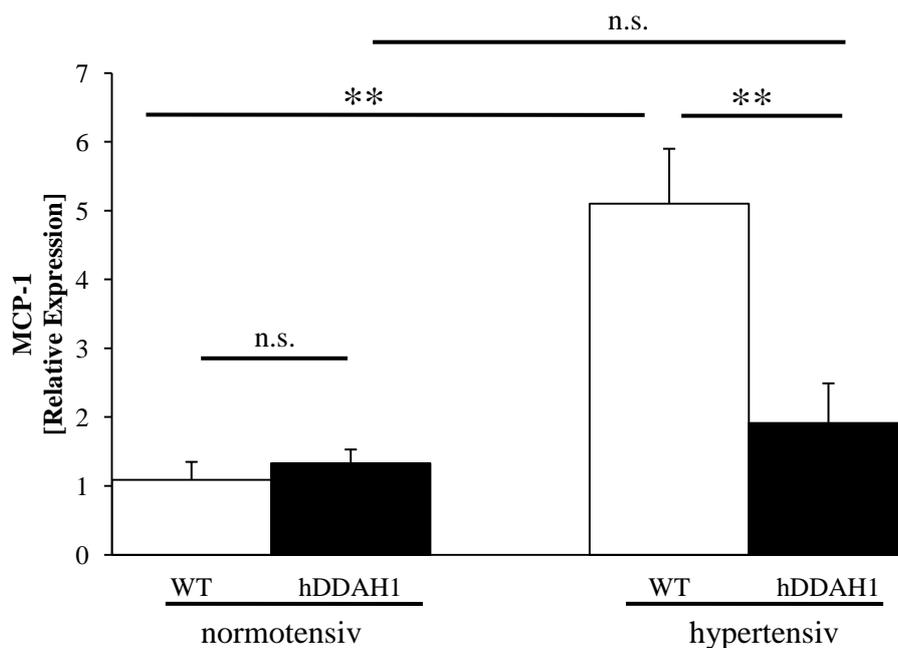


Abb.19: Relative Expression von MCP-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 9-10 Versuchstieren (**p < 0,01).

Es konnte in der Gruppe der hypertensiven WT-Mäuse ein signifikanter Anstieg der Expression von MCP-1 im Vergleich zu ihrer normotensiven Kontrollgruppe

nachgewiesen werden (WT normotensiv $1,1 \pm 0,3$ vs. WT hypertensiv $5,1 \pm 0,8$; $p < 0,01$). Bei den hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäusen fand sich hingegen nur eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der MCP-1-Expression im Vergleich zu den normotensiven hDDAH1-transgenen Kontrollmäusen (hDDAH1 normotensiv $1,3 \pm 0,2$ vs. hDDAH1 hypertensiv $1,9 \pm 0,6$; $p = \text{n.s.}$). Zwischen den hypertensiven Mäusen zeigte sich eine signifikant geringere Expression von MCP-1 in den hDDAH1-transgenen Mäusen (WT hypertensiv $5,1 \pm 0,8$ vs. hDDAH1 hypertensiv $1,9 \pm 0,6$).

VCAM-1:

VCAM-1 ist ein Protein, das die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel unterstützt.

Tab. 6: Relative Expression von VCAM-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Primer	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
VCAM-1	<i>normotensiv</i>	WT	0,9	0,1	7
		hDDAH1	0,8	0,2	7
	<i>hypertensiv</i>	WT	3,7	0,7	7
		hDDAH1	1,3	0,5	6

Die VCAM-1-Expression in den hypertensiven WT-Mäusen war im Vergleich zu den normotensiven WT-Mäusen signifikant erhöht ($p < 0,01$). Bei den hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäusen blieb der Expressionsanstieg gegenüber ihrer normotensiven Kontrollgruppe aus ($p = \text{n.s.}$) und zeigte sich dagegen signifikant verringert zu dem hypertensiven WT-Kollektiv ($p < 0,05$).

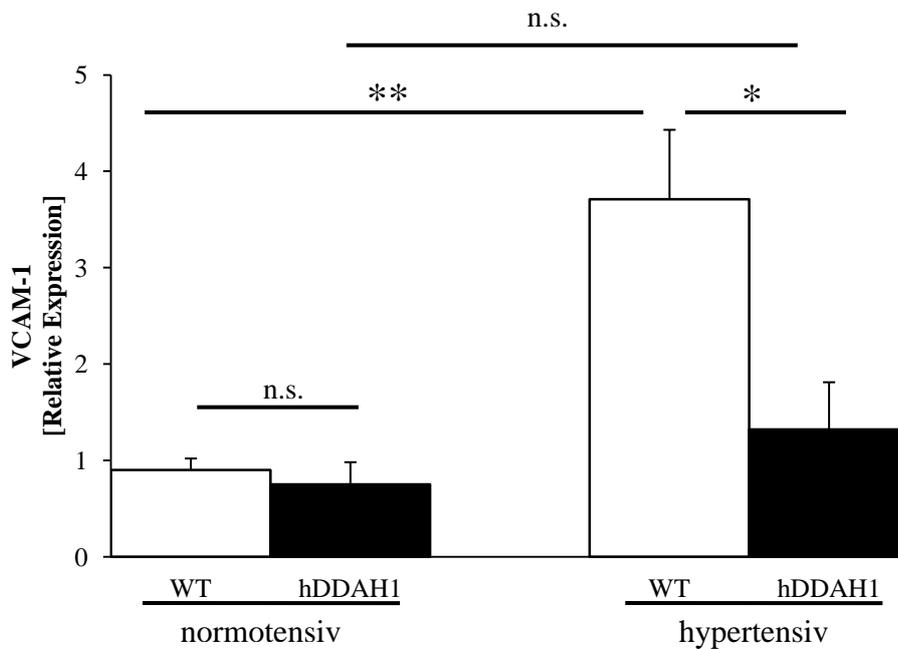


Abb.20: Relative Expression von VCAM-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 6-7 Versuchstieren (*p < 0,05; **p < 0,01).

3.3.1.3 Relative Expression fibrotischer Marker

PAI-1

PAI-1 ist ein prokoagulatorisches Protein, das die Degradation extrazellulärer Matrix verlangsamt und dadurch als fibrotischer Marker fungiert.

Tab. 7: Relative Expression von PAI-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Primer	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
PAI-1	<i>normotensiv</i>	WT	1,1	0,2	11
		hDDAH1	1,6	0,3	9
	<i>hypertensiv</i>	WT	6,2	1,5	10
		hDDAH1	2,1	0,6	7

In der hypertensiven WT-Gruppe kam es mit einer relativen Expression von $6,2 \pm 1,5$ zu einer signifikanten Steigerung der PAI-1-Expression im Vergleich zu den normotensiven WT-Mäuse ($1,1 \pm 0,2$; $p < 0,01$). Dagegen war der Anstieg der PAI-1-Expression in der hypertensiven hDDAH1-transgenen Mausgruppe deutlich abgeschwächt und nicht signifikant im Vergleich zur normotensiven hDDAH1-

transgenen Kontrollgruppe ($2,1 \pm 0,6$ vs. $1,6 \pm 0,3$; $p = \text{n.s.}$). Innerhalb der beiden hypertensiven Mausgruppen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der relativen Expression von PAI-1. Hier war in der Gruppe der hypertensiven WT-Mäuse eine signifikant stärkere Expression von PAI-1 im Vergleich zu den hDDAH1-transgenen Mäusen messbar ($6,2 \pm 1,5$ vs. $2,1 \pm 0,6$; $p < 0,05$).

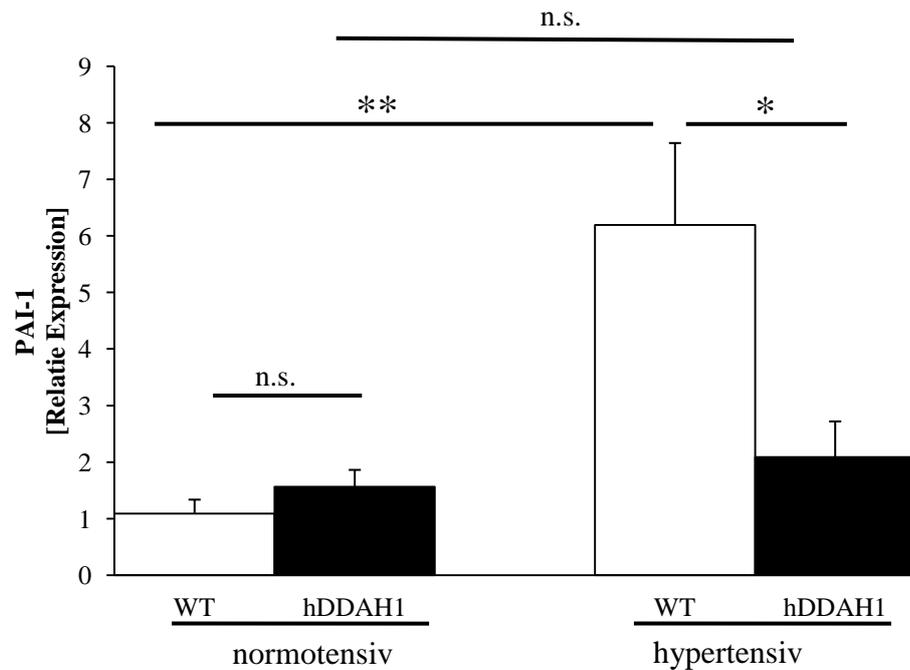


Abb. 21: Relative Expression von PAI-1 im Nierengewebe in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei $N = 7-11$ Versuchstieren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Kollagen I:

Die relative Expression von Kollagen I gibt einen direkten Hinweis auf fibrotische Umbauprozesse in der Niere.

Tab.8: Relative Expression von Kollagen I im Nierengewebe in den Mausgruppen.

Primer	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
Kollagen I	<i>normotensiv</i>	WT	1,1	0,2	10
		hDDAH1	0,6	0,2	8
	<i>hypertensiv</i>	WT	2,9	0,7	9
		hDDAH1	4,0	1,2	9

Bezüglich der relativen Expression von Kollagen I im renalen Gewebe zeigte sich für beide hypertensive Mauspopulationen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den normotensiven Referenzpopulationen (WT normotensiv $1,1 \pm 0,2$ vs. WT hypertensiv $2,9 \pm 0,7$; hDDAH1 normotensiv $0,6 \pm 0,2$ vs. hDDAH1 hypertensiv $4,0 \pm 1,2$; $p < 0,05$).

Keine statistisch signifikanten Unterschiede waren dagegen zwischen normotensiven WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen ($1,1 \pm 0,2$ vs. $0,6 \pm 0,2$; $p = \text{n.s.}$) sowie zwischen den hypertensiven WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen ($2,9 \pm 0,7$ vs. $4,0 \pm 1,2$; $p = \text{n.s.}$) messbar.

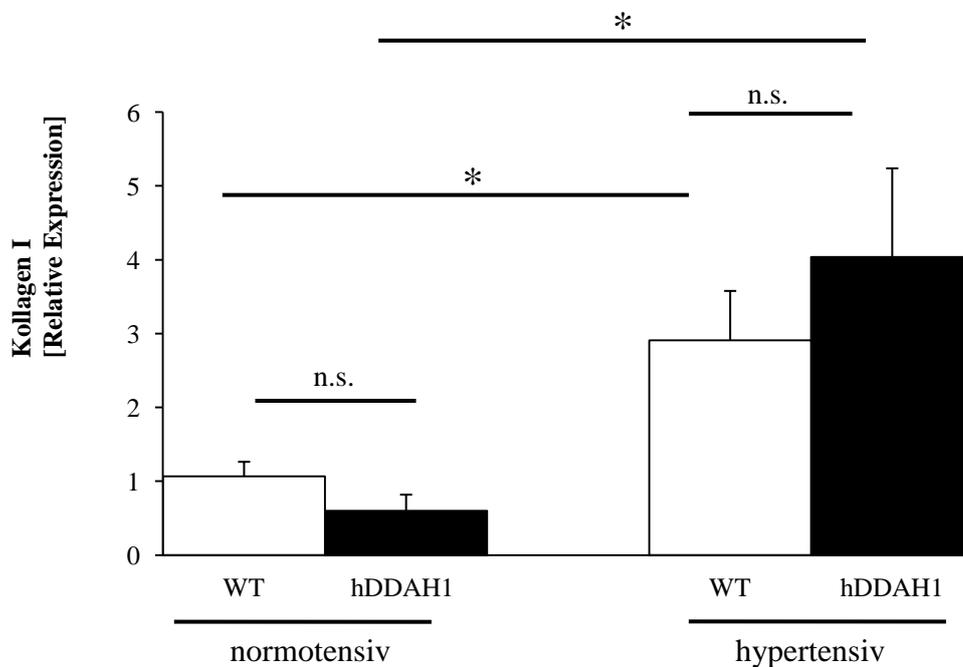


Abb.22: Relative Expression von Kollagen I im Nierengewebe in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei $N = 8-10$ Versuchstieren (* $p < 0,05$).

3.3.1.4 Histopathologische Darstellung des renalen Gewebes

Ein wichtiges histopathologisches Korrelat der hypertensiven Nephropathie ist die Ausbildung einer Glomerulosklerose. Mittels eines Scores von 0-3 wurde eine semiquantitative Auswertung zur Beurteilung des renalen Schadens vorgenommen.

Tab. 9: Glomerulosklerose-Score in den Mausgruppen.

Score	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
Glomerulosklerose	<i>normotensiv</i>	WT	0,2	0,1	12
		hDDAH1	0,1	0,1	10
	<i>hypertensiv</i>	WT	0,7	0,2	11
		hDDAH1	0,4	0,2	9

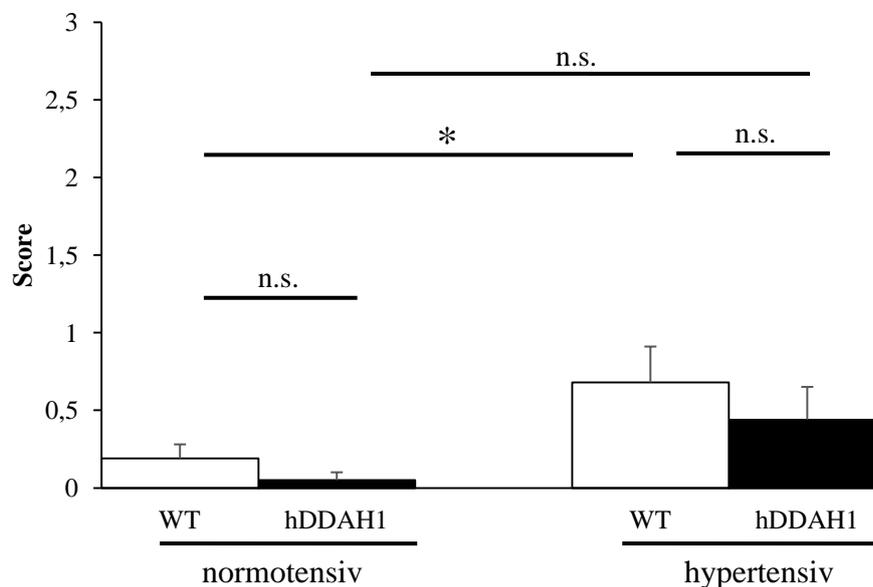


Abb.23: Glomerulosklerose-Score in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 9-12 Versuchstieren (* $p < 0,05$).

In den hypertensiven Mausgruppen fand man ein gehäuftes Vorkommen von sklerotisch veränderten Glomeruli. Dabei zeigte sich, dass die histopathologischen Veränderungen in den hypertensiven WT-Mäusen signifikant ausgeprägter waren im Vergleich zu den normotensiven Kontrolltieren (WT normotensiv $0,2 \pm 0,1$ vs. WT hypertensiv $0,7 \pm 0,2$; $p < 0,05$). Die histopathologische Auswertung der Nieren der hDDAH1-transgenen Mäusen konnte dagegen keine signifikanten Unterschiede

zwischen den beiden Gruppen zeigen (hDDAH1 normotensiv $0,1 \pm 0,1$ vs. hDDAH1 hypertensiv $0,4 \pm 0,2$; $p = \text{n.s.}$). Die hDDAH1-transgenen Tiere zeigten sowohl unter normotensiven als auch unter hypertensiven Bedingungen einen Trend zu einer weniger stark ausgeprägten Glomerulosklerose, der jedoch jeweils keine statistische Signifikanz erreichte. In der feingeweblichen Aufbereitung des Nierenparenchyms fand sich darüber hinaus eine deutliche Erweiterung des Tubulussystems sowie ein gehäuftes Vorkommen von Eiweißzylindern als entsprechendes histopathologisches Korrelat der Albuminurie in beiden hypertensiven Mausgruppen.

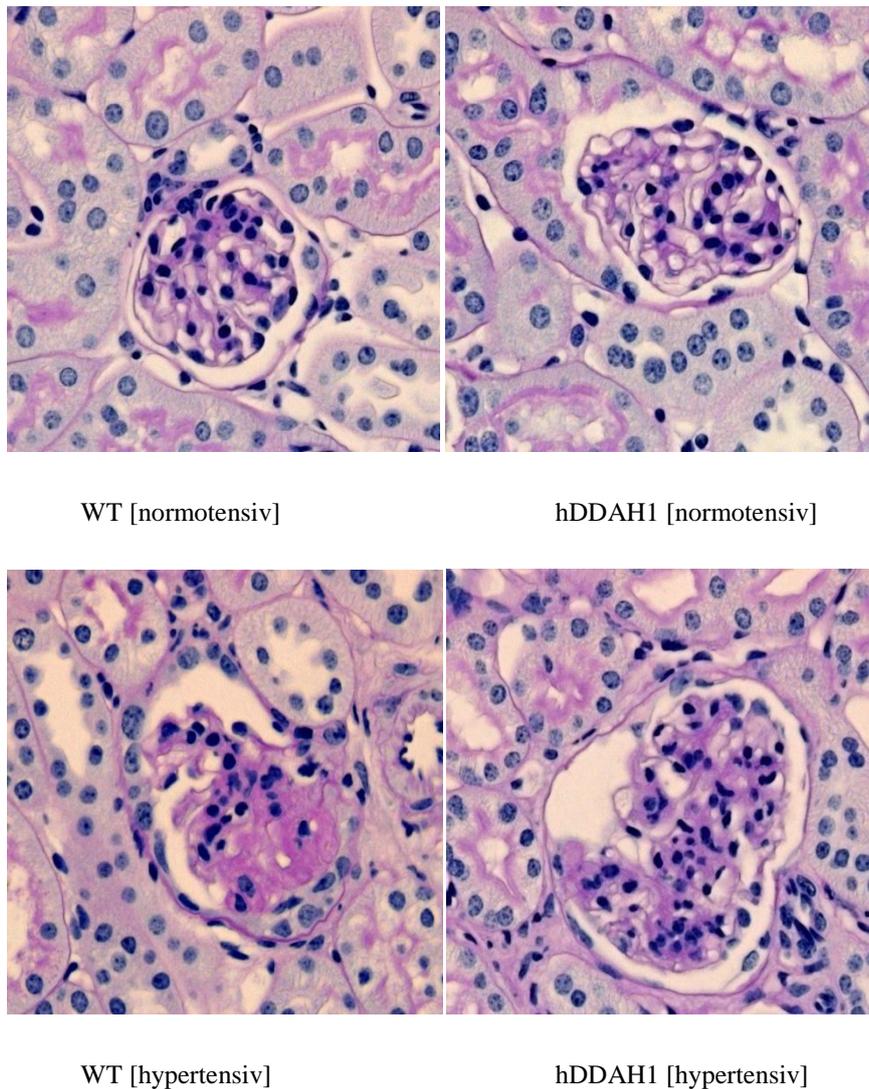


Abb. 24: Histopathologische Darstellung des renalen Schadens an den Glomeruli in den Mausgruppen. Man erkennt eine deutliche Sklerosierung der Glomerula in den hypertensiven Mausgruppen.

3.3.2 Entwicklung hypertonusassoziierter Schäden am Herzen

3.3.2.1 Postmortales relatives Herzgewicht

Hochdruckassoziierte Schäden am Herzen können auf unterschiedlichen Ebenen erfasst werden. So ist es möglich, über das relative Herzgewicht eine Aussage über eine druckbedingte myokardiale Hypertrophie zu treffen.

Tab.10: Postmortales relatives Herzgewicht in den Mausgruppen.

mg/g KG	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
Relatives Herzgewicht	<i>normotensiv</i>	WT	5,6	0,2	12
		hDDAH1	5,6	0,1	10
	<i>hypertensiv</i>	WT	8,4	0,5	11
		hDDAH1	8,9	0,5	9

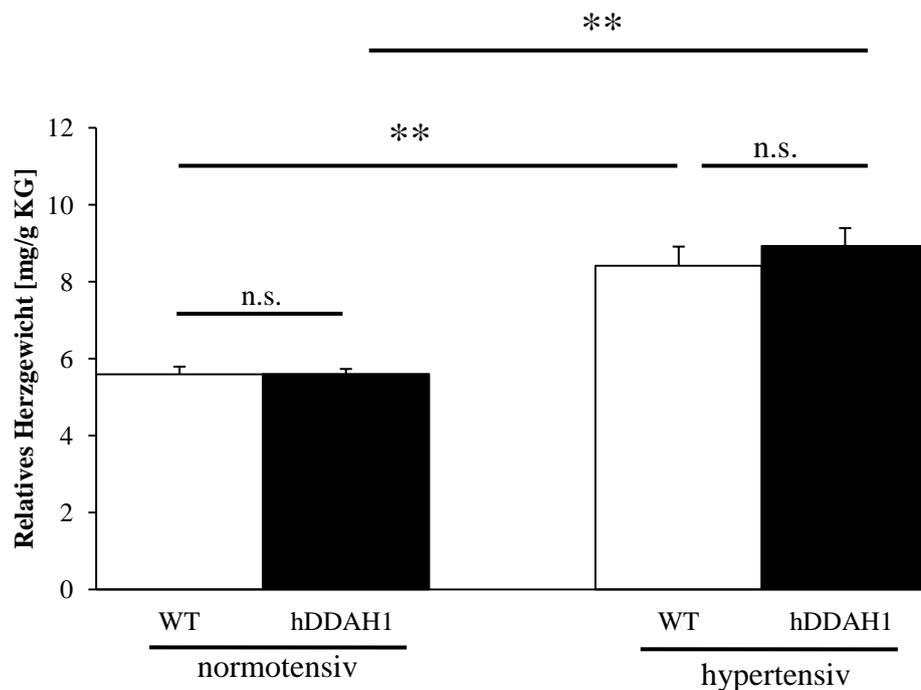


Abb.25: Postmortales relatives Herzgewicht in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 9-12 Versuchstieren (**p < 0,01).

Durch eine chronische arterielle Hypertension kam es in beiden Mauspopulationen zu einer signifikanten Erhöhung des relativen Herzgewichtes (WT normotensiv $5,6 \pm 0,2$ mg/g KG vs. WT hypertensiv $8,4 \pm 0,5$ mg/g KG; hDDAH1 normotensiv $5,6 \pm$

0,1mg/g KG vs. hDDAH1 hypertensiv $8,9 \pm 0,5$ mg/g KG; jeweils $p < 0,01$). Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der beiden hypertensiven bzw. der normotensiven Gruppen.

3.3.2.2 Relative Expression profibrotischer und fibrotischer Marker

Für eine genauere Untersuchung der myokardialen Fibrosierung erfolgte die Ermittlung des Expressionsverhaltens für Gene, deren Genprodukte mit verstärkter Kollagen- und Matrixsynthese assoziiert sind.

PAI-1

PAI-1 ist ein wichtiger Bestandteil der Fibrinolyse und des fibrotischen Umbaus der extrazellulären Matrix.

Tab. 11: Relative Expression von PAI-1 im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Primer	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
PAI-1	<i>normotensiv</i>	WT	1,0	0,1	11
		hDDAH1	1,7	0,3	9
	<i>hypertensiv</i>	WT	12,5	2,9	9
		hDDAH1	8,5	1,2	7

Die Expression von PAI-1 war sowohl in den hypertensiven WT-Mäusen (WT normotensiv $1,0 \pm 0,1$ vs. WT hypertensiv $12,5 \pm 2,9$) als auch in den hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäusen (hDDAH1 normotensiv $1,7 \pm 0,3$ vs. hDDAH1 hypertensiv $8,5 \pm 1,2$) im Vergleich zu den jeweiligen normotensiven Mausgruppen signifikant erhöht ($p < 0,01$). Innerhalb der jeweiligen normo- bzw. hypertensiven Gruppen zeigte sich eine Tendenz zu geringer ausgeprägter PAI-1-Expression in hDDAH1-transgenen Mäusen, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

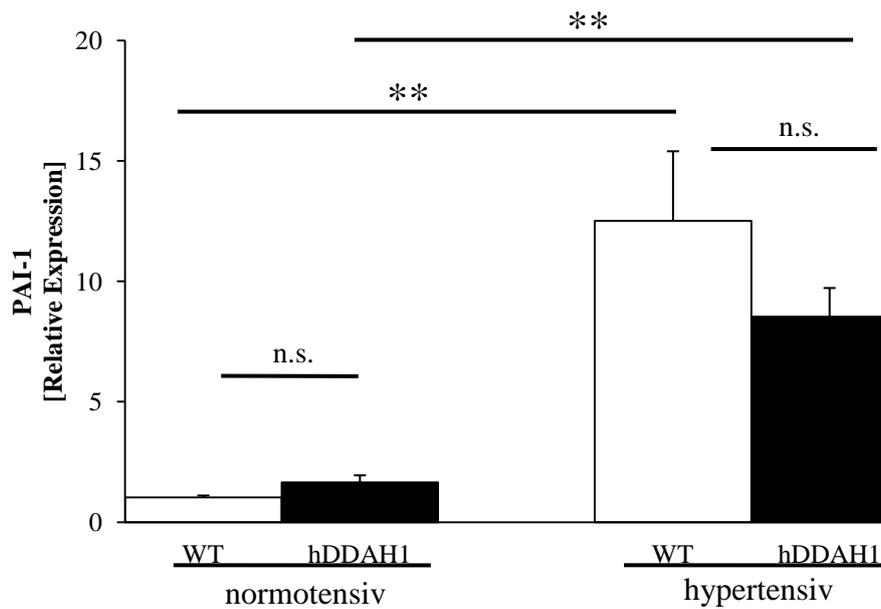


Abb.26: Relative Expression von PAI-1 im Herzgewebe in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 7-11 Versuchstieren (**p < 0,01).

Fibronektin:

Fibronektin entsteht bei fibrotischen Umbauprozesse im Gewebe.

Tab. 12: Relative Expression von Fibronektin im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Primer	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
Fibronektin	<i>normotensiv</i>	WT	1,1	0,2	12
		hDDAH1	1,0	0,2	9
	<i>hypertensiv</i>	WT	8,5	1,5	10
		hDDAH1	14,9	6,2	9

Es zeigte sich sowohl bei den hypertensiven WT-Mäusen als auch in den hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäusen eine vermehrte Fibronektinexpression im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen, ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Gruppen.

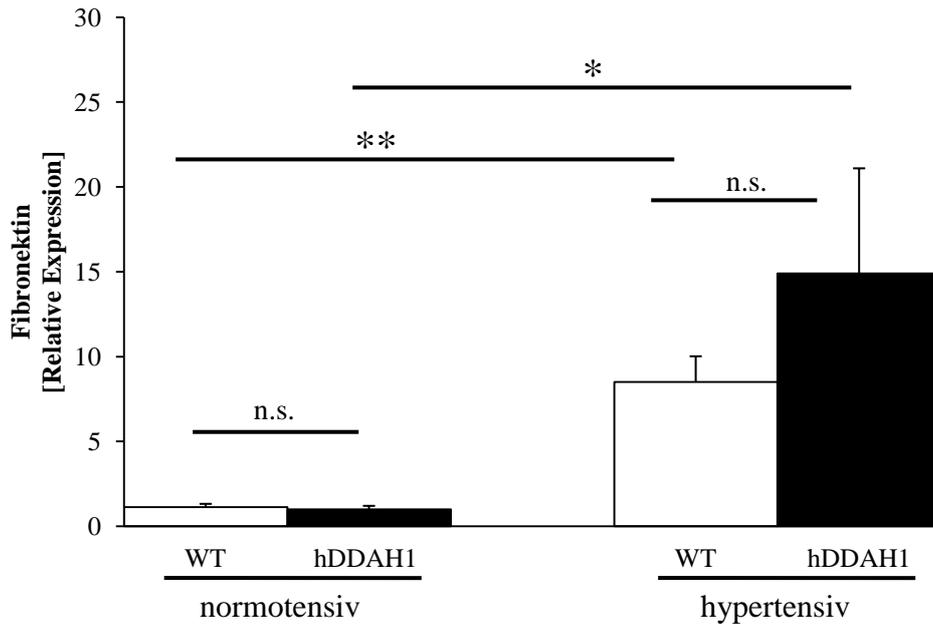


Abb.27: Relative Expression von Fibronectin im Herzgewebe in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 9-12 Versuchstieren (*p < 0,05; **p < 0,01).

Kollagen III:

Kollagen III ist ein Protein, dessen Synthese im Rahmen von fibrotischen Umbauprozessen gesteigert ist.

Tab. 13: Relative Expression von Kollagen III im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Primer	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
Kollagen III	<i>normotensiv</i>	WT	1,1	0,1	12
		hDDAH1	1,8	0,4	10
	<i>hypertensiv</i>	WT	4,1	1,0	6
		hDDAH1	5,7	1,4	7

Es zeigte sich eine signifikant gesteigerte Expression von Kollagen III in den hypertensiven WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Gruppen.

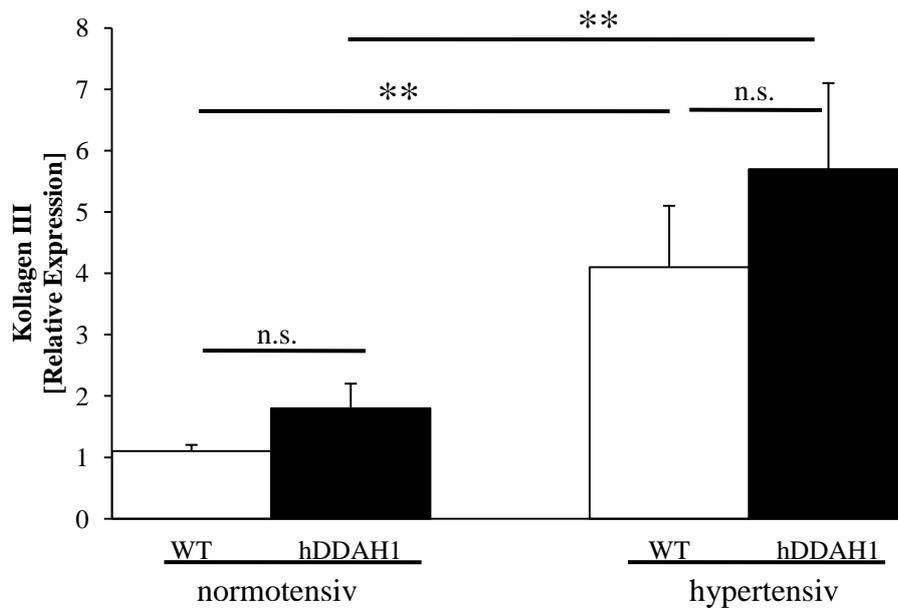


Abb.28: Relative Expression von Kollagen III im Herzgewebe in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 6-12 Versuchstieren (**p < 0,01).

3.3.2.3 Relative Expression natriuretischer Peptide

Auf eine myokardiale Hypertrophie reagiert das Herz mit einer Erhöhung der Genexpression von BNP und ANP.

Tab.14: Relative Expression von BNP und ANP im Herzgewebe in den Mausgruppen.

Primer	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
BNP	<i>normotensiv</i>	WT	1,2	0,2	11
		hDDAH1	1,4	0,6	8
	<i>hypertensiv</i>	WT	3,4	0,7	11
		hDDAH1	3,3	0,9	8
ANP	<i>normotensiv</i>	WT	1,0	0,2	11
		hDDAH1	1,8	1,1	9
	<i>hypertensiv</i>	WT	11,2	3,5	10
		hDDAH1	20,0	7,4	9

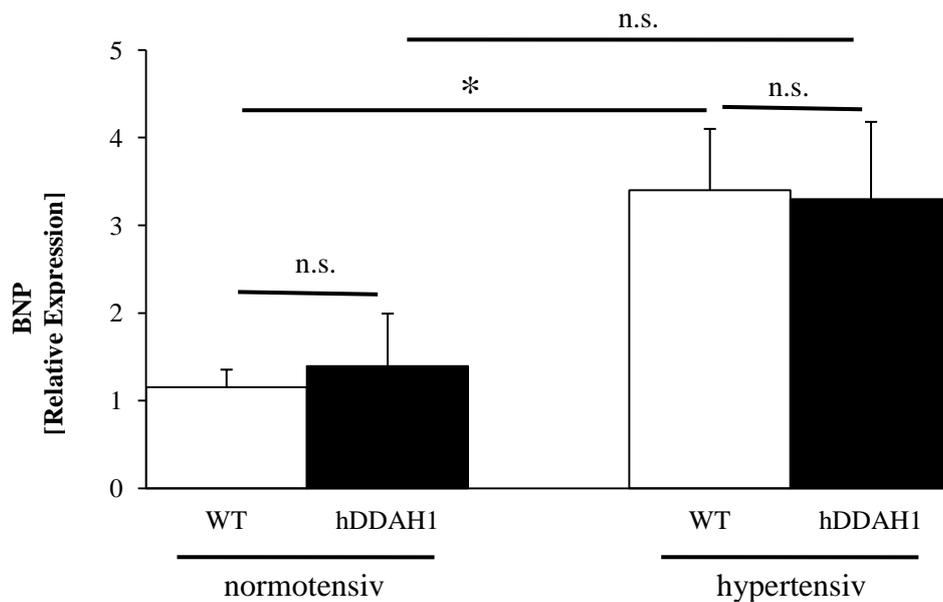


Abb. 29: Relative Expression von BNP im Herzgewebe in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 8-11 Versuchstieren (*p < 0,05).

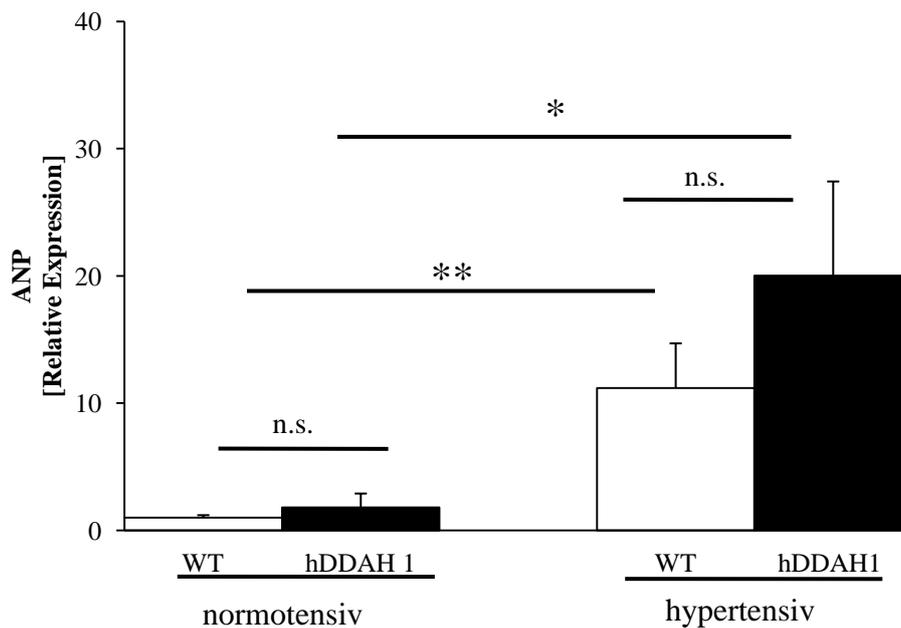


Abb. 30: Relative Expression von ANP im Herzgewebe in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 9-11 Versuchstieren (*p < 0,05, **p < 0,01).

Die relative Expression der natriuretischen Peptide ANP und BNP stieg in beiden Mausgruppen unter arterieller Hypertonie deutlich an. Während bei den normotensiven WT-Mäusen nur eine geringe Expression von BNP messbar war, so fand sich bei den hypertensiven WT-Mäusen eine signifikant gesteigerte BNP-Expression (WT normotensiv $1,2 \pm 0,2$ vs. WT hypertensiv $3,4 \pm 0,7$). Bei den hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäusen ließ sich ebenfalls eine erhöhte Expression von BNP im Vergleich zu den normotensiven hDDAH1-transgenen Mäusen messen, dies war jedoch ohne Signifikanz. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich nach Messung der relativen Expression von ANP. Hier stieg die relative Expression bei den WT-Mäusen von $1,0 \pm 0,2$ unter Normotension auf $11,2 \pm 3,5$ unter arterieller Hypertension. Bei den hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäusen zeigte sich mit einer relativen Expression von $20,0 \pm 7,4$ eine deutlich gesteigerte Genexpression gegenüber den normotensiven hDDAH1-transgenen Mäuse ($1,8 \pm 1,1$). Keine signifikanten Unterschiede bezüglich der relativen Genexpression von ANP und BNP zeigten sich zwischen den beiden Gruppen unter normo- bzw. hypertensiven Blutdrücken.

3.3.2.4 Histopathologische Darstellung des kardialen Gewebes

Mittels eines Herzfibrose-Scores von 0-3 fand eine semiquantitative Auswertung der Histologien statt.

Tab. 15: Herzfibrose-Score in den Mausgruppen.

Herzfibrose	Mausgruppe		Mittelwert	SEM	Anzahl
Score	<i>normotensiv</i>	WT	0,1	0,1	11
		hDDAH1	0,1	0,1	10
	<i>hypertensiv</i>	WT	1,6	0,1	10
		hDDAH1	1,4	0,2	8

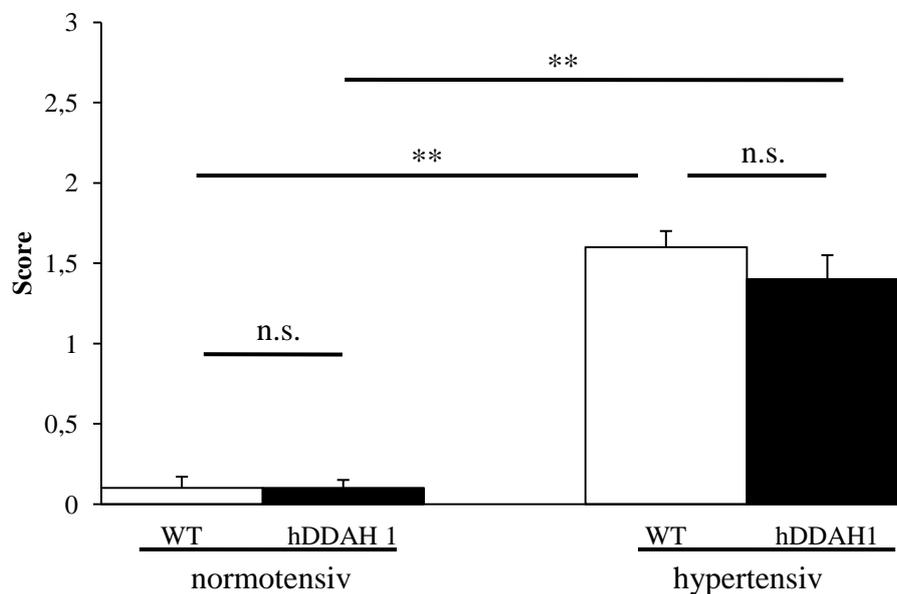
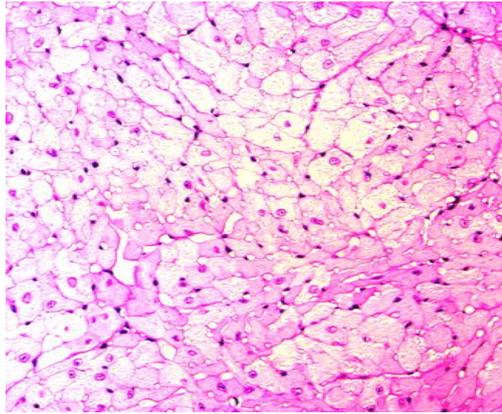
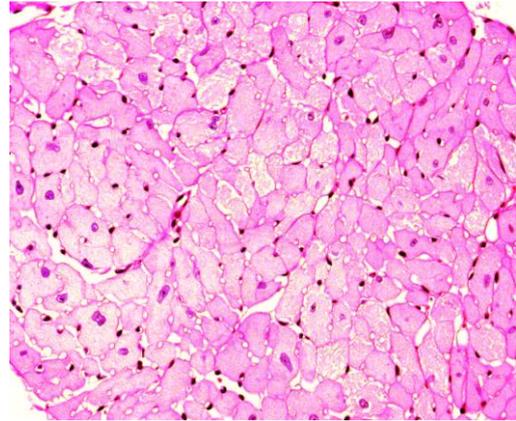


Abb. 31: Herzfibrose-Score in den Mausgruppen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei N = 8-11 Versuchstieren (**p < 0,01).

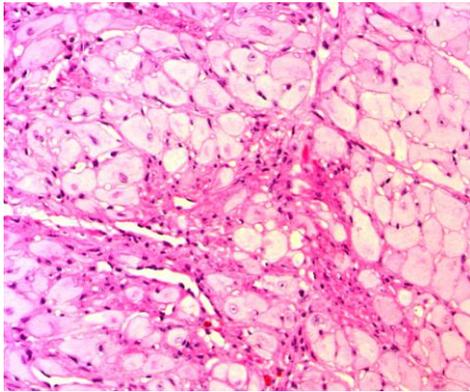
Hier zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme der Fibrose in beiden hypertensiven Gruppen ($p < 0,01$). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen unter normotensiven bzw. hypertensiven Bedingungen.



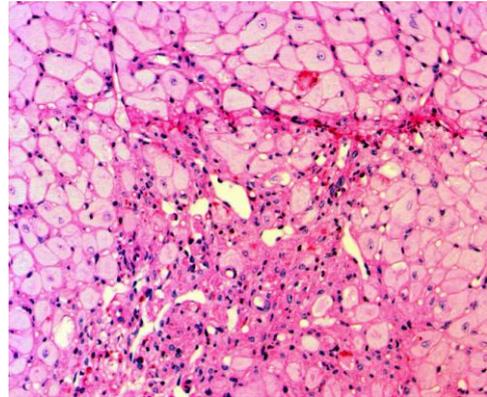
WT [normotensiv]



hDDAH1 [normotensiv]



WT [hypertensiv]



hDDAH1 [hypertensiv]

Abb.32: Histopathologische Darstellung des kardialen Gewebes in den Mausgruppen. Man erkennt eine deutliche Fibrosierung des kardialen Gewebes unter hypertensiven Blutdruckwerten. Es liessen sich dabei jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den hypertensiven hDDAH1-transgenen und WT-Mäusen feststellen.

3.3.3 Entwicklung hypertonusassoziierter Schäden am Gefäßsystem

Es wurden Aorten jeder Gruppe präpariert und auf ihre Relaxationsfähigkeit geprüft.

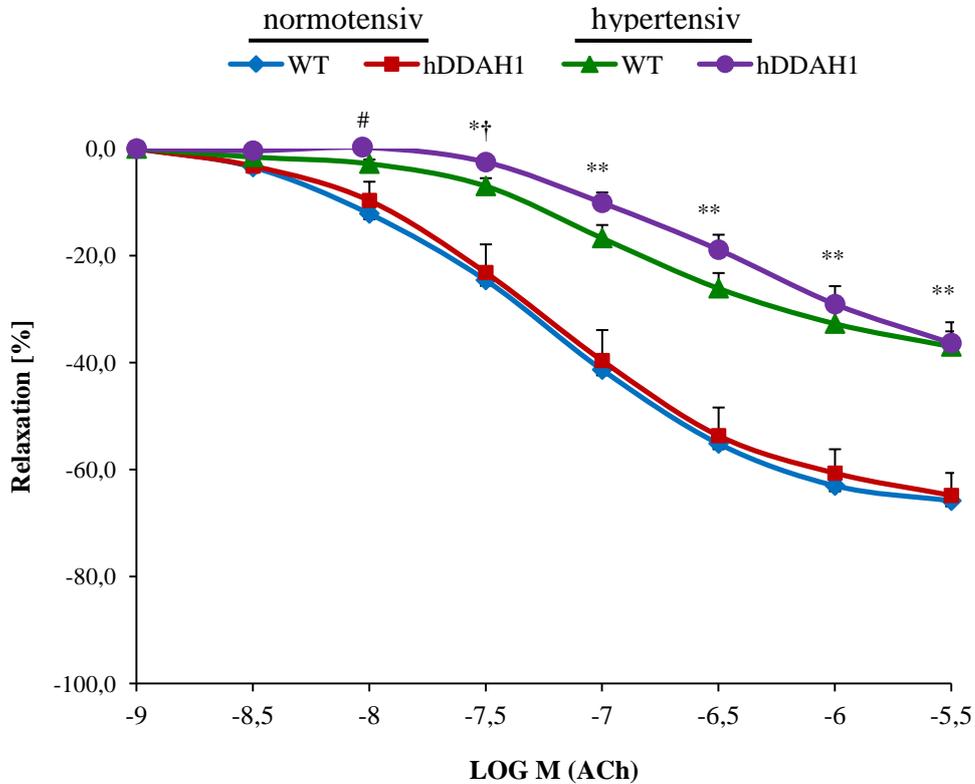


Abb.33: Endothelabhängige, Acetylcholin-induzierte Vasodilatation. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei $N = 5-11$ Aortae (* $p < 0,01$ hypertensive hDDAH1-transgene Gruppe vs. hDDAH1-transgene Kontrollgruppe und/oder hypertensive WT-Gruppe vs. WT-Kontrollgruppe; # $p < 0,05$ hypertensive hDDAH1-transgene Gruppe vs. hDDAH1-transgene Kontrollgruppe; † $p < 0,05$ hypertensive WT-Gruppe vs. WT-Kontrollgruppe).

Während sich die Aorten der normotensiven und der hypertensiven Mäuse beider Gruppen hinsichtlich ihres Relaxationsverhaltens nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden ($p = \text{n.s.}$) und in Normotension eine maximale Relaxationsfähigkeit von $65,8 \pm 3,6\%$ bei den WT-Mäusen bzw. $64,8 \pm 4,2\%$ bei den hDDAH1-transgenen Mäusen erreichten, zeigte sich bei den hypertensiven Tieren eine deutliche Einschränkung der Vasodilatation. Hier lag die maximal erreichte Gefäßrelaxation in der WT-Gruppe bei $37,0 \pm 2,8\%$ und in der hDDAH1-transgenen

Mausgruppe bei $36,4 \pm 3,9\%$. Diese Einschränkung war verglichen zu den jeweiligen Kontrolltieren bereits ab $-8,0 \log M$ (ACh) statistisch signifikant.

Hinsichtlich der endothelunabhängigen Messung der Gefäßrelaxation mittels NTG als Stimulus ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den hyper- und normotensiven hDDAH1-transgenen Mausgruppen sowie zwischen den hDDAH1- und WT-Gruppen unter basalen bzw. hypertensiven Bedingungen.

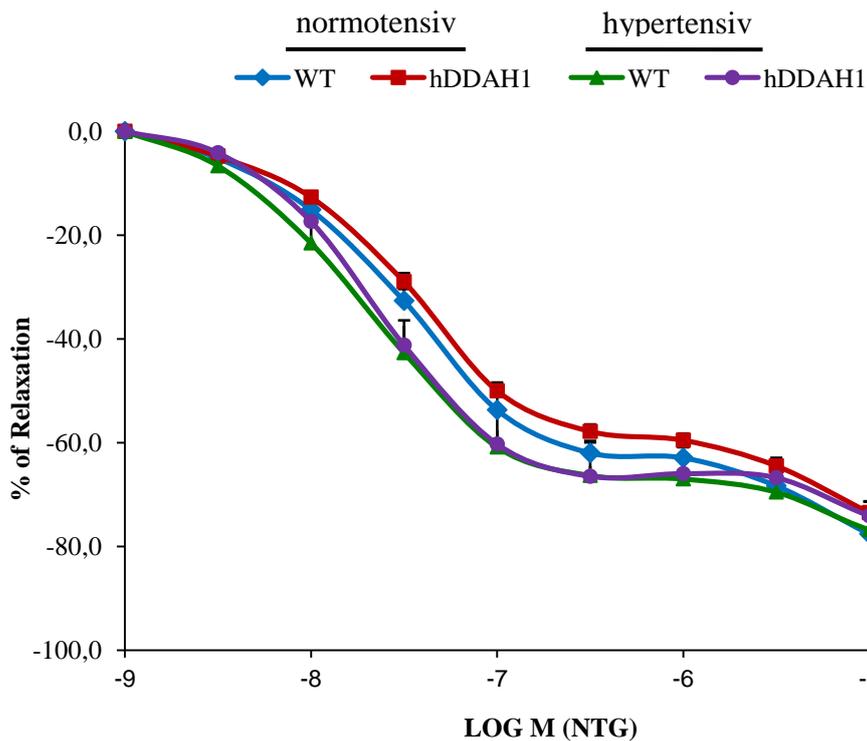


Abb. 294: Endothelunabhängige, Nitroglycerin-induzierte Vasodilatation. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM bei $N = 5-11$ Aortae.

4 DISKUSSION

Erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen gelten als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse und Mortalität (Böger et al., 2009). Für viele Erkrankungen, darunter auch die koronare Herzkrankheit, die Herzinsuffizienz sowie die terminale Nierensuffizienz hat man zeigen können, dass sie mit einem Anstieg der ADMA-Konzentrationen verbunden sind (Sydow und Münzel, 2003). In diesem Zusammenhang wurde auch die Beziehung zwischen ADMA und dem arteriellen Hypertonus untersucht. Hier fanden sich zahlreiche klinische Studien, in denen die arterielle Hypertonie mit erhöhten ADMA-Konzentrationen assoziiert war (Perticone et al., 2005; Curgunlu et al., 2005). Andere Studien hingegen konnten diesen Zusammenhang nicht sicher belegen (Schnabel et al., 2005; Schulze et al., 2005). Ähnlich kontrovers ist die Datenlage von Studien, in denen der Zusammenhang zwischen dem RAAS und ADMA untersucht wurde. Während es Arbeiten mit kleinen Fallzahlen gibt, in denen gezeigt wurde, dass eine antihypertensive Therapie, die auf eine Interaktion mit dem RAAS zielt, die ADMA-Konzentrationen senken konnte (Delles et al., 2002), konnten andere Arbeitsgruppen diesen Effekt nicht nachweisen (Warnholtz et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Rolle von ADMA in der Pathogenese des arteriellen Hypertonus anhand der hDDAH1-transgenen Maus untersucht. Die Arbeit diente der Feststellung, ob Mäuse, die eine Überexpression an hDDAH1 aufweisen, durch niedrigere ADMA-Plasmakonzentrationen einen protektiven Mechanismus in der Entstehung hypertensiver Endorganschäden an Niere, Herz und Aorta zeigen.

4.1 VERLAUF DES BLUTDRUCKES WÄHREND DES VERSUCHSANSATZES

In dem hier untersuchten Mausmodell führte eine kontinuierliche subkutane Infusion von Angiotensin II in Kombination mit einer DOCA-Salzbehandlung zu einem signifikanten Anstieg des systolischen Blutdruckes in den WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen. Dabei konnten sowohl unter basalen als auch unter hypertensiven Bedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gemessen werden. Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Kontrast zu den Daten von Dayoub et al., die unter basalen Bedingungen einen signifikant niedrigeren Blutdruck in hDDAH1-transgenen Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen zeigten (Dayoub et al., 2003). Dagegen konnten in einer Arbeit von Jacobi et al. in einem ähnlichen Maus-Hypertonus-Modell ebenfalls keine Unterschiede zwischen WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen bezogen auf den systolischen Blutdruck eruiert werden (Jacobi et al., 2008). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die Arbeitsgruppe von Hasegawa, die den Einfluss einer ADMA- bzw. Angiotensin II-Infusion auf hDDAH2-transgene Mäuse untersuchte (Hasegawa et al., 2007). Auch hier konnten unter basalen Bedingungen keine Unterschiede hinsichtlich des systolischen Blutdruckes zwischen hDDAH2-transgenen und WT-Mäusen gemessen werden.

Zur Erfassung der murinen Blutdruckwerte wurde in den Arbeiten von Jacobi und Hasegawa die *Tail-Cuff*-Plethysmographie als Methode der Blutdruckmessung eingesetzt. Auch in dieser Arbeit wurde dieses Verfahren verwendet, um Veränderungen des systolischen Blutdruckes messen zu können. Die *Tail-Cuff*-Plethysmographie ist ein nicht invasives Verfahren zur Erfassung des systolischen Blutdruckes, dessen Genauigkeit auf 10-15mmHg limitiert ist (Kirchhoff et al., 2008). Zur Messung müssen die Mäuse aus ihrem gewohnten Umfeld genommen werden, was einer zusätzlichen Stressbelastung entspricht. Um diesen Messfehler so gering wie möglich zu halten, wurden die Tiere in der vorliegenden Arbeit vor jeder Versuchsreihe an das Verfahren gewöhnt. Es ist trotzdem nicht auszuschließen, dass Blutdruckunterschiede zwischen hDDAH1-transgenen und WT-Mäusen aus oben

aufgeführten Gründen maskiert wurden und mögliche protektive Effekte einer hDDAH1-Überexpression im Rahmen einer arteriellen Hypertonie dadurch nicht quantifiziert werden konnten. Um noch exaktere Aussagen hinsichtlich des Blutdruckverhaltens treffen zu können, wird daher oft die Möglichkeit einer direkten Blutdruckmessung gefordert. Auch Dayoub et al. konnten einen niedrigeren Blutdruck der hDDAH1-transgenen Maus am deutlichsten durch eine direkte Blutdruckmessung mittels Katheterisierung an der narkotisierten Maus nachweisen (Dayoub et al., 2003). Der Vorteil einer direkten Blutdruckmessung liegt darin, dass die Blutdrücke exakter gemessen werden können. Mit der Telemetrie steht darüber hinaus eine Messmethode zur Verfügung, mit der neben einer exakteren auch eine engmaschigere Blutdruckmessung erfolgen kann und die Mäuse dabei in ihrer physiologischen Umgebung verbleiben. In einem Rattenmodell wurde drei Tage nach intravenöser Gabe von *silencing* RNA, die auf DDAH1 oder -2 gerichtet war, eine solche telemetrische Messung des Blutdruckes vorgenommen. Mit Reduktion der DDAH1-Proteinkonzentration kam es zu einem Anstieg der ADMA-Plasmakonzentrationen um 30%, ein *Silencing* von DDAH2 führte zu einer nahezu vollständigen Aufhebung des NO-Signalweges in den untersuchten Mesenterialgefäßen. Dennoch ergaben sich auch hieraus keine Veränderungen hinsichtlich des Blutdruckverhaltens (Wang et al., 2007).

Insgesamt fügen sich die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse der Blutdruckexperimente somit gut in den derzeitigen Stand der Literatur ein.

4.2 HYPERTONUSASSOZIIERTE SCHÄDEN AN DER NIERE

Die hypertensive Nephropathie ist eine häufige Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz. Die genauen molekularbiologischen Mechanismen, die zur Ausprägung der hypertensiven Nephropathie führen, sind äußerst komplex und noch nicht vollständig verstanden (Liao et al., 2008). Bedingt durch einen arteriellen Hypertonus kommt es in der Niere zu proinflammatorischen sowie profibrotischen Reizen mit den Folgen einer tubulären Atrophie, einer Glomerulosklerose sowie

eines fibrotischen Umbaus des Niereninterstitiums. Ein wichtiger Marker für eine eingeschränkte Nierenfunktion ist dabei die Albuminurie.

Die entscheidenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

- Eine hypertonusinduzierte Einschränkung der Nierenfunktion im Sinne eines nephrotischen Syndroms in beiden Mausgruppen, ohne Signifikanz untereinander.
- Eine abgeschwächte inflammatorische Reaktion (VCAM-1, MCP-1, PAI-1) in der hypertensiven hDDAH1-transgenen Mausgruppe im Vergleich zu den hypertensiven WT-Mäusen.
- Ein signifikanter Anstieg der Genexpressionen von Kollagen I in beiden hypertensiven Mausgruppen, ohne Signifikanz untereinander.
- Eine messbare histopathologische Glomerulosklerose in beiden Mausgruppen mit Signifikanz in der Gruppe der hypertensiven WT-Mäuse, jedoch nicht in der Gruppe der hDDAH1-transgenen Mäuse.

In der Arbeit von Kirchhoff et al. kam es unter hypertensiven Bedingungen zu einer deutlichen Expressionssteigerung von PAI-1 und MCP-1 (Kirchhoff et al., 2008). Auch wir konnten zeigen, dass in hypertensiven WT-Mäusen ein deutlicher Anstieg von PAI-1 sowie VCAM-1 und MCP-1 zu verzeichnen war. Die Expressionssteigerung dieser proinflammatorischen Marker blieb hingegen in den hDDAH1-transgenen Mäusen aus. In einem Mausmodell zur renalen Fibrose und Inflammation wurde an Mäusen, deren MCP-1-Rezeptoren blockiert wurden, eine einseitige Ureterobstruktion vorgenommen (Kitagawa et al., 2004). Dabei kam es in der Folge zu einer verminderten Fibrose und Makrophageninfiltration. Liao et al. untersuchten daraufhin den Einfluss einer chronischen Angiotensin II-Infusion auf Organschäden an Herz und Niere (Liao et al., 2008). Während es keine Unterschiede in der Ausprägung der linksventrikulären Hypertrophie und des systolischen Blutdruckes gab, zeigten MCP-1-Rezeptor-defiziente Mäuse in der Niere eine geringere Makrophageninfiltration und Albuminurie sowie eine verminderte renale Schädigung gegenüber WT-Mäusen. Der renale Schaden entstand dabei

interessanterweise unabhängig von der Höhe des Blutdruckes (Liao et al., 2008). Unsere Arbeit zeigt, dass eine Überexpression von hDDAH1 zu einer abgeschwächten inflammatorischen Reaktion in der Niere führt. ADMA scheint somit bereits in physiologischen Konzentrationen an der Vermittlung proinflammatorischer und prokoagulatorischer Reize in der Niere beteiligt zu sein.

Um zu untersuchen, ob sich die abgeschwächte inflammatorische Reaktion, die wir in den hDDAH1-transgenen Mäusen messen konnten, protektiv auf die Schwere der Fibrose und Funktionseinschränkung auswirkt, wurde die Expression von Kollagen I in der Niere sowie die Albuminausscheidung in den hypertensiven Mäusen untersucht. Wir konnten dabei typische Merkmale einer eingeschränkten renalen Funktionsleistung messen, die sich auch mit den Beobachtungen von Kirchhoff et al. decken. Dort führte die arterielle Hypertension zu einer deutlichen Albuminurie in den hypertensiven Mäusen (Kirchhoff et al., 2008). Jacobi et al. konnten eine solche Albuminurie ebenfalls in den hypertensiven Mausgruppen durch Angiotensin II-Infusion provozieren (Jacobi et al., 2008). Dabei gab es keine Unterschiede zwischen den WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen hinsichtlich der Schwere der Albuminurie. Auch in dem hier vorliegenden Mausmodell kam es zu einer Albuminausscheidung in beiden hypertensiven Mausgruppen ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen. Eine Albuminurie bedeutet für den Organismus einen permanenten Eiweißverlust. Der Körper reagiert daraufhin mit einer Steigerung der Cholesterinsynthese. Auch wir konnten analog zu den Ergebnissen von Kirchhoff et al. erhöhte Cholesterinkonzentrationen im Plasma der hypertensiven Mausgruppen messen. Die Nierenfunktion zeigte somit bereits das Bild eines nephrotischen Syndroms als Zeichen für die Schwere der hypertensiven Organschädigung.

Typisches Zeichen für eine interstitielle Fibrose ist die Expressionssteigerung von Kollagen I in den Nieren. In der vorliegenden Arbeit konnte in beiden hypertensiven Mausgruppen eine deutliche Induktion der Genexpression dieses Kollagens nachgewiesen werden. Dabei stieg die Expression von Kollagen I in den hDDAH1-transgenen Mäusen im selben Maße an wie in den WT-Mäusen. In der Literatur wurde eine Reihe von Fibrosemodellen beschrieben, in denen hDDAH1-transgene

Mäuse eine geringere Fibrose im Vergleich zu Wildtypen entwickelten. So konnte die Gruppe um Jacobi et al. nach vierwöchiger Infusion von 1 µg Angiotensin II pro kg KG/min in den hDDAH1-transgenen Mäusen eine verminderte Synthese von Kollagen I in der Niere beobachten (Jacobi et al., 2008). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Beobachtungen, die Matsumoto et al. machen konnten. Nach 5/6 Nephrektomie in Ratten führte eine über Adenoviren vermittelte Überexpression von hDDAH1 zu einem Rückgang der interstitiellen Fibrose (Matsumoto et al., 2007). In einem ähnlichen Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass ADMA-Konzentrationen positiv mit der Schwere der glomerulären Sklerose korrelierten und zu einer Reduktion der glomerulären Kapillaren führten (Ueda et al., 2009). Mäuse, die transgen für die DDAH2 waren, zeigten unter hohen systolischen Blutdrücken eine geringere perivaskuläre Fibrose im Vergleich zu den WT-Mäusen (Hasegawa et al., 2007). Analog dazu konnten wir in der histopathologischen Auswertung nur in der Gruppe der hypertensiven WT-Mäuse eine signifikante Entwicklung der Glomerulosklerose nachweisen. Allerdings zeigte sich in den hDDAH1-transgenen Mäusen ebenfalls ein Trend zur Entwicklung glomerulosklerotischer Veränderungen unter arterieller Hypertension, der jedoch statistisch nicht signifikant war. In der Gesamtschau der erhobenen Ergebnisse zur renalen Schädigung unter arterieller Hypertension sind die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen als diskret zu werten.

Ein möglicher Grund, warum wir keine Unterschiede bezüglich der Ausprägung der renalen Fibrose zwischen WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen zeigen konnten, mag die Art des angewandten Hypertonus-Modells sein. Unser Mausmodell unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von dem Modell, das Jacobi et al. zur Hypertonus-Induktion wählten. Neben einer Angiotensin II-Infusion wurden die Mäuse zusätzlich mit dem Aldosteron-Analogen DOCA in Kombination mit 1% NaCl-haltigem Trinkwasser behandelt. Dass Aldosteron eine eigenständige und wichtige Rolle in der Entstehung eines renalen Schadens einnimmt, konnte in einer Vielzahl von Untersuchungen eindrucksvoll gezeigt werden (Struthers und MacDonald, 2004). In subtotal nephrektomierten Ratten kam es über eine adrenale Hypertrophie zu einem Anstieg der Aldosteronsynthese mit anschließender

Proteinurie und Glomerulosklerose, die durch Behandlung mit ACE-Hemmern blockiert werden konnte. Eine Aldosteron-Infusion konnte den protektiven Effekt der Medikation wieder aufheben (Greene et al., 1996). In einem Rattenmodell, in dem es unter Kombination von N^G -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME), Angiotensin II und 1% NaCl-haltigem Trinkwasser zur Ausbildung eines arteriellen Hypertonus kam, entwickelten sich typische Organschäden an der Niere, bestehend aus einer renalen Fibrose und Proteinurie sowie typischen hypertonusassoziierten kardialen Veränderungen, wie die Zunahme des relativen Herzgewichtes und eines fibrotischen Umbaus des kardialen Gewebes. Die Schwere dieser Veränderungen ließ sich dabei unabhängig vom Blutdruck durch selektive Aldosteronblockade reduzieren (Rocha et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass Aldosteron die Wirkung von Angiotensin II potenzieren kann (Xiao et al., 2004). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass es in einem Tiermodell unter Therapie mit ACE-Hemmern zu einer Blockade der NF- κ B-vermittelten Signaltransduktion mit Hemmung der proinflammatorischen Antwort kam. Von der Blockade unberührt blieb hingegen die Expression von Kollagen I, die nicht über NF- κ B, sondern über das Aktivator Protein-1 (AP-1) vermittelt wird (Hernández-Presa et al., 1998; Tharaux et al., 2000).

Es ist daher möglich, dass in dem zugrundeliegenden Modell die protektive Wirkung einer abgeschwächten inflammatorischen Reaktion durch die Kombinationsbehandlung von Angiotensin II und Aldosteron maskiert wurde und es deshalb nicht zu einer abgeschwächten Fibrosierung oder besserer Nierenfunktion in den hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäusen kam.

4.3 HYPERTONUSASSOZIIERTE SCHÄDEN AM HERZEN

Morphologisches Korrelat einer hypertonusassoziierten Herzschädigung ist die konzentrische Hypertrophie des Herzens, die aufgrund der physiologischen Druckverhältnisse besonders im linken Ventrikel zum Tragen kommt.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- Eine signifikante Zunahme des relativen Herzgewichtes unter arterieller Hypertonie in vergleichbarem Umfang in den WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen.
- Eine deutliche Expressionsteigerung von Fibrosemarkern in den hypertensiven WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen mit deutlichen Zeichen einer Fibrosierung in der histopathologischen Aufbereitung ohne signifikante Unterschiede zwischen den hypertensiven Gruppen.
- Eine signifikante Steigerung der ANP-Genexpression unter arterieller Hypertension ohne signifikante Unterschiede zwischen den hypertensiven WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit den Daten, die Kirchoff et al. für die C57BL/6J-Mäuse erheben konnten (Kirchoff et al., 2008). Auch in dieser Arbeitsgruppe kam es zu einem Anstieg des relativen Herzgewichtes, zu einer deutlichen Fibrose (histopathologisch und in der relativen Genexpression) sowie einer gesteigerten Expression der natriuretischen Peptide ANP und BNP. In der Arbeit von Jacobi et al. konnten in den hDDAH1-transgenen Mäusen keine Unterschiede hinsichtlich des relativen Herzgewichtes innerhalb der hypertensiven Gruppen festgestellt werden (Jacobi et al., 2008). Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den hier vorliegenden Daten. In molekularbiologische Untersuchungen am Herzen fanden sich darüber hinaus keine Unterschiede zwischen WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen hinsichtlich der Expression von Fibronectin, Kollagen III sowie ANP und BNP.

ADMA scheint im Rahmen hypertonusinduzierter fibrotischer Umbauprozesse keine wesentliche Rolle in der Ausprägung einer hypertonusassoziierten kardialen Schädigung einzunehmen. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass neben Angiotensin II auch Aldosteron eine starke und unabhängige Rolle in der Genese des kardialen Schadens einnimmt. Die Aldosteronsynthese wurde im kardialen Gewebe sowie in Gefäßen und im Gehirn nachgewiesen (Struthers und MacDonald, 2004). Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass im menschlichen Herzen die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vorliegt, die für die Bindung von Aldosteron an seinen Rezeptor verantwortlich ist (Lombès et al., 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass einer Myokardfibrose durch Gabe von Spironolacton, einem Antagonisten des Aldosteron-Rezeptors, vorgebeugt werden konnte. Diese Wirkung war dabei unabhängig von der Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie bzw. von der Höhe des systolischen Blutdruckes (Brilla, 2000). Dies steht dabei nicht in Widerspruch mit der Arbeit von Jacobi et al., deren Untersuchung des kardialen Schadens sich exklusiv auf die Ermittlung der linksventrikulären Hypertrophie beschränkte (Jacobi et al. 2008). In Studien unter Verwendung salzreicher Diäten wurde gezeigt, dass es mit steigender Aldosteron-Konzentration zu einer Expressionssteigerung von Kollagen kam (Brilla, 2000). Darüber hinaus korrelierten in humanen Studien die Aldosteron-Konzentrationen im Serum positiv mit der mittels Elektrokardiographie bestimmten linksventrikulären Masse (Schlaich et al., 2000). Es ist somit zu vermuten, dass es zu einer additiven bzw. superadditiven Wirkung von Angiotensin II und Aldosteron in diesem Modell kam, mit der Möglichkeit, dass protektive Effekte einer hDDAH1-Überexpression am Myokard maskiert wurden.

4.4 HYPERTONUSASSOZIIERTE SCHÄDEN AM GEFÄßSYSTEM

Ein arterieller Hypertonus führt zu einer Schädigung des Gefäßendothels mit daraus resultierenden Einschränkungen der Gefäßfunktion. Die Dysfunktion des Endothels gilt als prognostischer Faktor für kardiovaskuläre Ereignisse (Heitzer et al., 2001). Als Ursache einer endothelialen Dysfunktion gilt bei einer Reihe klassischer

kardiovaskulärer Risikofaktoren ein vermehrter oxidativer Stress. Dies gilt auch für den arteriellen Hypertonus (Rajagopalan et al., 1996). Eine wichtige Rolle in der Generation von oxidativem Stress nimmt Angiotensin II ein. Es wurde gezeigt, dass Angiotensin II über die NADPH-Oxidase die Produktion von Superoxid-Radikalen erhöhen kann (Mollnau et al., 2002). Superoxide reagieren ihrerseits mit NO unter Bildung von Peroxynitrit und sind ausserdem in der Lage, die eNOS zu entkoppeln. Dadurch sinkt die Bioverfügbarkeit von NO und das Risiko des Auftretens einer endothelialen Dysfunktion steigt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Inkubation von Endothelzellen mit nativem bzw. oxidiertem LDL die endotheliale Superoxidproduktion und damit den oxidativen Stress erhöht (Vergnani et al., 2000). Die entscheidenden Ergebnisse dieser Arbeit bezogen auf eine Schädigung des vaskulären Systems sind:

- Eine statistisch signifikant beeinträchtigte endothelabhängige Relaxationsfähigkeit der Aorten unter arterieller Hypertonie im Vergleich zur Normotonie in beiden Mausgruppen (WT- und hDDAH1-transgene Mäuse).
- Keine signifikanten Unterschiede der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit der Aorten unter normotensiven bzw. hypertensiven Bedingungen in den entsprechenden WT- und hDDAH1-transgenen Mausgruppen.
- Keine signifikanten Unterschiede in der endothelunabhängigen Relaxationsfähigkeit der Aorten zwischen normotensiven bzw. hypertensiven Bedingungen in den WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen.

Für glatte Gefäßmuskelzellen wurde gezeigt, dass Aldosteron die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade von Angiotensin II potenzieren kann (Mazak et al., 2004). Eine Inkubation von Aortenringen mit Aldosteron verdoppelte die Schwere einer Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion, wogegen die KCl-vermittelte Vasokonstriktion unbeeinträchtigt blieb (Ullian et al., 1996). Man kann daher davon

ausgehen, dass in dem vorliegenden Modell, die über Angiotensin II- und DOCA-Pellet-vermittelte, überschießende Superoxidproduktion über einen vermehrten ADMA-Abbau nicht zu kompensieren war und es deshalb im Folgenden auch in den hDDAH1-transgenen Mäusen zu einer deutlichen endothelialen Dysfunktion kam. In einer mit unserer Arbeit vergleichbaren Publikation von Jacobi et al., bei denen der arterielle Hypertonus durch eine reine Angiotensin II-Infusion erzielt wurde, wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Bereich der Aortae ascendens und descendens mittels DHE-Floureszenzmessung ermittelt (Jacobi et al., 2008). Dabei zeigte sich bei subkutaner Infusion von 1 µg Angiotensin II pro kg KG/min, dass die hDDAH1-transgenen Mäuse deutlich weniger oxidativen Stress als die WT-Mäuse produzierten. Unter Infusion mit 3 µg Angiotensin II pro kg KG/min kam es jedoch auch in den transgenen Mäusen zu einem deutlichen Anstieg des oxidativen Stresses. Diese geringere Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies deutet auf einen partiellen Schutz der transgenen Mäuse gegenüber erhöhten systolischen Drücken durch einen vermehrten Abbau von ADMA hin. Dennoch konnten auch Jacobi et al. keinen Unterschied im Verhältnis der Gefäßwand zum Gefäßlumen zwischen WT- und hDAAH1-transgenen Mäusen ermitteln (Jacobi et al., 2008). Dieses Ergebnis steht somit in Einklang zu den hier erhobenen Daten, in denen der Schwerpunkt mehr auf die Endothelfunktion als auf die Superoxidproduktion gelegt wurde. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen (normotensiv und hypertensiv) bezogen auf die Funktionsfähigkeit des Endothels gemessen werden.

Neben einer dominanten Angiotensin II-Wirkung kommt eine weitere mögliche Erklärung für diese Beobachtungen infrage. Es ist bekannt, dass für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion im vaskulären Gewebe die DDAH2 bereits unter physiologischen Bedingungen eine bedeutende Rolle spielt (Wang et al., 2007). In einem Maus-Hypertonus-Modell mit hDDAH2-transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Infusion von Angiotensin II in den hDDAH2-transgenen Mäusen mit weniger oxidativen Stress verbunden war und zu einer verringerten perivaskulären Fibrose führte (Hasegawa et al., 2007). Diese Daten unterstützen die

These einer dominanten Rolle der DDAH2 hinsichtlich einer Protektion gegenüber vaskulärer Schädigung.

Neben den direkten Effekten an den Aorten zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten einen deutlichen Anstieg der Cholesterinplasmakonzentrationen unter arteriellem Hypertonus, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen WT- und hDDAH1-transgenen Mäusen. Es ist anzunehmen, dass einerseits über oxidiertes bzw. natives LDL die Endothelzellen zur Superoxidproduktion angeregt wurden und andererseits Angiotensin II, u.a. über eine Stimulierung der NADPH-Oxidase, die Superoxidproduktion erhöhen konnte. Der dadurch hervorgerufene oxidative Stress mag im Folgenden zu einer progressiven Einschränkung der Gefäßfunktion im Sinne einer endothelialen Dysfunktion geführt haben.

4.5 ADMA UND INFLAMMATION

Es gibt eine Vielzahl an Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen ADMA und inflammatorischen Prozessen nahe legen. So konnte in Zellkulturversuchen gezeigt werden, dass ADMA die Expression von MCP-1 hochreguliert und die endotheliale Adhäsion von Monozyten ans Endothel über den NF- κ B-Signalweg fördert (Böger et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von isolierten Monozyten mit Angiotensin II zu einem Anstieg von ADMA und hierüber zu einer erhöhten Adhäsion von Leukozyten an Umbilikalvenenendothelzellen führte (Chen et al., 2008). Eine gesteigerte Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten durch ADMA konnte auch in Patienten mit Hypercholesterinämie nachgewiesen werden (Chan et al., 2000). In tierexperimentellen Versuchen wurde gezeigt, dass hDDAH1-transgene Mäuse nach heterotoper Herztransplantation eine geringere Ausprägung einer Transplantatvaskulopathie aufwiesen. In diesem Zusammenhang wurden in transplantierten Herzen hDDAH1-transgener Empfängermause signifikant niedrigere myokardiale Expressionen von MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, TNF- α und TGF- β gemessen (Tanaka et al., 2005). In einer weiteren Arbeit wurde eine Endothelschädigung im Bereich der Femoralarterie verursacht und anschließend auf

eine endotheliale Regenerationsfähigkeit nach 4 Wochen untersucht. Hier fand man für die hDDAH1-transgenen Mäuse eine schnellere endotheliale Regeneration, bei einer signifikant verminderten, T-Zell-vermittelten, inflammatorischen Komponente (Konishi et al., 2007). Eine geringere inflammatorische Reaktion fand sich auch in hDDAH1-transgenen Mäusen im Rahmen einer Reperfusionreaktion nach koronarer Ischämie (Stühlinger et al., 2007). Darüberhinaus zeigten von Leitner et al. eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ADMA mit einer vermehrten Degranulation und dadurch bedingten Freisetzung von Myeloperoxidase. Dies resultierte in der Folge in einer vermehrten Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen und interessanterweise auch zu einer verminderten DDAH-Aktivität (von Leitner et al., 2011).

In verschiedenen Versuchen anderer Arbeitsgruppen konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass es Hinweise für eine NO-unabhängige Wirkung von ADMA gibt. So führte eine vierwöchige Infusion von ADMA sowohl in WT-Mäusen, als auch in eNOS-defizienten Mäusen zu mikrovaskulären Schäden der Koronararterien (Suda et al., 2004). Die Ausprägung dieser Schädigungen konnte nicht durch Gabe von L-Arginin verhindert werden. Desweiteren wurde gezeigt, dass pathophysiologische Konzentrationen von ADMA über einen NO-unabhängigen Weg zu einer Veränderung der Genexpression in humanen Endothelzellen führen (Schulze et al., 2005).

ADMA scheint somit proinflammatorische Eigenschaften zu besitzen. Dabei ist nicht auszuschließen, dass die proinflammatorische Wirkung neben einem NO-abhängigen auch über einen NO-unabhängigen Weg erfolgt.

4.6 LIMITATIONEN DES EINGESETZTEN MAUSMODELLS

Eine gezielte Beeinflussung von Genen, von denen man vermutet, dass sie eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des arteriellen Hypertonus einnehmen, sind ein elegantes Verfahren, um die Entstehung von Endorganschäden im Mausversuch genauer zu untersuchen. Dabei hat sich in der Vergangenheit herausgestellt, dass vor allem das Ausmaß der renalen Schädigung innerhalb der verschiedenen Mausstämme

erheblich variieren kann (Hartner et al., 2003). Mäuse, die auf dem C57BL/6J-Hintergrund generiert wurden, zeigten sich dabei besonders resistent gegenüber der Induktion eines renalen Schadens nach alleiniger Angiotensin II-Infusion (Wesseling et al., 2005).

Auch die hDDAH1-transgene Maus wurde vor dem Hintergrund eines C57BL/6J-Mausstammes generiert. Um in diesem Mausstamm adäquate Endorganschäden zu provozieren, wurde ein Hypertonusmodell entwickelt, dass neben einer einseitigen Nephrektomie die Implantation eines DOCA-Pellets in Kombination mit 1% NaCl-haltigem Trinkwasser sowie die subkutane Implantation osmotischer Minipumpen, mit einer Freisetzung von 1,5µg Angiotensin II pro kg KG/min, beinhaltete (Kirchhoff et al., 2008). Mit diesem Modell konnten sowohl auf Ebene der Genexpression als auch histopathologisch hypertonusassoziierte Schäden an der Niere und am Herzen induziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher dieses Hypertonusmodell herangezogen, um den Einfluss von ADMA bzw. einer hDDAH1-Überexprimierung auf die Endorganschäden bei arteriellem Hypertonus zu untersuchen.

Neben dem Vorteil einer verlässlichen Induktion eines arteriellen Hypertonus und hypertensiver Endorganschäden besitzt dieses Modell jedoch auch einige Limitationen, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Das dem Mausmodell zugrundeliegende klinische Korrelat ist ein Hyperaldosteronismus gepaart mit einer renovaskulären Hypertonie. Die Kombination beider Erkrankungsbilder ist im klinischen Alltag nur selten präsent. Neben Angiotensin II wurde in unserem Modell DOCA-Salz verwendet, das in seiner Wirkung vergleichbar mit Aldosteron ist. Zwischen Angiotensin II und Aldosteron wurden eine Vielzahl von Wechselwirkungen beschrieben. So wurde z.B. gezeigt, dass Aldosteron die Zahl der Angiotensin II-Rezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen hochreguliert (Ullian et al., 1992). In der gleichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass Aldosteron darüber hinaus auch eine direkte Desensibilisierung und Herunterregulierung der Angiotensin II-Rezeptoren durch Angiotensin II verhindern kann. Desweiteren führte Aldosteron in einer anderen Arbeit zu einer Verstärkung der Angiotensin II-vermittelten Signaltransduktion (Mazak et al., 2004).

Eine Inkubation von Aortenringen mit Aldosteron führte zu einer Verdopplung der Angiotensin II-induzierten Vasokonstriktion, während eine KCl-vermittelte Kontraktion der Aortenringe von einer Inkubation mit Aldosteron unbeeinträchtigt blieb (Ullian et al., 1996). Die ohnehin stark profibrotischen und proinflammatorischen Reize von Angiotensin II erfahren somit unter der Kombination mit DOCA eine Potenzierung, so dass mögliche protektive Effekte einzelner Gene maskiert bleiben. So lässt sich nicht ausschließen, dass eine hDDAH1-Überexpression dennoch protektive Effekte im Hinblick auf die Pathogenese hypertonusassoziierter Endorganschäden besitzt, die durch eine überschießende Stimulierung mit Angiotensin II in Kombination mit Aldosteron in unserem verwendeten Modell jedoch nicht zum Tragen gekommen sind und somit nicht detektiert werden konnten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der arterielle Hypertonus ist ein häufiger und wichtiger Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen. Organe, die durch chronisch erhöhten Blutdruck irreversibel geschädigt werden können, sind unter anderem die Nieren, das Herz und das Gefäßsystem.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels eines murinen Hypertonus-Modells der Einfluss von ADMA auf die Pathogenese des arteriellen Hypertonus anhand der hDDAH1-transgenen Maus untersucht. Dabei sollte die Hypothese geprüft werden, ob eine Überexpression des hDDAH1-Gens und ein damit einhergehender gesteigerter ADMA-Abbau protektive Eigenschaften gegenüber der Entwicklung hypertonusassoziiierter Endorganschäden an Nieren, Herz und Gefäßsystem besitzt.

Mit dem Angiotensin II-DOCA-Modell konnte eine deutliche Erhöhung der murinen Blutdrücke erzielt werden. In beiden Mausgruppen kam es unter hohen systolischen Blutdrücken zu einer deutlichen Fibrosierung der Niere sowie zu einer Einschränkung der Nierenfunktion. Die arterielle Blutdruckerhöhung führte in hDDAH1-transgenen und WT-Mäusen zu einer auf Ebene der Genexpression und histopathologisch nachweisbaren Umstrukturierung der Extrazellulärmatrix des kardialen Gewebes. Darüber hinaus führte der induzierte Hypertonus zu einer ausgeprägten Reduktion der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit der Aorta als Ausdruck einer vaskulären Schädigung.

Interessanterweise zeigte sich eine deutlich abgeschwächte inflammatorische Reaktion in den Nieren der hypertensiven hDDAH1-transgenen Mäuse. Dies unterstreicht die potentiell inflammatorische Potenz von ADMA bzw. eine antiinflammatorische Potenz einer hDDAH1-Überexpression. Diese abgeschwächte inflammatorische Reaktion hatte jedoch- vermutlich aufgrund der Potenzierung des Angiotensin II- und DOCA-Effekts im verwendeten Hypertonusmodell - keine Auswirkung auf die Schwere der renalen Fibrosierung und Funktionseinschränkung. Ob die hDDAH1-induzierte, reduzierte inflammatorische Reaktion ein zukünftiger Behandlungsansatz beim arteriellen Hypertonus darstellt, muss durch weitere tierexperimentelle und klinische Untersuchungen geprüft werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Stuehlinger M, Tsao PS. (2001) Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol* 88(10):1201-1203.

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. (2003) Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(8):1455-1459.

Anderson HV, Stokes MJ, Leon M, Abu-Halawa SA, Stuart Y, Kirkeeide RL. (2000) Coronary artery flow velocity is related to lumen area and regional left ventricular mass. *Circulation* 102(1):48-54.

Andrew PJ, Mayer B. (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43(3):521-531.

Böger RH. (2003) Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 41(11):1467-1472.

Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. (2000) An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol* 36(7):2287-2295.

Böger RH, Sullivan LM, Schwedhelm E, Wang TJ, Maas R, Benjamin EJ, Schulze F, Xanthakis V, Benndorf RA, Vasan RS. (2009) Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. *Circulation* 119(12):1592-1600.

Brilla CG. (2000) Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 25(3):299-306.

Cai H, Harrison DG. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87(10):840-844.

Chan JR, Böger RH, Bode-Böger SM, Tangphao O, Tsao PS, Blaschke TF, Cooke JP. (2000) Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1040-1046.

Chen M, Li Y, Yang T, Wang Y, Bai Y, Xie X. (2008) ADMA induces monocyte adhesion via activation of chemokine receptors in cultured THP-1 cells. *Cytokine* 43(2):149-159.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ (2003) Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42(6):1206-1252.

Cooke JP. (2004) Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 109(5):1813-1818.

Curgunlu A, Uzun H, Bavunoğlu I, Karter Y, Genç H, Vehid S. (2005) Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in white coat hypertension. *J Hum Hypertens* 19(8):629-633.

Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ, Cooke JP. (2003) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 108(24):3042-3047.

Dayoub H, Rodionov RN, Lynch C, Cooke JP, Arning E, Bottiglieri T, Lentz SR, Faraci FM. (2008) Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibits asymmetric dimethylarginine-induced endothelial dysfunction in the cerebral circulation. *Stroke* 39(1):180-184.

Delles C, Schneider MP, John S, Gekle M, Schmieder RE. (2002) Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens* 15(7):590-593.

Endemann DH, Schiffrin EL. (2004) Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15(8):1983-1992.

Franco V, Oparil S. (2006) Salt sensitivity, a determinant of blood pressure, cardiovascular disease and survival. *J Am Coll Nutr* 25(3):247-255.

Fujii H, Takiuchi S, Kawano Y, Fukagawa M. (2008) Putative role of asymmetric dimethylarginine in microvascular disease of kidney and heart in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 21(6):650-656.

Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. (1993) Regional and cardiac haemodynamic effects of NG, NG,dimethyl-L-arginine and their reversibility by vasodilators in conscious rats. *Br J Pharmacol* 110(4):1457-1464.

Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. (2001) Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 37(4):489-492.

Greene EL, Kren S, Hostetter TH. (1996) Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 98(4):1063-1068.

Harrison DG. (1997) Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 20(11 Suppl II): II-11-17.

Hartner A, Cordasic N, Klanke B, Veelken R, Hilgers KF. (2003) Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol Dial Transplant* 18(10):1999-2004.

Hasegawa K, Wakino S, Tatematsu S, Yoshioka K, Homma K, Sugano N, Kimoto M, Hayashi K, Itoh H. (2007) Role of asymmetric dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2. *Circ Res* 101(2):e2-10.

Heintz R, Dobener E. (1952) Untersuchungen über die Wirkung von Desoxycorticosteronacetat (DOCA) und Kochsalz auf Blutdruck, Wasserhaushalt und Nebennierengewicht von Albinoratten. *Res Exp Med* 120(1):1-8.

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104(22):2673-2678.

Hernández-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Egido J. (1998) ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol* 153(6):1825-1837.

Hörl WH. (2006) Sequelae of hypertension: kidney disease. *Internist (Berl)* 47(3):226, 228-232.

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. (1999) Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 99(2):3092-3095.

Jacobi J, Maas R, Cordasic N, Koch K, Schmieder RE, Böger RH, Hilgers KF. (2008) Role of asymmetric dimethylarginine for angiotensin II-induced target organ damage in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(2):1058-1066.

Jacobi J, Sydow K, von Degenfeld G, Zhang Y, Dayoub H, Wang B, Patterson AJ, Kimoto M, Blau HM, Cooke JP. (2005) Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation* 111(11):1431-1438.

Kannel WB. (1993) Hypertension as a risk factor for cardiac events--epidemiologic results of long-term studies. *J Cardiovasc Pharmacol* 21(2):27-37.

Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. (1998) Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol* 82(8):2-9.

Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Schäffer J, Barbey M, Koch KM, Frölich JC. (1999) Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 10(3):594-600.

Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. (1993) Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys* 300(2):657-662.

Kirchhoff F, Krebs C, Abdulhag UN, Meyer-Schwesinger C, Maas R, Helmchen U, Hilgers KF, Wolf G, Stahl RAK, Wenzel U. (2008) Rapid development of severe end-organ damage in C57BL/6 mice by combining DOCA salt and angiotensin II. *Kidney Int* 73(5):643-650.

Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Takeya M, Kuziel WA, Matsushima K, Mukaida N, Yokoyama H. (2004) Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol* 165(1):237-246.

Klausen KP, Scharling H, Jensen G, Jensen JS. (2005) New definition of microalbuminuria in hypertensive subjects: association with incident coronary heart disease and death. *Hypertension* 46(1):33-37.

Konishi H, Sydow K, Cooke JP. (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury. *J Am Coll Cardiol* 49(10):1099-1105.

Kubes P. (2000) Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut* 47(1):6-9.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(11):4651-4655.

Kuschinsky W. (2005) Herz-Kreislauf-Funktion In: *Physiologie*. R Deetje, E.-J. Speckmann, J Hescheler (Hrg.) Urban&Fischer, München, 418-476.

La Rovere MT, Pinna GD, Raczak G. (2008) Baroreflex sensitivity: measurement and clinical implications. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 13(2):191-207.

Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P. (1999) Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 343(1):209-214.

Leypoldt F, Choe C-U, Gelderblom M, von Leitner E-C, Atzler D, Schwedhelm E, Gerloff C, Sydow K, Böger RH, Magnus T. (2009) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 transgenic mice are not protected from ischemic stroke. *PLoS ONE* 4(10):e7337.

Li H, Förstermann U. (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190(3):244-254.

Liao T-D, Yang X-P, Liu Y-H, Shesely EG, Cavasin MA, Kuziel WA, Pagano PJ, Carretero OA. (2008) Role of inflammation in the development of renal damage and dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 52(2):256-263.

Lombès M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP. (1995) Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* 92(2):175-182.

Luft FC, Mervaala E, Müller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H (1999) Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 33(1):212-218.

Matsumoto Y, Ueda S, Yamagishi S-ichi, Matsuguma K, Shibata R, Fukami K, Matsuoka H, Imaizumi T, Okuda S. (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase prevents progression of renal dysfunction by inhibiting loss of peritubular capillaries and tubulointerstitial fibrosis in a rat model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18(5):1525-1533.

Mazak I, Fiebeler A, Muller DN, Park J-K, Shagdarsuren E, Lindschau C, Dechend R, Viedt C, Pilz B, Haller H, Luft C. (2004) Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 109(22):2792-2800.

McDermott JR. (1976) Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 154(1):179-184.

Meyrier A, Simon P. (1996) Nephroangiosclerosis and hypertension: things are not as simple as you might think. *Nephrol Dial Transplant* 11(11):2116-2120.

Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. (2002) Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90(4):E58-65.

Moncada S, Higgs A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329(27):2002-2012.

Monsalve E, Oviedo PJ, García-Pérez MA, Tarín JJ, Cano A, Hermenegildo C. (2007) Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 73(1):66-72.

Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MPC, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PAM. (2003) The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clin Nutr* 22(1):17-22.

Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. (2006) The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 69(2):318-328.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. (1989) Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 264(17):10205-10209.

Paik WK, Kim S. (1968) Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem* 243(9):2108-2114.

Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS. (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(6):3227-3245.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333(6174):664-666.

Pavlopoulos H, Nihoyannopoulos P. (2008) The constellation of hypertensive heart disease. *Hellenic J Cardiol* 49(2):92-99.

Perazella MA, Setaro JF. (2003) Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *J Nucl Cardiol* 10(2):184-196.

Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, Tripepi G, Sesti G, Zoccali C. (2005) Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 46(3):518-523.

Querejeta R, Varo N, López B, Larman M, Artiñano E, Etayo JC, Martínez Ubago JL, Gutierrez-Stampa M, Emparanza JI, Gil MJ, Monreal I, Mindan JP, Diez J. (2000) Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation* 101(14):1729-1735.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. (1991) Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci* 12(3):87-88.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97(8):1916-1923.

Reaven G. (2005) Insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease: the end of the beginning. *Circulation* 112(20):3030-3032.

Rerolle JP, Hertig A, Nguyen G, Sraer JD, Rondeau EP. (2000) Plasminogen activator inhibitor type 1 is a potential target in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 58(5):1841-1850.

Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. (2002a) Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology* 143(12):4828-4836.

Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EAG, McMahon EG, Delyani JA. (2002b) Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(5):1802-1810.

Rocha R, Stier CT, Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, Adler GK. (2000) Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 141(10):3871-3878.

Sadoshima J, Izumo S. (1997) The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59:551-571.

Sakai N, Wada T, Furuichi K, Shimizu K, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Matsushima K, Yokoyama H, Kaneko S. (2006) MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *J Leukoc Biol* 79(3):555-563.

Schlaich MP, Schobel HP, Hilgers K, Schmieder RE. (2000) Impact of aldosterone on left ventricular structure and function in young normotensive and mildly hypertensive subjects. *Am J Cardiol* 85(10):1199-1206.

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T. (2005) Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 97(5):e53-59.

Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Böger RH. (2005) Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest* 35(10):622-626.

Schwedhelm E, von Leitner E-C, Atzler D, Schmitz C, Jacobi J, Meinertz T, Münzel T, Baldus S, Cooke JP, Böger RH, Maas R, Sydow K (2009) Extensive characterization of the human DDAH1 transgenic mice. *Pharmacol Res* 60(6):494-502.

Scott-Burden T, Vanhoutte PM. (1994) Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex Heart Inst J* 21(1):91-97.

Segarra G, Medina P, Vila JM, Chuan P, Domenech C, Torondel B, Lluch A. (2001) Inhibition of nitric oxide activity by arginine analogs in human renal arteries. *Am J Hypertens* 14(11):1142-1148.

Sprague AH, Khalil RA. (2009) Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 78(6):539-552.

Struthers AD, MacDonald TM. (2004) Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovasc Res* 61(4):663-670.

Stühlinger MC, Conci E, Haubner BJ, Stocker E-M, Schwaighofer J, Cooke JP, Tsao PS, Pachinger O, Metzler B. (2007) Asymmetric dimethyl L-arginine (ADMA) is a critical regulator of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 75(4):417-425.

Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tasaki H, Ueno S, Nakata S, Tsujimoto T, Toyohira Y, Hayashida Y, Sasaguri Y, Ueta Y, Nakashima Y, Yanagihara N. (2004) Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(9):1682-1688.

Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC. (1999) Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 33(4):652-658.

Sydow K, Münzel T. (2003) ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 4(4):41-51.

Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Hornig B, Frölich JC, Böger RH. (2003) ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 57(1):244-252.

Tanaka M, Sydow K, Gunawan F, Jacobi J, Tsao PS, Robbins RC, Cooke JP. (2005) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. *Circulation* 112(11):1549-1556.

Tegos TJ, Kalodiki E, Sabetai MM, Nicolaides AN. (2001) The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review. *Angiology* 52(2):89-98.

Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. (2000) Angiotensin II

activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension* 36(3):330-336.

Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS. (1997) Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 52(6):1593-1601.

Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. (2000) Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 68(4):101-105.

Tran CT, Leiper JM, Vallance P. (2003) The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 4(4):33-40.

Treasure CB, Klein JL, Vita JA, Manoukian SV, Renwick GH, Selwyn AP, Ganz P, Alexander RW. (1993) Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation* 87(1):86-93.

Ueda S, Yamagishi S-ichi, Matsumoto Y, Kaida Y, Fujimi-Hayashida A, Koike K, Tanaka H, Fukami K, Okuda S. (2009) Involvement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in glomerular capillary loss and sclerosis in a rat model of chronic kidney disease (CKD). *Life Sci* 84(23-24):853-856.

Ullian ME, Schelling JR, Linas SL. (1992) Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension* 20(1):67-73.

Ullian ME, Walsh LG, Morinelli TA. (1996) Potentiation of angiotensin II action by corticosteroids in vascular tissue. *Cardiovasc Res* 32(2):266-273.

Valkonen VP, Päävä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. (2001) Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical

dimethylarginine. *Lancet* 358(9299):2127-2128.

Vallance P, Leiper J. (2004) Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(6):1023-1030.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. (1992a) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339(8793):572-575.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. (1992b) Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 20(12):60-62.

Vergnani L, Hatric S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovich V, Fellin R, Malinski T. (2000) Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation* 101(11):1261-1266.

Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. (2004) Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J. Hypertens* 22(3):535-542.

von Leitner EC, Klinke A, Atzler D, Slocum JL, Lund N, Kielstein JT, Maas R, Schmidt-Haupt R, Pekavora M, Hellwinkel O, Tsikas D, D'Alecy LG, Lau D, Willems S, Kubala L, Ehmke H, Meinertz T, Blankenberg S, Schwedhelm E, Gadegbeku CA, Böger RH, Baldus S, Sydow K. (2011) Pathogenic Cycle Between the Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor Asymmetrical Dimethylarginine and the Leukocyte-Derived Hemoprotein Myeloperoxidase. *Circulation* 124(24):2735-2745.

Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M, Dennehy K,

Li M, Modlinger P, Leiper J, Vallance P, Adler O, Leona A, Tojo A, Welch WJ, Wilcox CS. (2007) Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. *Circ Res* 101(6):627-635.

Warnholtz A, Ostad MA, Heitzer T, Thuneke F, Fröhlich M, Tschentscher P, Schwedhelm E, Böger R, Meinertz T, Munzel T. (2007) AT1-receptor blockade with irbesartan improves peripheral but not coronary endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 194(2):439-445.

Weber KT. (2000) Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection and reparation. *Circulation* 102(12):1342-1345.

Weinberger MH, Miller JZ, Luft FC, Grim CE, Fineberg NS. (1986) Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance. *Hypertension* 8(6):II127-134.

Weis M, Cooke JP. (2003) Cardiac allograft vasculopathy and dysregulation of the NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(4):567-575.

Wesseling S, Ishola DA, Joles JA, Bluysen HA, Koomans HA, Braam B. (2005) Resistance to oxidative stress by chronic infusion of angiotensin II in mouse kidney is not mediated by the AT2 receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* 288(6):1191-12

Whitworth JA. (2003) 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21(11):1983-1992.

Wolf SS. (2009) The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci* 66(13):2109-2121.

Xiao F, Puddefoot JR, Barker S, Vinson GP. (2004) Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 44(3):340-345.

Xin H-Y, Jiang D-J, Jia S-J, Song K, Wang G-P, Li Y-J, Chen F-P. (2007) Regulation by DDAH/ADMA pathway of lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in endothelial cells. *Thromb Haemost* 97(5):830-838.

Yin Q-F, Xiong Y. (2005) Pravastatin restores DDAH activity and endothelium-dependent relaxation of rat aorta after exposure to glycated protein. *J Cardiovasc Pharmacol* 45(6):525-532.

Youn H-J, Ihm S-H, Lee J-M, Park C-S, Cho E-J, Jung H-O, Jeon H-K, Oh Y-S, Chung W-S, Kim J-H, Choi KB, Hong SJ. (2006) Relation between flow reserve capacity of penetrating intramyocardial coronary arteries and myocardial fibrosis in hypertension: study using transthoracic Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 19(4):373-378.

Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. (2008) Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 317(1-2):43-50.

Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iliri T, Fujita T, Komuro I. (2004) Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *NatCell Biol* 6(6):499-506.

7 DANKSAGUNG

Ich danke *PD Dr. Karsten Sydow* für die Bereitstellung des Themas sowie seiner umfassenden Betreuung, zahlreichen Anregungen, Kritiken und fachbasierten Diskussionen.

Ganz besonders großer Dank gilt *Prof. Dr. Ulrich Wenzel* für die tolle Kooperation und die vielfältige, schnelle und großartige Hilfe bei jeglicher Fragestellung.

Ich danke *PD Dr. Edzard Schwedhelm und Dr. Dorothee Atzler* aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie für die LC-MS/MS Messungen.

Für die Hilfe bei den Tieroperationen und den histologischen Präparaten danke ich *Dr. Robin von Leitner sowie Dr. Christian Krebs* aus der Medizinischen Klinik III (Nephrologie).

Ein besonders großes Dankeschön gebührt den tollen *Mitarbeitern der Experimentellen Kardiologie* für ihre unentwegte Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Besonders *Anna, Denise, Eike, Hartwig und Kai* standen mir unterstützend zur Seite.

Mama und Papa, Raphael sowie Sarah, Johann und Helena danke ich aus tiefstem Herzen für ihre Motivation und Unterstützung.

8 PUBLIKATION

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Originalarbeitenberücksichtigt:

Extensive characterization of the human hDDAH1 transgenic mice.

Schwedhelm E, von Leitner EC, Atzler D, Schmitz C, Jacobi C, Meinertz T, Münzel T, Baldus S, Cooke JP, Böger RH, Maas R, Sydow K.

Pharmacol Res. 2009 Dec;60(6):494-502. Epub 2009 Aug 8.

Impact factor 2009: 3,929

Dimethylarginine dimethylaminohydrolase1 is an organ-specific mediator of end organ damage in a murine model of hypertension.

Sydow K, Schmitz C, von Leitner EC, von Leitner R, Klinke A, Atzler D, Krebs C, Wieboldt H, Ehmke H, Schwedhelm E, Meinertz T, Blankenberg S, Böger RH, Magnus T, Baldus S, Wenzel U.

PLoS ONE; in revision (04/2012)

9 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Christine Elisabeth Schmitz
Geburtsdatum/-ort:	11.01.1986 in Münster
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1992-1996	Aegidii-Ludgeri-Grundschule in Münster
1996-2004	Bischöfliche Marienschule in Münster
2004	Allgemeine Hochschulreife

Studium

2004 - 2011	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 08/11	Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation der Asklepios Klinik St. Georg

10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: