

Aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. P. Dominiak

Studie
zur Bestimmung von Angiotensin-II-Rezeptor-mRNA-Level auf
der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse unter dem
Einfluss von antihypertensiv wirkenden Medikamenten

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Inga Voges
aus Braunschweig

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Walter Raasch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Horst Lorenz Fehm

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.05.2006

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Meinen geliebten Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung	1-10
---------------------	-------------

1.1 Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems	1
1.2 Regulation der Angiotensin-II-Rezeptorexpression	2
1.2.1 AT ₁ -Rezeptoren	2
1.2.2 AT _{1A} - und AT _{1B} -Rezeptoren	3
1.2.3 AT ₂ -Rezeptoren	3
1.3 Das Renin-Angiotensin-System auf der Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren-Achse	4
1.4 Pharmakologische Interventionen in das Renin-Angiotensin-System	5
1.4.1 ACE-Hemmer	6
1.4.2 AT ₁ -Rezeptorantagonisten	7
1.4.3 Kombinationstherapie	8
1.5 Fragestellung und Zielsetzung.	9

2 Materialien	11-15
----------------------	--------------

2.1 Gewebe	11
2.2 Geräte	11
2.2.1 PCR-Geräte	12
2.3 Substanzen	12
2.4 Einmalmaterial	14
2.5 Lösungen	14
2.6 Software	15

3 Methoden	16-31
-------------------	--------------

3.1 Isolierung von RNA aus tierischem Gewebe	16
---	-----------

3.1.1.	Gewebematerial	16
3.1.2.	Gewebevorbereitung	16
3.1.2.1	Nebenniere und Hypophyse	16
3.1.2.2	Hypothalamus	17
3.1.3.	RNA-Extraktion	17
3.1.3.1	Nebenniere und Hypophyse	17
3.1.3.2	Hypothalamus	18
3.1.4.	RNA-Aufreinigung	18
3.2	Nachweis von DNA-Kontamination	19
3.3	Spektralphotometrische RNA-Messung	19
3.3.1.	Verdünnung der RNA	19
3.3.2.	Photometrische Messung	19
3.3.3.	Berechnung der Menge und Konzentration extrahierter RNA		20
3.4	RT-Polymerasekettenreaktion	20
3.4.1	Reverse Transkription	21
3.4.1.1	Reaktionskomponenten	21
3.4.1.2	Berechnungen	21
3.4.1.3	Arbeitsprotokoll	22
3.4.2	PCR	22
3.4.2.1	Optimierung der PCR	23
3.4.2.1.1.	Optimierung der MgCl ₂ -Konzentration und Bindungstemperatur	23
3.4.2.1.2	Optimierung der Zyklusanzahl	25
3.4.2.1.2.1	Exemplarische Beschreibungen einer Reaktion		26
3.4.2.2	Hauptversuche	27
3.4.2.2.1	Nebenniere	27
3.4.2.2.2	Hypophyse	27
3.4.2.2.3	Hypothalamus	28
3.5	Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten	28
3.5.1	Restriktionsverdau	28
3.5.1.1	Restriktionsverdau der PCR-Fragmente	29
3.6	Agarosegel-Elektrophorese	29
3.6.1	Herstellung des Agarosegels	30

3.6.2	Probenvorbereitung	30
3.6.3	Elektrophorese	31
3.7	Analytische und Statistische Methoden	31
3.7.1	Analytik	31
3.7.2	Statistik	31

4 Ergebnisse	32-44
---------------------	--------------

4.1	Angiotensin II-Rezeptor-mRNA in Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere spontan hypertensiver Ratten	32
4.1.1	Gewebeverteilung von Angiotensin-Rezeptorsubtypen	32
4.1.1.1	Hypothalamus	32
4.1.1.2	Hypophyse	32
4.1.1.3	Nebenniere	32
4.2	Angiotensin-II-Rezeptor-mRNA-Level nach 3-monatiger Therapie mit Candesartan, Ramipril bzw. einer Kombination aus Candesartan und Ramipril	37
4.2.1	Organbezogene Expression der Angiotensin-Rezeptoren	37
4.2.1.1	Hypothalamus	37
4.2.1.2	Hypophyse	40
4.2.1.1	Nebenniere	42

5 Diskussion	45-54
---------------------	--------------

5.1	Angiotensin-II-Rezeptorsubtypen auf der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse	45
5.2	Einfluss von ACE-Hemmung und AT₁-Rezeptor Blockade auf die Angiotensin-II-Rezeptor-mRNA-Level innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse	46

6 Zusammenfassung	55-56
7 Literaturverzeichnis	57-74
8 Lebenslauf	75-76
9 Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ACE2	Angiotensin-Konversionsenzym 2
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Ang III	Angiotensin III (Angiotensin 2-8)
Ang IV	Angiotensin IV (Angiotensin 3-8)
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor Typ 1
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor Typ 2
bp	Basenpaare
C	Candesartan
C/R	Candesartan und Ramipril
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid-Triphosphate
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K	Kontrolle
kb	Kilobasen
M	Größenmarker
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure

NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PVN	Nucleus paraventricularis
R	Ramipril
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Polymerasekettenreaktion mit Reverser Transkriptase zur Vervielfältigung von RNA
SHR	Spontan hypertensive Ratten
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
UV	Ultraviolett
WKY	Wistar-Kyoto Ratten

1 Einleitung

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) gilt als klassisches endokrines System und spielt eine entscheidende Rolle bei der Blutdruckregulation, der Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie der Herz-Kreislauf-Funktion. Das wichtigste Effektorpeptid des RAS, das Angiotensin II (Ang II), entfaltet seine Wirkungen im Wesentlichen durch Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren. Zwei verschiedene Rezeptorsubtypen, die als AT₁- und AT₂-Rezeptoren bezeichnet werden, wurden charakterisiert [51]. Bei Nagetieren existieren zwei Subtypen des AT₁-Rezeptors, der AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor [41]. Subtypen des humanen AT₁-Rezeptor konnten bislang nicht identifiziert werden [14, 26]. Da alle Angiotensin-Rezeptorsubtypen innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse exprimiert werden [18, 54, 84, 88, 89, 112, 173], geht man in jüngeren Untersuchungen davon aus, dass dem RAS bei der Regulation der Aktivität der HPA-Achse, insbesondere unter Stress, eine Bedeutung zukommt [2, 21, 91, 104]. Weitere Hinweise dafür sind u. a. die Zunahme von zirkulierendem Ang II [193] und eine veränderte Ang II-Rezeptorexpression innerhalb der HPA-Achse unter Stress [2, 21]. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ist es von Interesse und potentiell therapeutischer Bedeutung, ob eine pharmakologische Intervention die Ang II-Rezeptorexpression auf der HPA-Achse beeinflusst und ob zwischen verschiedenen Wirkprinzipien Unterschiede bestehen. Zu den bekanntesten pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten in das RAS zählen die Hemmung des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) und die Blockade von Ang II-Rezeptoren sowie deren Kombination.

1.1 Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems

Der Ausgangspunkt der Enzymkaskade zur Bildung des Ang II, dem wichtigsten Effektorpeptid des RAS, ist das Angiotensinogen, welches vorwiegend in der Leber synthetisiert und durch das Enzym Renin in Angiotensin I (Ang I) umgewandelt wird. Renin wird hauptsächlich in den Zellen des juxtaglomerulären Apparats der Niere gebildet und gespeichert. Die Regulation der Reninfreisetzung aus der Niere unterliegt vielschichtigen intrarenalen, sympathischen und humoralen Mechanismen [70]. Ang I ist ein Substrat des ACE, welches unter Abspaltung eines Dipeptids aus Ang I Ang II bildet. Im humanen Herzen konnte eine hochspezifische Chymase identifiziert werden, die in der Lage ist Ang II aus Ang I zu synthetisieren [177]. Darüber hinaus kann Ang II auch auf

anderen Nebenwegen unter Umgehung des ACE gebildet werden [16, 40, 167, 188], (*Abb. 1.1*). Die bekannten physiologischen Wirkungen des Ang II werden über den AT₁-Rezeptor ausgelöst. Bei Nagetieren existieren zwei Subtypen des AT₁-Rezeptors, der AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor [153, 195]. Beide Subtypen sind in ihrer Aminosäurestruktur zu mehr als 95 % identisch und lassen sich pharmakologisch aufgrund gleicher Bindungseigenschaften nicht differenzieren [29]. Unterschiede bestehen jedoch in Bezug auf Gewebeverteilung, chromosomale Lokalisation und Regulation [74, 85, 171]. Ang II führt neben einer direkten arteriellen Vasokonstriktion, Blutdrucksteigerung, Erhöhung der Aldosteronbiosynthese und -sekretion sowie Natriumretention u. a. auch zur Freisetzung von Katecholaminen, Sekretion von adrenokortikotropem Hormon (ACTH) und Vasopressin und übt eine dipsogene Wirkung aus [50, 66]. Darüber hinaus hat es Wachstumsfaktor-ähnliche Wirkungen und stimuliert Hypertrophie und Proliferation zahlreicher Zellen [29, 163]. In verschiedenen Zellpopulationen konnten ferner anti-apoptotische [140] aber auch apoptotische Effekte [106] des AT₁-Rezeptors nachgewiesen werden. Die Stimulation des AT₂-Rezeptors kann die über den AT₁-Rezeptor ausgelösten proliferativen Effekte in verschiedenen Gewebetypen inhibieren [119, 163] und einige Effekte des AT₂-Rezeptors können protektive Wirkungen haben [63, 67, 80]. Über den AT₂-Rezeptor sollen weiterhin Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse beeinflusst, sowie regenerative [181] und proapoptische Effekte [52, 192] vermittelt werden. Durch Abbau des Ang II mit Hilfe verschiedener Aminopeptidasen entstehen Angiotensinfragmente wie das Angiotensin 2-8 (Ang III), Angiotensin 3-8 (Ang IV) und Angiotensin 1-7, für die ebenfalls biologische Aktivität nachgewiesen werden konnte [44, 133, 190]. Die Degradierung dieser Substanzen führt schließlich zu inaktiven Metaboliten. Neben dem systemischen RAS gibt es lokale RAS in verschiedenen Organen, deren Regulation möglicherweise unabhängig vom zirkulierenden RAS erfolgt [20, 39, 42, 123, 137, 174, 175]. Es wird davon ausgegangen, dass lokal produziertes Ang II in diesen Organen als para- und autokrines Hormon fungiert und zur Induktion von Zellwachstum und Proliferation führt sowie die Bildung extrazellulärer Matrix kontrolliert [38, 39, 65, 184, 185]. Mit der Entdeckung des Angiotensin-Konversionsenzym 2 (ACE2) im Jahre 2000 [33, 170] wurde die Komplexität des RAS erweitert. Während ACE zur Bildung des Vasokonstriktors Ang II führt, ist ACE2 an der Bildung vasodilatatorisch wirkender Mediatoren beteiligt [28]. Neuere Untersuchungen deuten auf eine Bedeutung des ACE2 bei der Regulation kardialer Funktionen hin [24, 60].

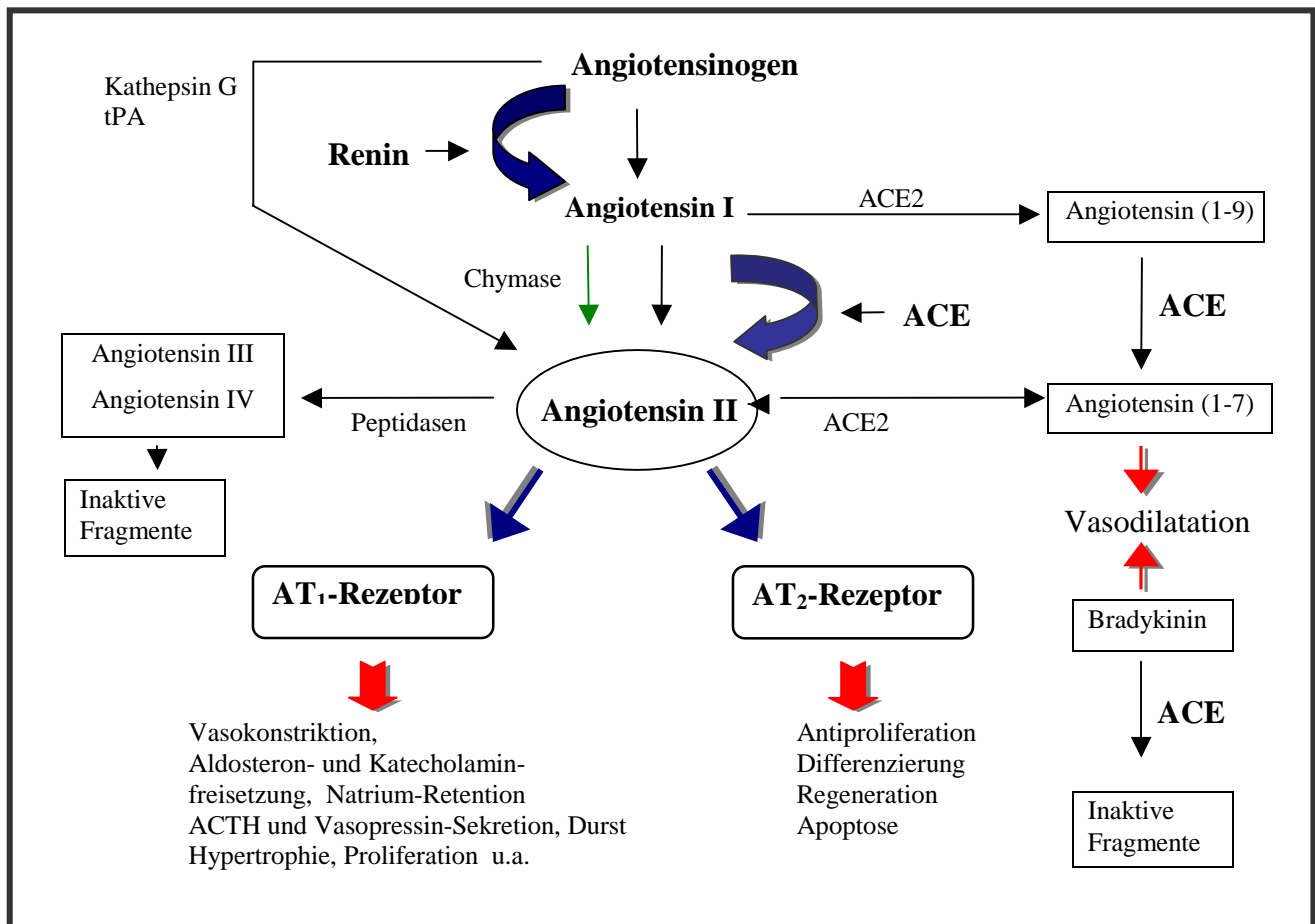


Abb.: 1.1: Renin-Angiotensin-System [28, 50, 66]

1.2 Regulation der Angiotensin-II-Rezeptorexpression

1.2.1 AT₁-Rezeptoren

Die Dichte der Angiotensin-Rezeptoren ist nicht konstant. Experimentelle Untersuchungen zeigten ein negatives Feedback von Ang II-Konzentration und Expression des AT₁-Rezeptors, wobei hohe Ang II-Konzentrationen zu einer Abnahme und geringe zu einer Zunahme der AT₁-Rezeptordichte führen [34]. In jüngerer Zeit sind vielfältige Faktoren und Umstände beschrieben worden, die mit einer Veränderung der AT₁-Rezeptordichte einhergehen [94, 97, 120, 126, 127, 128, 129, 182]. Interessanterweise konnte in den Geweben der HPA-Achse unter Stress eine erhöhte Expression des AT₁-Rezeptors nachgewiesen werden [2, 9, 21, 87].

1.2.2 AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptoren

AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wobei AT_{1A}-Rezeptoren mit Ausnahme von Hypophyse und Nebennieren, dominieren. Beide

Rezeptorsubtypen werden in den Geweben der HPA-Achse in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert [18, 54, 88, 89, 112]. Neben der gewebspezifischen Expression sind hormonale Regulationsmechanismen und Wachstumsfaktoren als Einflussfaktoren auf die AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptorexpression beschrieben worden [69, 92, 191]. An glatten Gefäßmuskelzellen führte NO zu einer Verminderung der AT_{1A}-Rezeptorexpression [81]. Darüber hinaus konnten einige Arbeitsgruppen bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Vergleich zu normotensiven Wistar-Kyoto Ratten unterschiedliche AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level auch innerhalb der HPA-Achse nachweisen [86, 91, 144]. Ferner wurde unter Stress eine differente Expression von AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptoren auf der HPA-Achse beobachtet [104]. Eine jüngere Untersuchung konnte Unterschiede in der Regulation der Rezeptorexpression in Hirnstamm, Hypophyse und Hypothalamus in Abhängigkeit von der Salzzufuhr bei SHR aufzeigen [22].

1.2.3 AT₂-Rezeptoren

Über die biochemischen und physiologischen Funktionen des AT₂-Rezeptors ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt weniger bekannt. Der AT₂ ist in der Fötalperiode stark exprimiert [56, 62, 172, 173], weshalb ihm eine Beteiligung an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen zugeschrieben wird. Postnatal nimmt die Expression des AT₂-Rezeptors innerhalb weniger Wochen ab und beschränkt sich auf bestimmte Organe und Gehirnregionen [62, 90, 173]. Innerhalb der HPA-Achse finden sich AT₂-Rezeptoren in der Nebenniere und in geringer Konzentration auch im Hypothalamus [131, 158].

Zahlreiche intra- und extrazelluläre Faktoren sind an der Regulation der AT₂-Rezeptorexpression beteiligt [53]. So konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der intrazellulären Salzkonzentration und der cAMP-Spiegel die AT₂-Rezeptorexpression beeinflussen [122, 166]. Als extrazelluläre Einflussfaktoren wurden Wachstum und Wachstumsfaktoren beschrieben [36, 93]. Dabei scheint die Regulation des AT₂-Rezeptors auf transkriptionaler, posttranskriptionaler und translationaler Ebene zu erfolgen [19]. An PC12W-Zellen führten Serum, Wachstumsfaktoren und Glukokortikoide zu einer „Down-regulation“ der AT₂-Rezeptorexpression, hauptsächlich durch Beeinflussung der Gentranskription [96]. Bei neuronalen Zellkulturen, die mit Nervenwachstumsfaktor inkubiert wurden, zeigten sich in Abhängigkeit von der Inkubationszeit Veränderungen der AT₂-Rezeptor-mRNA-Level [79]. Diese Untersuchungsergebnisse können als weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des AT₂-Rezeptors an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen angesehen werden.

Einige Studien untersuchten den Einfluss von Steroidhormonen auf die Regulation des AT₂-Rezeptors. Es konnte z. B. gezeigt werden dass Östrogen die AT₂-Rezeptordichte des humanen Uterus erhöht [114], wohingegen Aldosteron zu einer Abnahme der AT₂-Rezeptorexpression im Nebennierenmark führt [183]. Vor kurzem konnte an adipösen im Vergleich zu mageren Zucker-Ratten eine „Up-regulation“ der tubulären AT₂-Rezeptorexpression demonstriert werden, welche durch Förderung der Salzexkretion, die adipösen Ratten vor einem Bluthochdruck infolge Salz- und Wasserretention schützen sollen [71]. Auf R3T3-Zellen konnte beobachtet werden, dass Ang II ebenso wie der AT₂-Rezeptoragonist CGP-42112A in der Lage sind die AT₂-Bindungsstellen zu einer höheren Expression anzuregen [36, 159]. In PC12W-Zellen kam es nach Behandlung mit einem Muscarinrezeptor-Agonisten, zu einer Zunahme der AT₂-Rezeptor-mRNA-Level [160]. Auch für den AT₂-Rezeptor wurde eine veränderte Expression unter Stress beschrieben [9, 104].

1.3 Das Renin-Angiotensin-System auf der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Als Teil des Gehirns integriert der Hypothalamus vegetative, endokrine und somatomotorische Funktionen des Körpers. Neurone im Hypothalamus sind für die Regulation verschiedenster homöostatischer Funktionen verantwortlich, wie Nahrungszufuhr, Wasser- und Elektrolythaushalt, Temperatur und zirkadiane Rhythmik. Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere sind Teile des hypothalamo-hypophyseoadrenalen Regelkreises. Im Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus liegen Neurone die das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) produzieren. Diese Neurone projizieren u. a. in die Eminentia mediana der Neurohypophyse und das dort freigesetzte CRH gelangt über Portalgefäße in die nachgeschaltete Adenohypophyse und stimuliert hier die Sekretion von ACTH. ACTH bewirkt an der Nebenniere eine Ausschüttung von Glukokortikoiden. Über eine negative Rückkopplung schließt sich der Regelkreis. [95]. Der Hypothalamus steht mit der Hypophyse über weitere endokrine Regelkreise in Verbindung.

Für das Gehirn wurde ein lokales RAS beschrieben. Alle Komponenten des RAS werden im Gehirn exprimiert, einschließlich Angiotensinogen, Renin, ACE, Ang I u. II, sowie die Ang II-Rezeptoren [137]. Renin wurde in Neuronen und Nervenendigungen und ACE in hoher Konzentration in der Lamina terminalis, in den circumventrikulären Organen, im Hypothalamus und in einigen Hirnstammkernen nachgewiesen [25]. Ang II findet sich in

hoher Konzentration in synaptischen Vesikeln von Nervenendigungen der circumventrikulären Organe, unklar bleibt jedoch ob es tatsächlich intrazellulär gebildet wird. Außerdem wird eine Renin- und ACE-unabhängige Bildung diskutiert [25, 137]. Die Verteilung der Angiotensin-Rezeptoren im Gehirn konnte in mehreren Studien auch beim Menschen demonstriert werden [6, 56, 88, 89, 161, 173].

Nach Injektion von Ang II in die Gehirnventrikel konnten verschiedene Effekte wie Durst, Blutdrucksteigerung, Freisetzung von ACTH, Vasopressin und anderen hypophysären Hormonen nachgewiesen werden [43, 148]. Darüber hinaus wird Ang II insbesondere an der Aktivierung der HPA-Achse durch Stress eine Bedeutung beigemessen. Stress führt nicht nur zu einer gesteigerten Expression von Ang II-Rezeptoren im PVN und anderen Gehirnregionen [2, 21, 148], wie dem Subfornikalorgan dessen Neurone u. a. zum PVN projizieren [11], sondern auch zur erhöhten Synthese von Renin und zirkulierendem Ang II [3, 193]. Ang II seinerseits steigert die Bildung von CRH [4] und ACTH [148] in Stresssituationen, was wiederum zur adrenalen Glukokortikoidsynthese und -Ausschüttung führt. An der Nebenniere übt Ang II ferner direkte Effekte wie die Aldosteronsekretion und Katecholaminfreisetzung aus [1, 111]. Die Bedeutung von Ang II als Stress-Hormon konnte in einer Studie demonstriert werden, die die Aktivierung der HPA-Achse als Reaktion auf Stress bei Wistar-Ratten nach Vorbehandlung mit einem AT₁-Antagonisten untersuchte [9]. Die AT₁-Rezeptorblockade führte zu einer Hemmung der Stressantwort der HPA-Achse. Eine weitere Untersuchung konnte zusätzlich bei Stress exponierten stress-sensitiven spontan hypertensiven Ratten unter AT₁-Blockade eine Lebensverlängerung nachweisen [10].

1.4 Pharmakologische Interventionen in das Renin-Angiotensin-System

Die Entdeckung der pathophysiologischen Bedeutung des RAS insbesondere im Rahmen der arteriellen Hypertonie führte zum Beginn der therapeutischen Interventionen in das RAS. Die ACE-Hemmstoffe wurden 1981 eingeführt. Sie sind aktuell sowohl zur Behandlung der arteriellen Hypertonie als auch für die chronische Herzinsuffizienz, den Zustand nach Myokardinfarkt, die kardiovaskuläre Sekundärprävention sowie die diabetische und nicht-diabetische Nephropathie indiziert [37]. Die Gruppe der AT₁-Antagonisten ist bisher nur zur Behandlung der arteriellen Hypertonie zugelassen. Eine Ausnahme bilden der Wirkstoff Irbesartan, der auch zur Behandlung einer Nephropathie bei Patienten mit Hypertonie und Typ-2 Diabetes mellitus eingesetzt wird [59] und Losartan, der seit 2004 zur Therapie der Herzinsuffizienz zugelassen ist.

1.4.1 ACE-Hemmer

ACE-Inhibitoren hemmen die Spaltung des Ang I zum aktiven Ang II und damit auch die durch Ang II vermittelten Wirkungen. Neben Captopril, dem ersten ACE-Inhibitor, ist heute eine Vielzahl weiterer ACE-Hemmstoffe u. a. Ramipril verfügbar. Die meisten von ihnen binden mittels einer Sulfhydrylgruppe an das Zink im aktiven Zentrum des ACE. Die ACE-Hemmer werden mit Ausnahme von Captopril und Lisinopril in Form von so genannten „prodrugs“ verabreicht, die zu wirksamen Carbonsäuren hydrolysiert werden. Sie werden besser als die pharmakologisch aktiven Metabolite resorbiert. In Bezug auf die ACE-Hemmung sind die „prodrugs“ viel weniger potent als die aktiven Metabolite [145]. Die Bioverfügbarkeit der einzelnen Substanzen variiert zwischen >60% bis 11% und die Zeit bis zum Eintritt des Wirkungsmaximums liegt zwischen 1 – 8 Stunden. Bei den meisten ACE-Hemmen erfolgt die Elimination vorwiegend durch die Niere, so dass bei Niereninsuffizienz ggf. eine Dosisanpassung erfolgen muss. Entsprechend ihren Halbwertszeiten reicht die Dosierung von ein- bis dreimal täglich [46].

Zu den gruppenspezifischen Nebenwirkungen der ACE-Hemmer gehören Reizhusten, Hyperkaliämie, orthostatische Hypotension, angioneurotische Ödeme sowie Nierenfunktionsstörungen. Darüber hinaus können Blutbildveränderungen, Magen-Darm-Störungen, Exantheme und Geschmacksstörungen als unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Bei Patienten mit Nierenarterienstenose können sie eine funktionelle Niereninsuffizienz [78, 108] und beim Neugeborenen über eine Verminderung der Durchblutung der uteroplazentaren Einheit Anurie auslösen [146]. In der Schwangerschaft ist die Einnahme von ACE-Inhibitoren aufgrund einer potentiellen fötalen Schädigung kontraindiziert [142, 156].

Neben der Behandlung der arteriellen Hypertonie werden ACE-Inhibitoren in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz sowie bei Patienten mit eingeschränkter Ventrikelfunktion nach Myokardinfarkt, hohem kardiovaskulären Risiko und diabetischer und nicht-diabetischer Nephropathie eingesetzt. Die nephroprotektiven Wirkungen der ACE-Hemmer wurden in verschiedenen Studien nachgewiesen [108, 168]. An Patienten mit Typ 2-Diabetes konnte gezeigt werden, dass Ramipril die Entwicklung der diabetischen Nephropathie verringert [57, 75]. In der Therapie der Herzinsuffizienz sind die ACE-Hemmer aufgrund der Ergebnisse verschiedener klinischer Endpunktstudien als Standardtherapie etabliert [164]. Der Nutzen einer Behandlung mit ACE-Hemmern bei Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko und nach Myokardinfarkt konnte ebenfalls belegt werden [5, 15, 48, 58, 83, 134, 141, 196].

1.4.2 *AT₁-Rezeptorantagonisten*

Die Blockade von Ang II-Rezeptoren ist eine weitere pharmakologische Möglichkeit, mit dem RAS zu interferieren. Neben Losartan sind weitere sechs Vertreter dieser Gruppe u. a. auch Candesartan zugelassen. Chemisch leiten sich alle Sartane von einem Imidazol-Biphenyl-Gerüst ab [31]. Bezüglich der pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften unterscheiden sie sich nur geringfügig. Alle AT₁-Antagonisten zeichnen sich durch eine hohe Affinität und Selektivität für den AT₁-Rezeptor und geringe Affinität zum AT₂-Rezeptor aus und verfügen über eine hohe Plasmaeiweißbindung [32]. Die Wirkdauer der einzelnen Vertreter unterscheidet sich praktisch nicht und wird mit 24 Stunden angegeben, welche die Eliminationshalbwertszeiten meist deutlich übersteigt. Bis auf Telmisartan, welches fast ausschließlich über die Leber eliminiert wird, werden die Sartane nahezu jeweils zur Hälfte über Niere und Leber ausgeschieden [32].

AT₁-Antagonisten sind durch eine sehr gute Verträglichkeit gekennzeichnet. So tritt der unter ACE-Hemmern häufig beobachtete trockene Reizhusten fast nie auf [12, 100]. Einige Fälle von angioneurotischem Ödem sind nach Gabe von Losartan beobachtet worden [178]. Es gibt Hinweise, dass AT₁-Antagonisten ebenso wie ACE-Hemmer bei Patienten mit Nierenarterienstenose ein akutes Nierenversagen auslösen können [115]. Wie ACE-Hemmstoffe sind AT₁-Antagonisten während der Schwangerschaft kontraindiziert. Zahlreiche Studien haben die blutdrucksenkende Wirksamkeit der AT₁-Antagonisten untersucht und zusammenfassend gezeigt, dass die AT₁-Antagonisten mit anderen etablierten Antihypertensiva verglichen werden können [27, 47, 49, 61, 77, 124, 186, 198]. Auch bei der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz konnten für einige AT₁-Antagonisten günstige Effekte nachgewiesen werden [23, 135, 138, 139, 165]. Entsprechend den Ergebnissen großer Endpunktstudien kann durch eine ACE-Hemmertherapie die Gesamtmortalität nach Myokardinfarkt gesenkt werden [98]. Was die AT₁-Antagonisten betrifft, zeigte die kürzlich publizierte *OPTIMAAL-Studie* keine Überlegenheit von AT₁-Antagonisten gegenüber ACE-Hemmern bei der Sekundär-Prävention nach Herzinfarkt [30]. Die *VALIANT-Studie* ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Captopril und Valsartan bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt bezüglich des primären Endpunktes (Tod jeglicher Ursache) [136, 180]. Die klinische Wirksamkeit von AT₁-Antagonisten bei hohem kardiovaskulären Risiko wird gegenwärtig noch geprüft [176, 197]. In der *SCOPE-Studie* wurde das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen bei älteren Patienten mit milder Hypertonie untersucht. Unter Candesartan zeigte sich eine signifikant geringere Schlaganfallhäufigkeit, aber keine signifikanten

Unterschiede in der Gesamtzahl kardiovaskulärer Ereignisse [110]. Hinsichtlich nephroprotektiver Wirkungen der AT₁-Antagonisten liegen Daten aus Studien bei Typ 2-Diabetikern mit Mikroalbuminurie bzw. diabetischer Nephropathie vor [17, 109, 132]. Sowohl für Irbesartan als auch für Losartan konnte eine signifikante Progressionshemmung der diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden [17, 109].

Jüngere tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass der in dieser Dissertation untersuchte AT₁-Antagonist Candesartan sowohl periphere als auch AT₁-Rezeptoren im Gehirn blockieren kann [130] und auch in der Lage ist die zentralen Wirkungen von Ang II, z. B. bei der Blutdruckregulation und der Stressantwort, zu inhibieren [9, 157]. Einige Studien deuten daraufhin, dass die gleichzeitige Blockade von AT₁-Rezeptoren im Gehirn und peripher die Stressantwort günstig beeinflussen kann. Der Einsatz von AT₁-Rezeptoren unter Stress bzw. bei Stress-assoziierten Erkrankungen könnte eine weitere therapeutische Option darstellen [150].

1.4.3 Kombinationstherapie

Der Nachweis einer hochspezifischen humanen Chymase die Ang II unabhängig vom ACE synthetisieren kann [177] verbunden mit der Tatsache, dass ACE-Hemmer nicht in der Lage sind, Plasma-Ang II-Spiegel kontinuierlich über 24 Stunden abzusenken [121], sowie die Steigerung der Bradykinin-Spiegel als möglicher zusätzlicher therapeutischer Nutzen der ACE-Hemmer [194] liefern eine Rationale für die vollständigere Hemmung des RAS durch Kombination der verschiedenen Wirkprinzipien von AT₁-Antagonist und ACE-Inhibitor. Einige Studien untersuchten die Kombination von ACE-Hemmer und AT₁-Antagonist u.a. bei arterieller Hypertonie, chronischer Herzinsuffizienz und Nierenerkrankungen [7, 23, 45, 73, 76, 117, 118, 136, 143, 147, 176, 197]. Die Ergebnisse sind zum Teil kontrovers, zeigen aber, dass unter bestimmten Umständen eine Kombinationstherapie mit einem AT₁-Antagonisten zusätzlich zum ACE-Hemmer sinnvoll sein kann.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

In jüngerer Zeit geht man davon aus, dass Ang II an der Aktivierung der HPA-Achse durch Stress beteiligt ist. Hinweise hierfür liefern u. a. das Vorkommen von Ang II-Rezeptoren innerhalb der HPA-Achse sowie eine veränderte Ang II-Rezeptorexpression und gesteigerte Ang II-Synthese unter Stress. Ang II übt darüber hinaus direkte Effekte auf die Nebennierenfunktion bei Stress aus.

Mit den Ang II-Rezeptorantagonisten und ACE-Inhibitoren stehen Medikamente zur Verfügung die an unterschiedlichen Stellen in das RAS eingreifen, wobei noch unzureichend geklärt ist, ob durch die Kombination beider Wirkprinzipien eine vollständigere Hemmung des RAS erreicht werden kann. Die vorliegende Arbeit untersuchte die mRNA Expression von AT_{1A} -, AT_{1B} - und AT_2 - Rezeptorsubtypen auf der HPA-Achse von SHR unter antihypertensiver Medikation mit einem ACE-Hemmer versus Ang II-Rezeptorantagonisten bzw. einer Kombination im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Es ergaben sich folgende Fragestellungen und Ziele, die als Grundlage dieser Promotion dienen.

- 1. Nachweis von AT_{1A} -, AT_{1B} - und AT_2 -Rezeptor-mRNA.*
- 2. Welchen Einfluss hat eine 3 monatige Behandlung mit ACE-Hemmern, AT_1 -Antagonisten bzw. einer Kombination beider Pharmaka auf die Expression von Angiotensin-Rezeptoren innerhalb der HPA-Achse bei stressempfindlichen SHR.*

2 Materialien

2.1 Gewebe

Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere aus Charles River, Sulzberg
Spontan hypertensiven Ratten (SHR)

2.2 Geräte

Autoklav

Eismaschine

SCOTMAN, AF10

Elektrophorese-Gerät

BIO-RAD, Power-Pac 300

Gelelektrophorese-Kammer

BIO-RAD, SUB-CELL* GT

Homogenisator:

Rotor-Stator-Homogenisierer:

IKA*-Werke/Staufen im Breisgau:

-Ultra-Turrax T8

-Ultra-Turrax mit Ständer

Kamera mit UV-Tisch und
PC-Anschluss

PHASE 312 nm, Lübeck

Kryostat

LEICA CM3050

Küvetten

Kühl- und Gefriergeräte

Bosch

Mikrowelle

Milli-Q Water-System

Millipore

Miniofen

Biometra OV2

Pinzette

FST, Heidelberg

Pipetten

Firma Eppendorf AG, Hamburg

Reaktionsgefäßständer

Spektralphotometer

Beckmann DU-600

Vortex-Mischer

REAX top, Heidolph

Waage

MC1 Laboratory LC 220S, Sartorius

Zentrifugen	1) Centrifuge 5415 D, Eppendorf 2) Minifuge RF, Heraeus SEPATECH
-------------	---

2.2.1 PCR-Geräte

Thermocycler:

UNO-Thermoblock	Whatman Biometra, Göttingen
TGradient Thermocycler	Whatman Biometra, Göttingen

2.3 Substanzen

Agarose	Agarose 1	Amresco, Ohio/USA
β-Mercaptoethanol		Sigma, Deisenhofen
Chloroform		Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)		Sigma, Deisenhofen
DNase1, RNase-free	RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
dNTP-Mix, 10mM	Reverse Transcription System (Kit)	Promega, Madison/USA
<u>Enzyme für die RT-PCR:</u>		
- AMV Reverse Transcriptase, High Concentrate	Reverse Transcription System (Kit)	Promega, Madison/USA
- DyNAzyme II DNA Polymerase		FINNZYMES, Espoo/ Finnland
Ethanol		Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Ethidium Bromide Solution 10 mg/ml	BIO-RAD
Glycerin		Sigma, Deisenhofen
Größenmarker Biorad		BIO-RAD

MgCl ₂ , 25mM	Reverse Transcription System (Kit)	Promega, Madison/USA
Nuclease-Free Water	Reverse Transcription System (Kit)	Promega, Madison/USA
<u>Primer:</u>		
R-B-ACTIN 1461 SENSE	GIBCO BRL Custom Primers Dr. rer. nat. Olaf Jöhren	GIBCO BRL
R-B-ACTIN 2304 ANTISENSE	GIBCO BRL Custom Primers Dr. rer. nat. Olaf Jöhren	GIBCO BRL
R-AT _{1A} 1028 ANTISENSE	GIBCO BRL Custom Primers Dr. rer. nat. Olaf Jöhren	GIBCO BRL
R-AT _{1A} 723 SENSE	GIBCO BRL Custom Primers Dr. rer. nat. Olaf Jöhren	GIBCO BRL
R-AT ₂ 905 ANTISENSE	GIBCO BRL Custom Primers Dr. rer. nat. Olaf Jöhren	GIBCO BRL
R-AT ₂ 657 SENSE	GIBCO BRL Custom Primers Dr. rer. nat. Olaf Jöhren	GIBCO BRL
<u>Puffersubstanzen zur RNA Extraktion:</u>		
Buffer RDD	RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
Buffer RLT	RNeasy Mini- u. RNeasy Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Buffer RLC	RNeasy Mini- u. RNeasy Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Buffer RPE	RNeasy Mini- u. RNeasy Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
REACT 3 Puffer		GIBCO BRL
Recombinant RNasin	Reverse Transcription System (Kit)	Promega, Madison/USA
Restriktionsenzym EcoR I		GIBCO BRL
Reverse Transcription 10X Buffer	Reverse Transcription System (Kit)	Promega, Madison/USA
Ribonuclease Inhibitor	Reverse Transcription System (Kit)	Promega, Madison/USA
RNase-free Water	RNeasy Mini- u. RNeasy Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Tris-Acetat-EDTA-Puffer 10X (TAE-Puffer)		

Trockeneis	Apotheke des Klinikums der Universität Lübeck
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

2.4 Einmalmaterial

Extraktionssäulen für die RNA-Isolierung:

1. RNeasy Mini Spin Columns	RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
2. RNeasy Midi Spin Columns, sitting in 15ml Tubes	RNeasy Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

Falcon-Tubes

Pipettenspitzen

Plastikpipetten

Pipettboy

Reaktionsgefäße:

- PCR-Tubes (0,2ml)

Sammelgefäße :

- Collection Tubes (1.5ml)	RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
- Collection Tubes (2ml)	RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
- Collection Tubes (15ml)	RNeasy Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

Skalpell

2.5 Lösungen

Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser:

Für die Herstellung von 1 Liter 1%igem DEPC-Wasser benötigt man 1 ml Diethylpyrocarbonat und 1 Liter Aqua dest..

Unter dem Abzug wird Diethylpyrocarbonat zum Aqua dest. gegeben und durch kräftiges Schütteln in einer Flasche vermischt. Durch vorsichtiges Öffnen der Flasche, wird durch Mischvorgang entstandener Druck, abgelassen. Die halbgeöffnete Flasche bleibt für ca. zwölf Stunden unter dem Abzug stehen und wird anschließend bei 120°C im Heißluftsterilisator autoklaviert.

TAE-Puffer, verdünnt:

TAE-Puffer 10X wird im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Gel-loading-buffer :

Der Gel-loading-buffer (1 ml) enthält folgende Substanzen:

- 100 µl 2,5% Xylene Cyanol FF
- 300 µl Glycerin 99,5 %
- 600 µl TAE-Puffer 10X

Farbstoff Xylene Cyanol FF und Glycerin werden vermischt und mit TAE-Puffer aufgefüllt. Der Ladepuffer wurde bei ca. 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.6 Software

GraphPad Software, Grubbs' test	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Scion Image for Windows	2000 Scion Corporation, Frederick, USA
GraphPad Prism Version 3.00, Mar 25, 1999	GraphPad Software Inc., San Diego, USA

3 Methoden

3.1 Isolierung von RNA aus tierischem Gewebe

3.1.1 Gewebematerial

Die Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) erfolgte aus Hypothalami, Hypophysen und Nebennieren von SHR. Die Tiere waren in einer vorangegangenen Studie mit equieffektiven Dosierungen, hinsichtlich der Blutdruckregulation, von Ramipril (1 mg/kg/d), Candesartan (2,5 mg/kg/d), und einer Kombination aus Candesartan (0,45 mg/kg/d) und Ramipril (0,15 mg/kg/d) für drei Monate behandelt worden. Parallel dazu war eine Kontrollgruppe von SHR über den gleichen Zeitraum lediglich mit der Trägersubstanz der Medikamente (Gummi arabicum-Lösung) behandelt worden. In jeder der vier Behandlungsgruppen betrug die Gruppengröße 15 Tiere.

Zu Beginn dieser Versuche, lagen die Nebennieren und Hypophysen bereits als kompakte Organe vor. Die Hypothalami wurden in einem eigenen Arbeitsschritt aus dem Rattenhirn präpariert. Alle Organe waren bis zur RNA-Extraktion bei -80°C gelagert. Die Gewebe wurden an den Versuchstagen aus der Gefriertruhe entnommen und unter Vermeidung des Tauvorgangs direkt auf Trockeneis gelagert. Die Entnahme der Hypothalami erfolgte am tiefgefrorenen Gehirn. Dazu wurden die Gehirne im Kryostaten gelagert und der Hypothalamus jeweils als kleiner Gewebekblock mit Hilfe eines Einmalskalpells herauspräpariert. Direkt im Anschluss erfolgte die RNA-Isolation.

3.1.2 Gewebevorbereitung

Für die RNA-Extraktion wurden die RNeasy Mini- und RNeasy Midi Kits der Firma QIAGEN verwendet. Die Isolierung erfolgte anhand der Arbeitsprotokolle der den Kits beiliegenden Handbüchern (März und Mai 1999), mit teilweiser Modifikation.

3.1.2.1 Nebenniere und Hypophyse

Die Nebennieren und Hypophysen wurden im RNeasy Mini Kit eingesetzt. Die Menge an Gewebe betrug für jede Probe zwischen 20 und 30 mg. Zunächst wurden Nebennieren und Hypophysen vom Trockeneis in je ein Plastikgefäß überführt. RLT-Puffer, ein Guanidinium Isothiocyanat enthaltender Lysepuffer wurde mit β -Mercaptoethanol 1:100 vermischt. Zu den Gewebeproben wurden nun jeweils 600 μ l dieses Lysepuffers gegeben und mit dem Rotor-Stator-Homogenisierer für jeweils genau 90 Sekunden homogenisiert.

Dieser Arbeitsschritt ermöglichte simultan Zellaufschluss und Gewebehomogenisierung. Anschließend wurde das Gewebehomogenisat bei maximaler Geschwindigkeit für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß pipettiert. Zum Überstand wurde nun 600 µl 70 % Ethanol hinzugefügt und dieser beim Pipettieren mit dem klaren Überstand vermischt.

3.1.2.2 Hypothalamus

Die Hypothalami wurden im RNeasy Midi Kit eingesetzt. Die Gewebemenge betrug zwischen 130 und 250 mg pro Probe. Jedes Gewebepreparat wurde aus dem Kryostaten in ein Falcon Plastikgefäß gebracht und mit 3,8 ml Guanidinium Isothiocyanat-haltigem RLT-Puffer, der 10 µl β-Mercaptoethanol auf 1 ml enthielt, versetzt. Dann wurden die Proben für 90 Sekunden mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenisat wurde danach für fünf Minuten bei 3000-5000 x g zentrifugiert. Nachfolgend wurde zu jeder Probe mit einer Glaspipette 1,9 ml Chloroform gegeben, jedes Gemisch eine Minute mit dem Vortex-Mischer REAX top gemischt und anschließend zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde dann in ein neues Gefäß pipettiert und mit je 3,8 ml 70 % Ethanol versetzt und eine Minute zentrifugiert.

3.1.3 RNA-Extraktion

Die Gewinnung von RNA aus den vorbereiteten Proben, erfolgte mit speziellen Extraktionssäulen, RNeasy Mini- und RNeasy Midi spin columns, die die RNA binden. Sie besitzen, wie der Hersteller im Handbuch schreibt, eine silica-gel-based Membran. Ein dem Kit beiliegendes Puffersystem, bestehend aus drei verschiedenen Puffern, ermöglichte das Binden von RNA mit mehr als 200 Basenpaaren (bp).

3.1.3.1 Nebenniere und Hypophyse

Die Proben wurden in zwei Schritten auf die Extraktionssäulen pipettiert. Nach jedem Schritt wurde 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wurde bei den Hypophysen je 350 µl, bei den Nebennieren je 700 µl des Puffer RW1 auf die Säulen gegeben, die Säulen wiederum 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert und der Durchfluss entfernt. Um bei der Gewinnung von RNA eine Kontamination mit DNA zu vermeiden, wurde während der RNA-Extraktion aus den Hypophysen ein DNA-Verdau mit DNase zwischengeschaltet. Es wurde das RNase-free DNase Set der Firma QIAGEN verwendet und nach der dazugehörigen Anleitung verfahren. Zunächst wurde das

Verdauungsenzym (DNase) mit Puffer RDD im Verhältnis 1:8 verdünnt und vorsichtig durch Schwenken gemischt. Danach wurde je 80 µl dieses Gemisches auf jede Extraktionssäule pipettiert. Dabei war wichtig, dass die Mischung direkt auf die Membran der Säulen gegeben wurde, um einen kompletten DNA-Verdau zu erreichen. Nach diesem Pipettierschritt wurden die Säulen mit den Proben im Miniofen Biometra OV2 bei 25°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 350 µl Puffer RW1 auf die Extraktionssäulen pipettiert, 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach dem DNA-Verdau wurde mit der Extraktion fortgefahren. Auf die Säulen wurde nun jeweils 500 µl Puffer RPE gegeben. Da dieser Puffer als Konzentrat vorlag, mussten ihm erst 4 Volumenanteile 96 % Ethanol zugefügt werden. Nach Zugabe des RPE-Puffers wurde erneut für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Es wurden dann eine weitere 500 µl RPE-Puffer auf die Säulenmembran aufgetragen und ein Zentrifugationsschritt über zwei Minuten angeschlossen. Schließlich wurden die Extraktionssäulen in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und es wurde je 50 µl RNase-free water auf die Membran der Säulen pipettiert. Eine Wartezeit von fünf Minuten schloss sich an, bevor die RNA eluiert wurde. Der Elutionsschritt bestand aus einer Zentrifugation über eine Minute. Danach befand sich die RNA im 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Bei jeder Probe erfolgte eine Elution.

3.1.3.2 Hypothalamus

Die Proben wurden auf die RNeasy Midi spin columns (Extraktionssäulen) aufgetragen. Da das Probenvolumen die Mengenkapazität der Säulen überschritt, erfolgte auch hier die Auftragung in zwei Schritten. Hierbei wurde nach jedem Auftragungsvorgang fünf Minuten bei 4000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Folgenden wurde 3,8 ml Puffer RW1 auf jede Säule pipettiert und fünf Minuten bei 4000 x g zentrifugiert und der Durchfluss entfernt. Anschließend wurde zweimal 2,5 ml Puffer RPE auf jede Membran der Extraktionssäulen gegeben und nach der ersten Zugabe für zwei und bei der zweiten Zugabe für fünf Minuten bei 4000 x g zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde nach Zugabe von jeweils 150 µl RNase-free water auf die Säulenmembran und erneuter Zentrifugation die RNA eluiert.

3.1.4 RNA-Aufreinigung

Die aus dem Hypothalamus gewonnene RNA wurde, nach einer ersten spektralphotometrischen Messung, mit dem RNeasy Mini Kit, nach dem RNeasy Mini Protokoll für RNA Cleanup, aufgereinigt. Dabei wurde gleichzeitig eine Behandlung mit

DNase durchgeführt, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Es wurden 100 µl RNA aus jeder Probe eingesetzt. 350 µl Puffer RPE wurden jeweils dazugegeben und vorsichtig gemischt. Nun wurde 250 µl 96 % Ethanol zu jeder Probe pipettiert und beim Pipettieren vermengt. Anschließend wurde dieses Gemisch auf RNeasy Mini spin columns aufgetragen und die Säulen für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurde mit dem DNase-Verdau fortgefahren. Die DNase wurde im Verhältnis 1:8 mit Puffer RDD verdünnt und jeweils 80 µl der Verdünnung wurden auf die Säulen pipettiert. Danach schloss sich eine 15minütige Inkubationszeit bei 25°C im Miniofen Biometra OV2 an. Nach Ablauf dieser Zeit wurde 350 µl Puffer RW1 auf die Extraktionssäulen gegeben und 15 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert und die Säule in ein neues 2ml-Sammelgefäß gebracht. Dann folgte die Zugabe von je 500 µl Puffer RPE und eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 x g. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei diesmal zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zur Trocknung der Säulenmembran zentrifugiert wurde. Abschließend wurden jeweils 30 µl RNase-free water auf die Säulenmembran pipettiert, fünf Minuten gewartet und eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert zur Elution der aufgereinigten RNA. Die isolierte RNA aller drei Gewebe wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

3.2 Nachweis von DNA-Kontamination

Um eine Kontamination mit DNA in der gewonnenen Nebenieren-RNA auszuschließen, wurde in einer Stichprobe bei einer Probe eine PCR einmal mit und einmal ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Dabei fand sich keine DNA-Verunreinigung.

3.3 Spektralphotometrische RNA-Messung

Die Konzentration und Reinheit extrahierter RNA wurde mit dem Spektralphotometer Beckmann DU 600 gemessen. Das Photometer war mit einem Computer mit spezieller Software zur spektralphotometrischen Nukleinsäuremessung verbunden.

3.3.1 Verdünnung der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben der drei Gewebearten wurde die eluierte RNA mit DEPC-Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt.

3.3.2 Photometrische Messung

Die verdünnte RNA umfasste pro Probe ein Volumen von 100 µl. Dieses Volumen wurde in eine Küvette pipettiert und diese im Küvettenhalter des Photometers platziert. Es wurde die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen und durch Errechnung der Ratio der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm die Reinheit der RNA abgeschätzt. Reine RNA hat eine Ratio von 1.8-2.1. Alle gemessenen Proben konnten in die Auswertung Eingang finden.

3.3.3 Berechnung der Konzentration und Menge extrahierter RNA

Die Konzentration und Menge der RNA berechnete sich folgendermaßen (RNeasy Mini Handbook 05/99; Appendix B):

Beispiel (Probe CR 8, Nebenniere):

Probenvolumen in der Küvette: 100 µl
RNA-Verdünnung: 5 µl RNA + 95 µl DEPC-H₂O
Messung der Absorption bei 260 nm: Net Abs 260.0 nm (A₂₆₀): 1.1727

Bei einer Messung in Wasser entsprach ein A₂₆₀ Wert von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

Während der Berechnung der RNA-Konzentration der Originalprobe musste der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

Daher ergab sich folgende Rechenoperation: $40 \mu\text{g/ml} * A_{260} * \text{Verdünnungsfaktor}$
 $= 40 \mu\text{g/ml} * 1.1727 * 20$
 $= 938,16 \mu\text{g/ml}$

Absolute Menge an RNA = Konzentration * Probenvolumen:
 $= 938,16 \mu\text{g/ml} * 0,1 \text{ ml}$
 $= 93,816 \mu\text{g}$

3.4 RT-Polymerasekettenreaktion

Die RT-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist eine Methode, bei der RNA in einem ersten Schritt in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Diesen Vorgang nennt man Reverse Transkription (RT). Im Folgenden werden Zielsequenzen der so synthetisierten cDNA in einer PCR (PCR) amplifiziert, und können dann in nachfolgenden Versuchen sichtbar gemacht werden. Für die RT-PCR wurde das Reverse Transcription

System der Firma Promega verwendet und modifiziert nach dem Arbeitsprotokoll des Kits (12/98) vorgegangen.

3.4.1 Reverse Transkription

3.4.1.1 Reaktionskomponenten

Tabelle 3.1: Beispiel: Probe K5, Nebenniere

A) Parameter:

eingesetzte MgCl ₂ -Konzentration (mM)	25,00
eingesetzte dNTP-mix Konzentration (mM)	10,00
mRNA-Ausgangskonzentration (µg/ml)	980,50
erzielte MgCl ₂ -Konzentration (mM)	5,00
Zielvolumen (µl)	20,00

B) Reaktionsansatz: eingesetzte Mengen

MgCl ₂	4,00 µl
RT 10x buffer	2,00 µl
dNTP-Mix	2,00 µl
Rnasin Ribonuclease Inhibitor	0,50 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,75 µl
Oligo(dt)15 Primer (0,5 µg/µl)	1,00 µl
mRNA-Ausgangslösung (1 µg)	1,02 µl
H ₂ O	8,73 µl
Summe	20,00 µl

3.4.1.2 Berechnungen

Vor Beginn des Versuchs wurde für jede RNA-Probe der drei Gewebetypen (insgesamt 180 Proben) berechnet, wie viel RNA (in µl) eingesetzt werden muss, damit man auf eine Menge von 1µg RNA pro Reaktionsansatz kommt.

Beispiel: Probe K5, Nebenniere

RNA-Konzentration: 980,5 µg/ml = 980,5 µg/ 1000 µl

Rechnung:

$$x = 1 \mu\text{g}$$

$$1000 \mu\text{l} = 980,5 \mu\text{g}$$

$$x = 1000 \mu\text{l} * 1 \mu\text{g} / 980,5 \mu\text{g}$$

$$\underline{x = 1,02 \mu\text{l}}$$

Die anderen Reaktionskomponenten wurden in fixer Menge zum Ansatz gegeben und mit H₂O wurde das Reaktionsvolumen auf 20 µl ergänzt.

3.4.1.3 Arbeitsprotokoll

Zunächst wurde die RNA auf Eis aufgetaut. Damit sollte ein Zerfall der instabilen RNA vermieden werden. Die RNA jeder Probe wurde dann in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert und mit der entsprechenden Menge an Nuklease-Free Water (H₂O) auf ein Volumen von 9,75 µl gebracht. Die Reaktionsgefäße wurden in den TGradient Thermocycler gestellt und die Proben bei 70°C zehn Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die anderen Reagenzien ebenfalls auf Eis aufgetaut und anschließend ein Pool für die folgende Reaktion pipettiert. Die Mengen der einzelnen Komponenten wurden für 65 Proben bestimmt (Tab. 3.2), da es beim Pipettieren bekanntermaßen zu einem Verlust an Volumen, u. a. durch Haften von Flüssigkeit in der Pipettenspitze, kam. Der Pool wurde gründlich mit dem REAX-top Vortex-Mischer gemischt.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Reaktionspools für die RT-Reaktion

Komponenten für 65 Proben	Rechnung	Produkt
MgCl ₂	4,00 µl * 65	260 µl
RT 10x buffer	2,00 µl * 65	130 µl
dNTP-Mix	2,00 µl * 65	130 µl
Rnasin Ribonuclease Inhibitor	0,50 µl * 65	32,5 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,75 µl * 65	48,75 µl
Oligo(dt)15 Primer (0,5 µg/µl)	1,00 µl * 65	65 µl
Summe	10,25 µl * 65	666,25 µl

Nach der zehnminütigen Inkubationszeit wurde in jedes Reaktionsgefäß 10,25 µl des Pool-Gemisches gegeben. Danach wurde die Reaktion im TGradient Thermocycler fortgesetzt: Zuerst bei 42°C für 15 Minuten, danach wurden die Reaktionsgefäße für fünf Minuten auf 99°C erhitzt und abschließend fünf Minuten auf 1°C abgekühlt. Die fertige cDNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.4.2 PCR

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, bei der es zu einer DNA-Vervielfältigung kommt. Die Stränge der Ziel-DNA werden durch Erhitzen getrennt und anschließend die Reaktion abgekühlt, damit sich die Primer, in Form von Oligonukleotiden, spezifisch an die

Zielsequenz anlagern können. Eine DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynucleotid-Triphosphaten (dNTPs) die Primer. So entstehen Kopien der jeweiligen Zielregion. Dieser Zyklus wird 20-40mal wiederholt.

PCR-Komponenten

- first-strand cDNA (von RT-Reaktion)
- dNTP-Mix (10 mM)
- MgCl₂ (25 mM)
- RT 10 X Puffer
- upstream Primer
- downstream Primer
- DyNAzyme II DNA-Polymerase (2 U/μl)
- Nuklease-Free Water (H₂O)

3.4.2.1 Optimierung der PCR

3.4.2.1.1 Optimierung der MgCl₂-Konzentration und Bindungstemperatur

Die Endkonzentrationen von MgCl₂ im Reaktionsansatz kann man über einen Bereich von 0,5-5,0 mM variieren, um die günstigsten Bedingungen für die PCR auszutesten. Die Mg²⁺-Ionen bilden zusammen mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist. Zusätzlich stimulieren sie die Aktivität der DNA-Polymerase und erhöhen die Schmelztemperatur des DNA-Doppelstrangs als auch der Bindung zwischen Primer und DNA. Gewöhnlich sind Konzentrationen von 1,0-1,5 mM MgCl₂ optimal. Eine unzureichende MgCl₂-Konzentration verringert die Ausbeute der PCR, während überschüssige Mg²⁺-Ionen die Akkumulation unspezifischer Amplifikations-Produkte fördern [125].

Ein wichtiger Bestandteil der PCR ist ein zyklischer Temperaturverlauf. Die Temperatur des ersten Schrittes beträgt gewöhnlich zwischen 95-100°C, er dient der Denaturierung der DNA. Im zweiten Schritt binden die Oligonukleotidprimer an die denaturierte DNA. Dazu wird die Temperatur auf Werte zwischen 40-60°C abgesenkt. Während des dritten Schrittes verlängert die hitzestabile DNA-Polymerase die Primer bei 72°C. Diese drei Schritte ergeben den PCR-Zyklus, der im Allgemeinen 20-40mal wiederholt wird (*Abb. 3.1*).

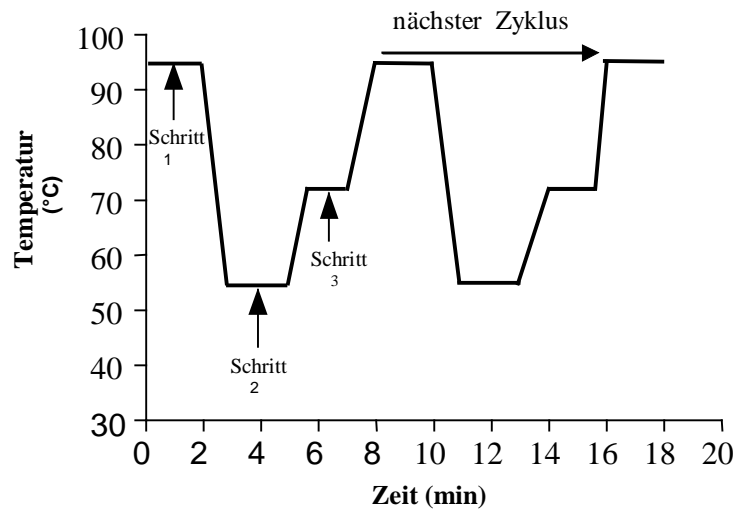


Abb. 3.1: Der zyklische Temperaturverlauf der PCR [125]

Die PCR für die beschriebenen Versuche wurde in einem sogenannten Thermocycler durchgeführt. Dieses Gerät sorgte bei entsprechender Programmierung für den zyklischen Temperaturwechsel mit den jeweiligen An- und Abkühlzeiten. Für den ersten Schritt (DNA-Denaturierung) wurde eine Temperatur von 95°C gewählt. Im dritten Schritt erfolgte bei 72°C die Primerverlängerung. Die Bindungstemperatur der PCR-Primer an die DNA-Matrize ist von der Länge der Primer und ihrem Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen abhängig. Sowohl die $MgCl_2$ -Konzentration als auch die Anlagerungstemperatur der drei verschiedenen Primerpaare wurden deshalb in einem Vorversuch optimiert. Für die Temperatur- und $MgCl_2$ -Optimierung wurde RNA aus Rattennebenieren verwendet, die nach oben beschriebener Vorgehensweise extrahiert wurde. In einer Reversen Transkription wurde aus dieser RNA cDNA synthetisiert, welche in den Optimierungsexperimenten eingesetzt wurde. Bei den Primerpaaren handelte es sich um die Primer R-AT_{1A} 723 SENSE und R-AT_{1A} 1028 ANTISENSE für die Angiotensin-II-Rezeptorsubtypen AT_{1A} und AT_{1B}, die Primer R-AT₂ 657 SENSE und R-AT₂ 905 ANTISENSE für den Angiotensin-II-Rezeptorsubtyp AT₂, sowie das Primerpaar R-B-Actin 1461 SENSE und R-B-Actin 2304 ANTISENSE für B-Actin als interner Standard. Diese Oligonukleotidprimer wurden auch in den Hauptversuchen benutzt. Es wurden sechs verschiedene $MgCl_2$ -Konzentrationen (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 mM) gewählt, die bei sechs verschiedenen Temperaturen (52,3, 53,3, 55,5, 56,5, 58,7, 59,6°C) für jedes Primerpaar getestet wurden. Hieraus ergab sich die Gesamtzahl von 108 Proben mit 36 Proben pro Primerpaar. Dabei wurde jedes Paar in einer eigenen PCR-Reaktion optimiert. Als erstes wurden für jede Reaktion sechs PCR-Ansätze mit den jeweiligen $MgCl_2$ -Konzentrationen

als Pool zusammengestellt. 5 µl RNA wurden parallel dazu in 36 200 µl Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurde 45 µl PCR-Ansatz in jedes Gefäß pipettiert, so dass jeweils sechs Reaktionsgefäße dieselbe MgCl₂-Konzentration enthielten. Im Thermocycler wurde ein Temperaturgradient eingestellt, der die oben aufgeführten Temperaturen enthielt. Die Gefäße wurden dann im Thermocycler so platziert, dass die PCR-Ansätze mit dem gleichen MgCl₂-Gehalt bei allen sechs Temperaturen amplifiziert wurden.

Tabelle 3.3: Beispiel: PCR-Ansatz bei 1,5 mM MgCl₂

Parameter

MgCl ₂ (mM)	1,5
Verdünnung first-strand cDNA (von RT-Reaktion)	1
Menge an first-strand cDNA (nach Verdünnung in µl)	5
dNTP-Mix (mM)	0,2
RT 10 X Puffer	1
AT _{1A} 723 SENSE (10 pmol/µl)	25
AT _{1A} 1028 ANTISENSE (10 pmol/µl)	25
DNA -Polymerase (2 U/µl)	1,25
Probegesamtvolumen (µl)	50
first-strand cDNA (µl)	5,00

Reaktionsansatz (Mengen in µl)

dNTP-Mix (10 mM)	0,50
MgCl ₂ (25 mM)	2,00
RT 10 X Puffer	4,50
AT _{1A} 723 SENSE (10 pmol/µl)	2,50
AT _{1A} 1028 ANTISENSE (10 pmol/µl)	2,50
DyNAzyme DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,63
H ₂ O (µl)	32,37
Summe	45,00

Zyklenzahl: 35

Die PCR wurde mit Ausnahme der unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen für alle 108 Proben unter denselben Bedingungen, wie in der Tabelle 3.3 aufgeführt durchgeführt.

3.4.2.1.2 Optimierung der Zyklusanzahl

Normalerweise läuft die PCR über 25-35 Zyklen. Dabei werden die Ziel-Sequenzen ab dem vierten Zyklus exponentiell vervielfältigt. Nach 20 PCR-Runden sollte sich die

gesuchte DNA 2^{20} fach vermehrt haben. Obwohl die Methode sehr effektiv ist, vermehren sich die gesuchten Sequenzen nicht permanent exponentiell, sondern verschiedene Faktoren verhindern eine exponentielle Amplifikation. Die Reaktion tritt dann in eine lineare Phase, das sogenannte Plateau, ein.

Häufig begrenzt die Menge an Enzym und die Abnahme der Enzymaktivität bei Überschuss an Ziel-DNA die Reaktion. Ein weiterer Faktor ist die Zahl der ursprünglich in der Probe vorhandenen Ziel-Sequenzen. Auch kommt es mit Zunahme der gewünschten DNA-Stränge zu deren Hybridisierung untereinander, wodurch die Anlagerung der Primer verhindert wird. Schließlich können unspezifische Amplifikationsprodukte mit den gewünschten Sequenzen konkurrieren und zum Eintritt in die stationäre Phase der PCR beitragen [125].

Um die Expression verschiedener Gentranskripte in Form von mRNA-levels mittels RT-PCR zu vergleichen ist es wichtig, dass die PCR-Reaktion das Plateau nicht erreicht. Jeder Versuch mRNA-levels zu quantifizieren muss daher in der exponentiellen Phase erfolgen. Die Zahl der PCR-Zyklen sollte folglich auf ein Minimum beschränkt bleiben.

In einem Vorversuch wurde die geeignete Zyklenzahl für alle drei Gewebearten ermittelt. Bei der Zyklusoptimierung wurde in der PCR-Reaktion die cDNA der Originalgewebe verwendet, welche auch bei den Hauptversuchen eingesetzt wurde. Die Optimierung wurde für alle drei zu untersuchenden Gewebetypen, Hypophyse, Nebenniere und Hypothalamus, und für die beiden Primerpaare des AT₁- und AT₂-Rezeptors durchgeführt. Die Bedingungen hinsichtlich Bindungstemperatur der Primer und MgCl₂-Konzentration ergaben sich aus der Temperatur- und MgCl₂-Optimierung (s.o.) und betragen 56°C und 1,5 mM MgCl₂. Es wurden elf Zyklusanzahlen, von 20 bis 40 Zyklen jeweils in Zwischenschritten gewählt. Infolgedessen wurden drei einheitliche PCR für die jeweiligen Gewebe mit je 22 Proben, elf Proben für jedes Primerpaar, ausgeführt.

3.4.2.1.2.1 Exemplarische Beschreibungen einer Reaktion

Anfänglich wurde bei jedem Gewebe ein cDNA-Pool hergestellt, wobei aus jeder der pro Gewebe vorhandenen 60 Proben (Ausnahme Hypothalamus: 48 Proben) 2 µl cDNA entnommen und in ein gemeinsames Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Dadurch sollten zufällige Fehler vermieden werden. Danach wurden zwei PCR-Ansätze als Pool mit den beiden Primerpaaren (modifiziert nach Tabelle 3.3 - Reaktionsansatz) erstellt. Nun wurde pro Probe 3 µl cDNA aus dem Pool entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Darauf wurde jeweils 47 µl Reaktionsansatz pipettiert, so dass immer elf der 22 Proben

dieselben Reaktionskomponenten enthielten. Die PCR-Gefäße für die Zyklenzahl 40 wurden in den Thermocycler *T-Gradient* gestellt und mit einer einprogrammierten Zyklenzahl von 40 gestartet. Nach zwei Runden wurden die nächsten zwei Gefäße (Zyklenzahl 38) in das Gerät überführt nach weiteren zwei Runden die nächsten zwei, usw. Dies wurde solange durchgeführt, bis sich alle 22 Reaktionsgefäße im Thermocycler befanden. Von hier ab gab es keine weiteren Veränderungen der PCR.

3.4.2.2 Hauptversuche

Nach Abschluss der PCR-Optimierung begannen die endgültigen Hauptversuche. Hierbei wurden die in den Vorversuchen als günstig ermittelten Parameter hinsichtlich Temperatur, MgCl₂-Konzentration und Zyklusanzahl berücksichtigt. Insgesamt erfolgten sieben PCR. Der Arbeitsablauf bestand darin, dass zunächst wie in den Vorversuchen die jeweilige cDNA vorgelegt und darauf ein Pool mit den Reaktionskomponenten pipettiert wurde. Für jede Probe wurden 3 µl cDNA und 47 µl Poolgemisch eingesetzt. Unterschiede für die einzelnen Gewebe sind im folgenden Teil aufgeführt.

3.4.2.2.1 Nebenniere

Es wurden drei PCR mit den Primerpaaren für die Rezeptoren AT₁ und AT₂ sowie den internen Standard β-Actin geplant und durchgeführt (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Arbeitsbedingungen

Primer	AT ₁	AT ₂	β-Actin
Temperatur	56°C	56°C	56°C
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
Zyklusanzahl	30 Zyklen	28 Zyklen	28 Zyklen

3.4.2.2.2 Hypophyse

Es wurden zwei PCR mit den Primerpaaren für den AT₁-Rezeptor und den internen Standard β-Actin gestartet (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5: Arbeitsbedingungen

Primer	AT ₁	β-Actin
Temperatur	56°C	56°C
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
Zyklusanzahl	28 Zyklen	28 Zyklen

3.4.2.2.3 Hypothalamus

Im Hypothalamus wurden AT₁-m-RNA-Rezeptor-Level bestimmt. Als interner Standard diente auch hier β -Actin (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Arbeitsbedingungen

Primer	AT ₁	β -Actin
Temperatur	56°C	56°C
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
Zyklusanzahl	35 Zyklen	28 Zyklen

Die DNA wurde nach Beendigung der Reaktionen bei -20°C gelagert.

3.5 Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten

Wie erwähnt unterscheidet man verschiedene Ang II-Rezeptorsubtypen. Es sind der AT₁-, AT₂- Rezeptortypen bekannt. Mit Hilfe von Klonierung und Bindungsstudien bei Nagetieren [3, 4] konnten zwei Subtypen des AT₁-Rezeptors identifiziert werden. Sie werden als AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor bezeichnet. Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann man DNA-Sequenzen unterscheiden die für den einen oder anderen Rezeptor kodieren. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die je nach Spezifität vier, sechs oder acht Basenpaare in einem DNA-Strang erkennen und schneiden. Dabei sind sie sehr präzise und schneiden nur ihre Zielsequenz.

3.5.1 Restriktionsverdau

In den dargestellten Versuchen wurden sowohl die m-RNA-Level des AT_{1A}- als auch die des AT_{1B}-Rezeptors ermittelt. Dazu wurde ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym EcoR I durchgeführt und das PCR-Fragment des AT_{1A}-Rezeptors aufgrund einer spezifischen Zielsequenz für das Enzym in zwei Fragmente geschnitten. Der AT_{1B}-Rezeptor blieb unverdaut.

Tabelle 3.7: Komponenten für den Restriktionsverdau

PCR-Fragment	DNA AT ₁
Restriktionsendonuklease	EcoR I
Puffersubstanz	REACT 3

3.5.1.1 Restriktionsverdau der PCR-Fragmente

Für die drei verwendeten Gewebearten wurde jeweils ein Restriktionsverdau mit je 60 Proben für Nebenniere und Hypophyse und 48 Proben für den Hypothalamus durchgeführt. Die Proben wurden, wie im Folgenden geschildert, behandelt.

Zunächst wurden pro Probe 16 μl DNA AT₁ in ein 200 μl Reaktionsgefäß vorgelegt. Dazu wurden 2 μl Restriktionsenzym EcoR I und 2 μl React 3 Puffer gegeben, so dass der Ansatz ein Volumen von 20 μl umfasste. Anschließend wurden die Proben gut mit dem Vortex-Mischer gemischt. Die Gefäße wurden dann in den Thermocycler UNO-Thermoblock gestellt und die Proben eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die so verdauten Proben bei -20°C tiefgefroren.

3.6 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode, mit der DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge voneinander getrennt und identifiziert werden können. Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, das im Gel Strukturen ähnlich denen eines Netzes bildet, durch die die DNA-Fragmente im elektrischen Feld ihrer Größe entsprechend wandern (Abb. 3.2). Ist die DNA ausreichend weit gelaufen, werden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Dazu wird das Gel mit einem intercalierenden Fluoreszenzfarbstoff angefärbt, wobei am häufigsten Ethidiumbromid verwendet wird, und anschließend unter UV-Licht betrachtet.

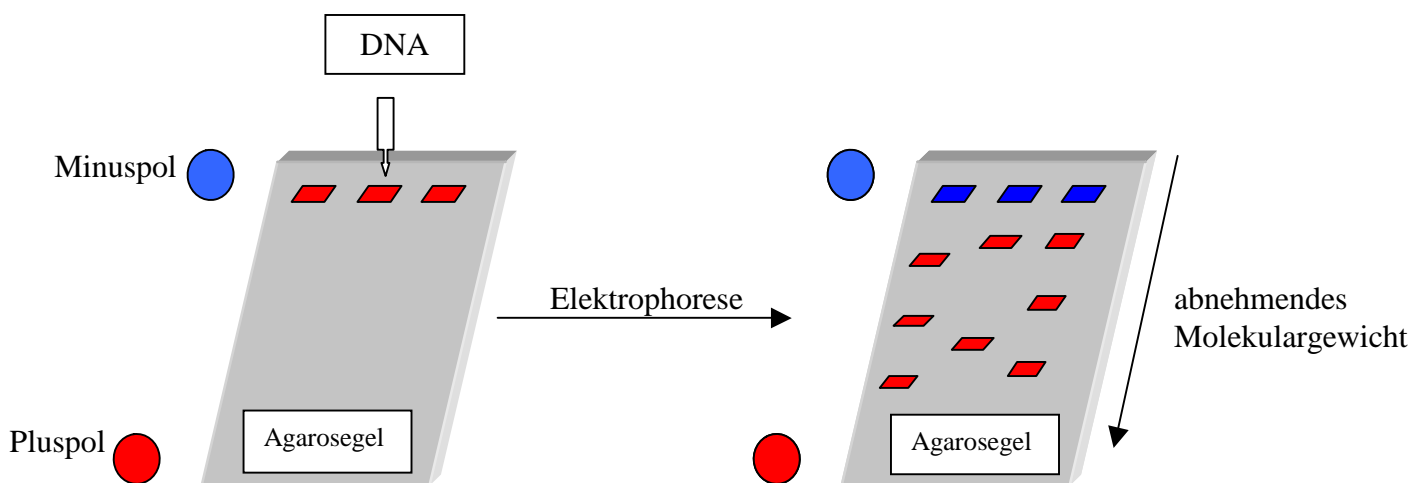


Abb. 3.2: Agarosegelelektrophorese [113]

3.6.1 Herstellung des Agarosegel

- Materialien:
- Agarose
 - TAE-Puffer (10 %)
 - Ethidiumbromid
 - Gelkammer (300 ml)
 - 3 Kämme für jeweils 20 Taschen

Für die Herstellung eines 2,5 % konzentrierten Agarosegels wurde zunächst 300 ml 1:10 verdünnter Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) in einem Messzylinder abgemessen und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Hierzu wurde 7,5 g Agarose gegeben und in der Mikrowelle erhitzt bis sie geschmolzen war. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Menge von 2 µl pro 100 ml (insgesamt 6 µl) dazugegeben und mit der geschmolzenen Agarose vermischt. In der Zwischenzeit wurde eine der Gelkammer unter dem Abzug auf einer ebenen Unterlage platziert und drei Kämme in die Kammer eingehängt. Die vorbereitete Agarose wurde in die Gelkammer gegossen und für ca. 30-45 Minuten abgekühlt. Das fertige Gel wurde mit der Kammer aus der Form gelöst, die Kämme wurden entfernt und die Gelkammer mit dem Agarosegel in das Elektrophorese-Gerät gebracht, welches mit 1:10 verdünntem TAE-Puffer gefüllt worden war. Nach Einlegen des Gels in das Gerät, wurde das Agarosegel noch mit verdünntem TAE-Puffer überflutet, so dass auch die Taschen vollständig mit Flüssigkeit ausgefüllt waren. Sowohl in den Haupt- als auch in den Vorversuchen wurde für jedes Organ sowie für den einzelnen Rezeptor bzw. internen Standard [AT₁ (mit AT_{1A} und AT_{1B}), AT₂ und β-Actin] ein eigenes Gel gegossen.

3.6.2 Probenvorbereitung

Um die DNA-Lösung auf das Gel aufzutragen ist es leichter, wenn man vorher etwas Probenpuffer (Gel-loading buffer) zugibt, der die Dichte erhöht, so dass die Lösung gut in die Geltasche sinkt. Der verwendete Probenpuffer bestand aus Glycerin, DEPC-Wasser und dem Farbstoff Xylencyanol, der dazu dient, verfolgen zu können, wo die DNA während des Auftragens und des Gellaufs verbleibt.

Die DNA-Proben aus den PCR-Reaktionen bzw. dem Restriktionsverdau wurden zunächst aufgetaut. Pro Probe wurden 3 µl Probenpuffer in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert. Darauf wurde im nächsten Schritt 15 µl DNA gegeben und beim Pipettieren vermischt. So vorbereitet wurden jeweils 15 µl der Proben in die Taschen des Gels aufgetragen. Bei den

Vorversuchen, der Temperatur- und $MgCl_2$ -Optimierung sowie der Zyklusoptimierung, wurde zur Identifikation der DNA-Fragmente ein Größenmarker im Gel aufgetragen. Dieser enthielt DNA-Fragmente in regelmäßigem Abstand, der Größe nach in bp geordnet. Zum Auftragen in die Geltaschen wurde der Marker ebenfalls mit Probenpuffer verdünnt. Dabei wurden jeweils 5 μ l Größenmarker und 2,5 μ l Gel-loading-buffer miteinander vermischt und das Gesamtvolumen von 7,5 μ l in eine Tasche pipettiert.

3.6.3 Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 10 V/cm gestartet, was bei einer Länge der Gelkammer von 19 cm eine Gesamtspannung von 190 V ergab. Die Stromstärke betrug 400 mA und die Laufzeit 30 Minuten. Nach dieser Zeit wurde das Agarosegel aus dem Gerät genommen und auf den UV-Tisch, PHASE 312 nm, mit Kamera-Aufsatz, zur Sichtbarmachung der DNA-Banden gelegt. Vom Gel wurden dann mit der Kamera, über einen PC-Anschluss mit speziellem Softwareprogramm, Aufnahmen gefertigt, die zur späteren Auswertung gespeichert wurden.

3.7 Analytische und statistische Methoden

3.7.1 Analytik

Zur Quantifizierung der AT_{1A} -, AT_{1B} - und AT_2 -Rezeptor-mRNA erfolgte im Anschluss an die Agarosegelelektrophorese die densitometrische Auswertung der Kameraaufnahmen der Gele mit Hilfe des Softwareprogramms Scion image for Windows (Scion Co). Die so gewonnenen Daten wurden zur statistischen Analyse gespeichert.

3.7.2 Statistik

Die Daten wurden zunächst mit Hilfe des Ausreißer-Tests nach Grubbs (GraphPad Software Inc., Grubbs' test) analysiert. Ermittelte Ausreißer wurden von den weiteren statistischen Berechnungen ausgeschlossen. Im Folgenden wurden die Daten mittels des Kolmogorov-Smirnov Test (GraphPad Software Inc.) auf eine Abweichung von der Normalverteilung überprüft, wobei für alle Daten eine Normalverteilung angenommen werden konnte. Die weitere statistische Evaluation erfolgte über eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) gefolgt von einem post hoc Test (Dunnet's Multiple Comparison Test) unter Benutzung der GraphPad Prism Software. Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden ab einem p-Wert von <0.05 als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Angiotensin II-Rezeptor-mRNA in Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere spontan hypertensiver Ratten

Im Anschluss an die Isolierung von RNA aus Nebennieren, Hypophysen und Hypothalami von SHR wurde mit Hilfe der RT-PCR eine Amplifizierung der cDNA-Sequenzen mit für den AT₁- und AT₂-Rezeptor spezifischen Primern und für den internen Standard β -Actin, einem so genannten housekeeping-Gen welches in allen eukaryoten Zellen vorkommt, durchgeführt. Ein Restriktionsverdau der amplifizierten AT₁-Rezeptor cDNA mit dem Restriktionsenzym EcoR I diente zur Differenzierung zwischen AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptorsubtypen. Zum Nachweis der Amplikons erfolgte eine Auftrennung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid. Die Größe der Amplikons für den AT₁- und AT₂-Rezeptor war bekannt, sie liegt bei 311 bp bzw. 249 bp.

4.1.1 Gewebeverteilung von Angiotensin-Rezeptorsubtypen

4.1.1.1 Hypothalamus

Im Hypothalamus konnte AT₁-Rezeptor-mRNA nachgewiesen werden. Durch Restriktionsanalyse konnten die AT₁-Rezeptorsubtypen AT_{1A} und AT_{1B} identifiziert werden. Es fand sich keine AT₂-Rezeptor-mRNA (*Abb. 4.1*).

4.1.1.2 Hypophyse

Es konnte AT₁-, AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA in der Hypophyse spontan hypertensiver Ratten nachgewiesen werden. Hingegen wurde keine AT₂-Rezeptor-mRNA entdeckt (*Abb. 4.2*).

4.1.1.3 Nebenniere

In Nebennieren spontan hypertensiver Ratten konnte mit Hilfe der Gelelektrophorese AT₁-, AT_{1A}-, AT_{1B}- und AT₂-Rezeptor-mRNA, sowie β -Actin-mRNA als Positivkontrolle nachgewiesen werden (*Abb. 4.3, 4.4, 4.5, 4.6*).

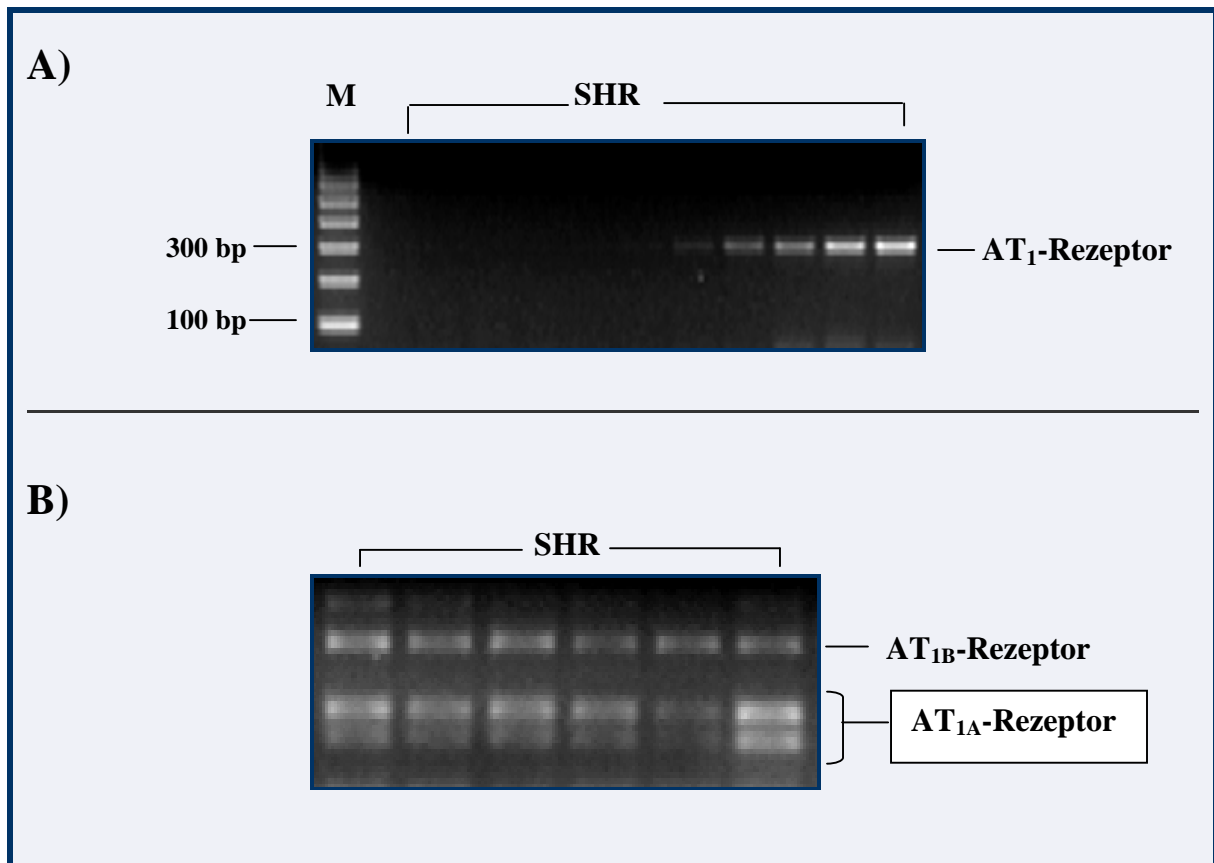


Abb. 4.1: RT-PCR. **A)** Amplifikation der AT₁-Rezeptor cDNA Fragmente bei verschiedenen Primer-Bindungstemperaturen. **B)** Nachweis der AT_{1B}- und AT_{1A}-Rezeptor-mRNA im Hypothalamus spontan hypertensiver Ratten. M= Größenmarker, SHR= spontan hypertensive Ratten.

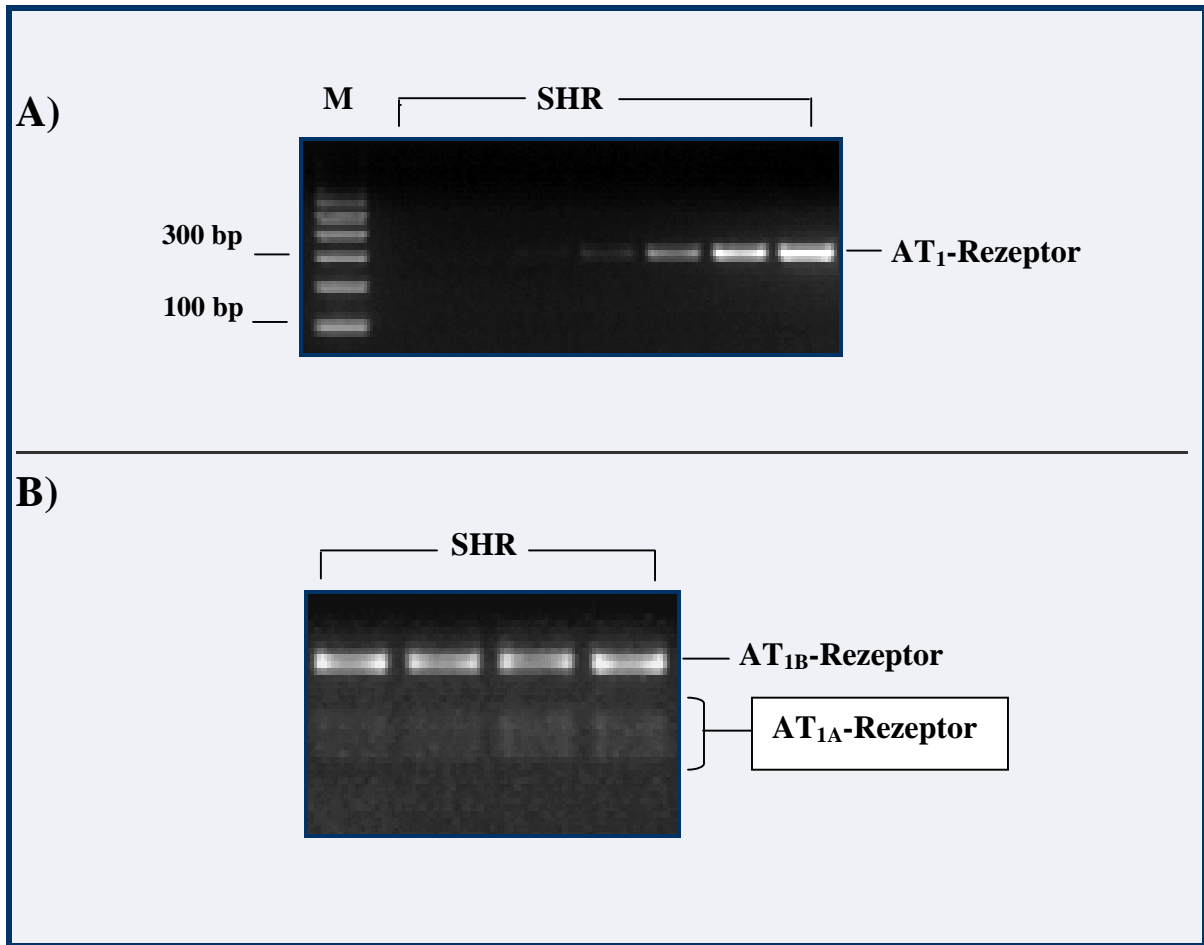


Abb. 4.2: RT-PCR. **A)** Amplifikation der AT₁-Rezeptor cDNA Fragmente bei verschiedenen Primer-Bindungstemperaturen. **B)** Nachweis der AT_{1B}- und AT_{1A}-Rezeptor-mRNA in der Hypophyse spontan hypertensiver Ratten. M= Größenmarker, SHR= spontan hypertensive Ratten.

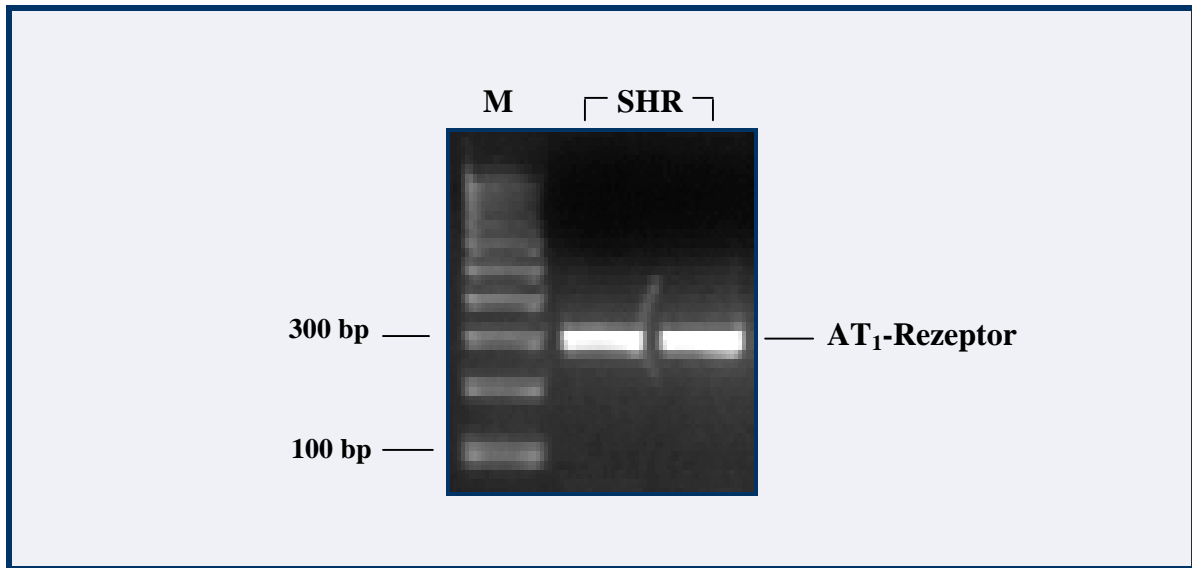


Abb. 4.3: RT-PCR. Nachweis von AT_1 -Rezeptor-mRNA in Nebennieren spontan hypertensiver Ratten. M= Größenmarker, SHR = Spontan hypertensive Ratten.

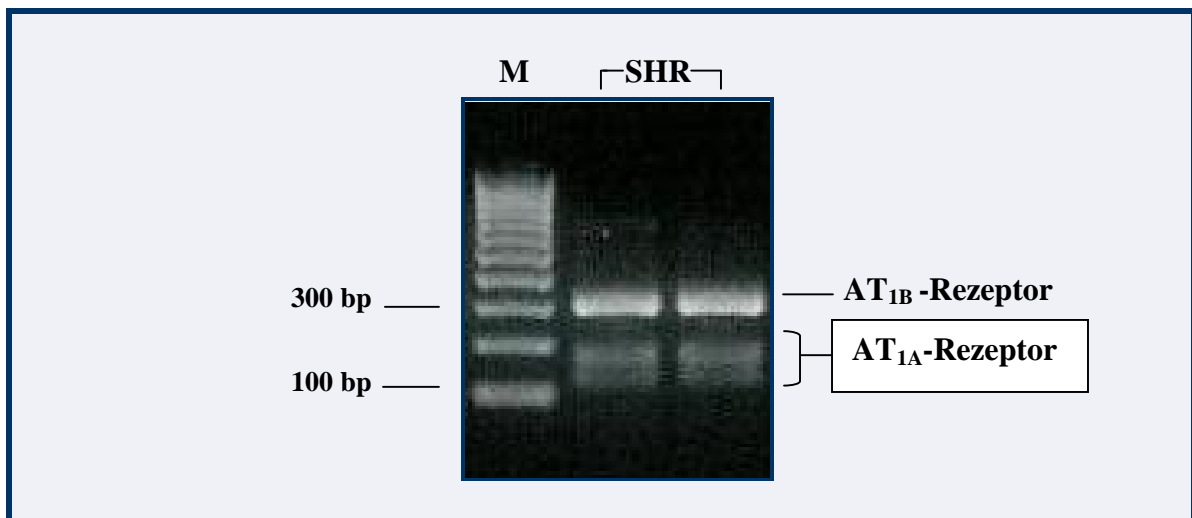


Abb. 4.4: RT-PCR. Nachweis von AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor-mRNA in Nebennieren spontan hypertensiver Ratten nach Restriktionsanalyse. Mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoR I* wurde die amplifizierte AT_{1A} -Rezeptor cDNA in zwei Fragmente geschnitten. Die Amplikons des AT_{1B} -Rezeptors blieben unverdaut. M= Größenmarker, SHR= spontan hypertensive Ratten.

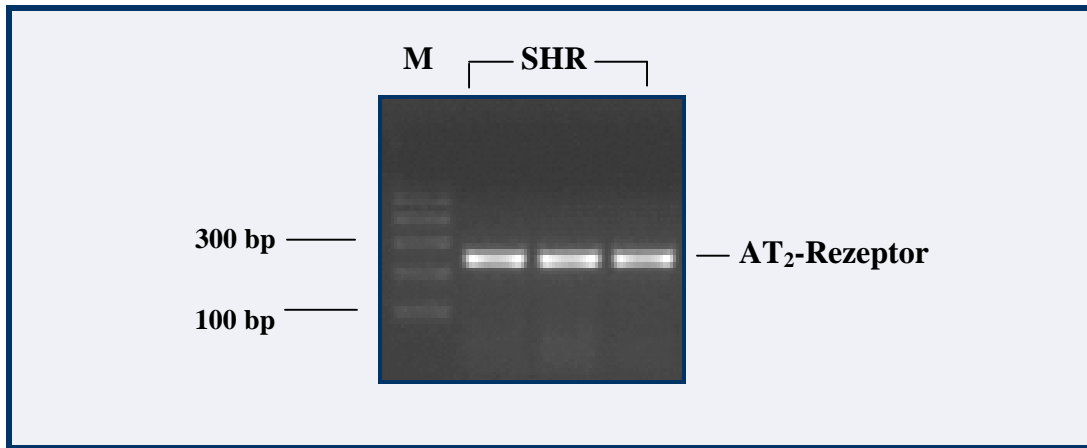


Abb. 4.5: RT-PCR. Nachweis von AT₂-Rezeptor-mRNA in Nebennieren spontan hypertensiver Ratten. M= Größenmarker, SHR= spontan hypertensive Ratten.

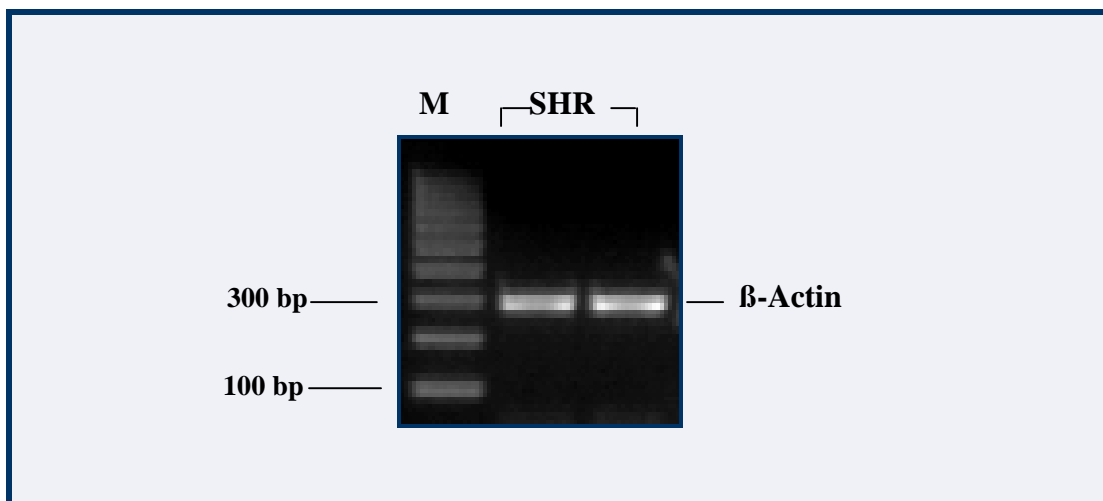


Abb. 4.6: RT-PCR. β-Actin als interner Standard. M= Größenmarker, SHR= spontan hypertensive Ratten.

4.2 Angiotensin-II-Rezeptor-mRNA-Level nach 3-monatiger Therapie mit Candesartan, Ramipril bzw. einer Kombination aus Candesartan und Ramipril

Für die quantitativen Messungen der Ang II-Rezeptor-mRNA-Level erfolgte zuvor eine Optimierung der Reaktionsbedingungen der RT-PCR um mögliche Faktoren, die die exponentielle Amplifizierung behindern könnten zu beseitigen. Die Ang II-Rezeptor-mRNA- und β -Actin-mRNA-Level wurden semiquantitativ im Anschluss an die RT-PCR und die Agarosegelelektrophorese durch densitometrische Auswertung mit dem Softwareprogramm Scion image for Windows (Scion Co) bestimmt. Die Expression der einzelnen Ang II-Rezeptoren wurde jeweils in Beziehung zu der von β -Actin gesetzt.

4.2.1 Organbezogene Expression der Angiotensin-Rezeptoren

4.2.1.1 Hypothalamus

Im Hypothalamus zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe. Unter der Behandlung mit Candesartan waren die ermittelten mRNA-Level sowohl für den AT_{1A}- als auch für den AT_{1B}-Rezeptor, wenn auch nicht signifikant, höher als unter Medikation mit Ramipril bzw. Candesartan/Ramipril und in der Kontrollgruppe (*Abb. 4.7 und 4.8*).

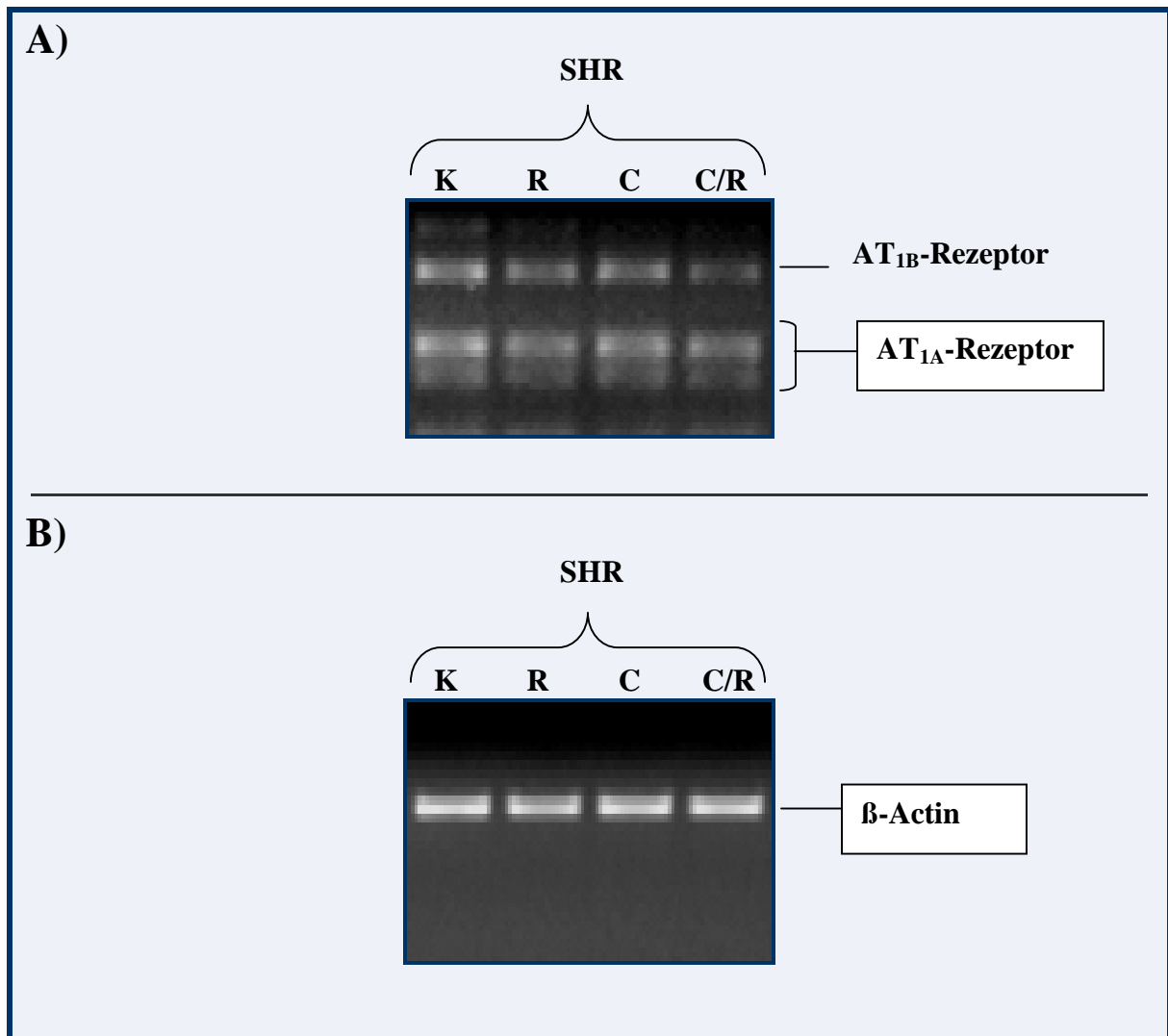
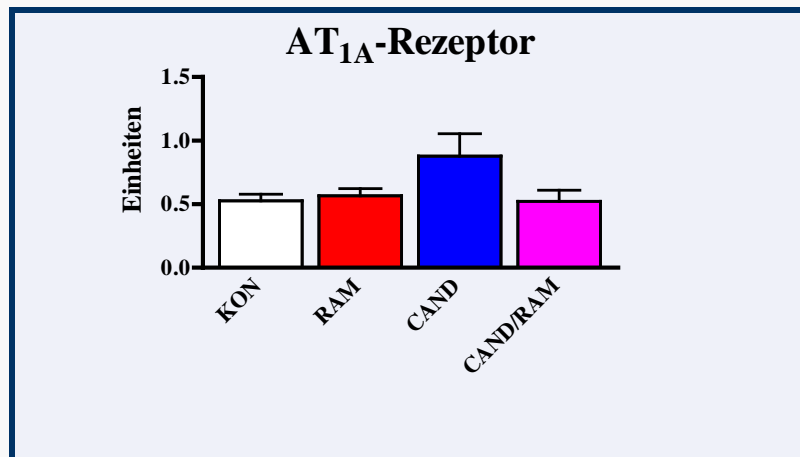


Abb. 4.7: RT-PCR. Amplifikation der AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor- (A) und β-Actin-cDNA (B) im Hypothalamus von SHR nach 3-monatiger Behandlung mit Candesartan, Ramipril bzw. der Kombination aus Candesartan und Ramipril im Vergleich zur Kontrollgruppe. SHR= spontan hypertensive Ratten, K= Kontrolle, R= Ramipril, C= Candesartan, C/R= Kombination aus Candesartan und Ramipril.

A)



B)

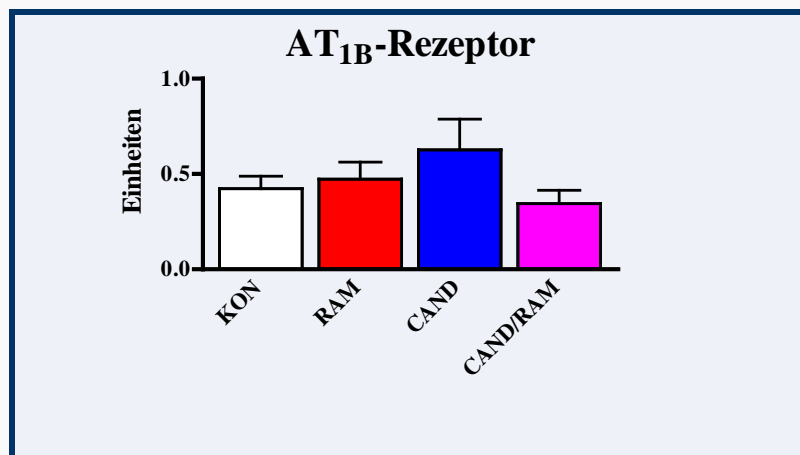


Abb. 4.8: Einfluss einer 3-monatigen Behandlung mit Candesartan (2,5 mg/kg/d), Ramipril (1 mg/kg/d) bzw. einer Kombination von Candesartan (0,45 mg/kg/d) und Ramipril (0,15 mg/kg/d) auf die **A)** AT_{1A}- und **B)** AT_{1B}-mRNA-Level im Hypothalamus von SHR (n=10-12). *= $p < 0.05$, KON= Kontrolle, RAM= Ramipril, CAND= Candesartan, CAND/RAM= Candesartan und Ramipril.

4.2.1.2 Hypophyse

In der Hypophyse zeigten sich unter der jeweiligen Monotherapie mit Ramipril bzw. Candesartan signifikant niedrigere AT_{1A} -Rezeptor-mRNA-Level im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und zu SHR die eine Kombination aus Candesartan und Ramipril erhielten. Hingegen waren die mRNA-Level für den AT_{1B} -Rezeptor unter der Kombinationstherapie signifikant höher als in den anderen Behandlungsgruppen und in der Kontrollgruppe (Abb. 4.9 und 4.10).

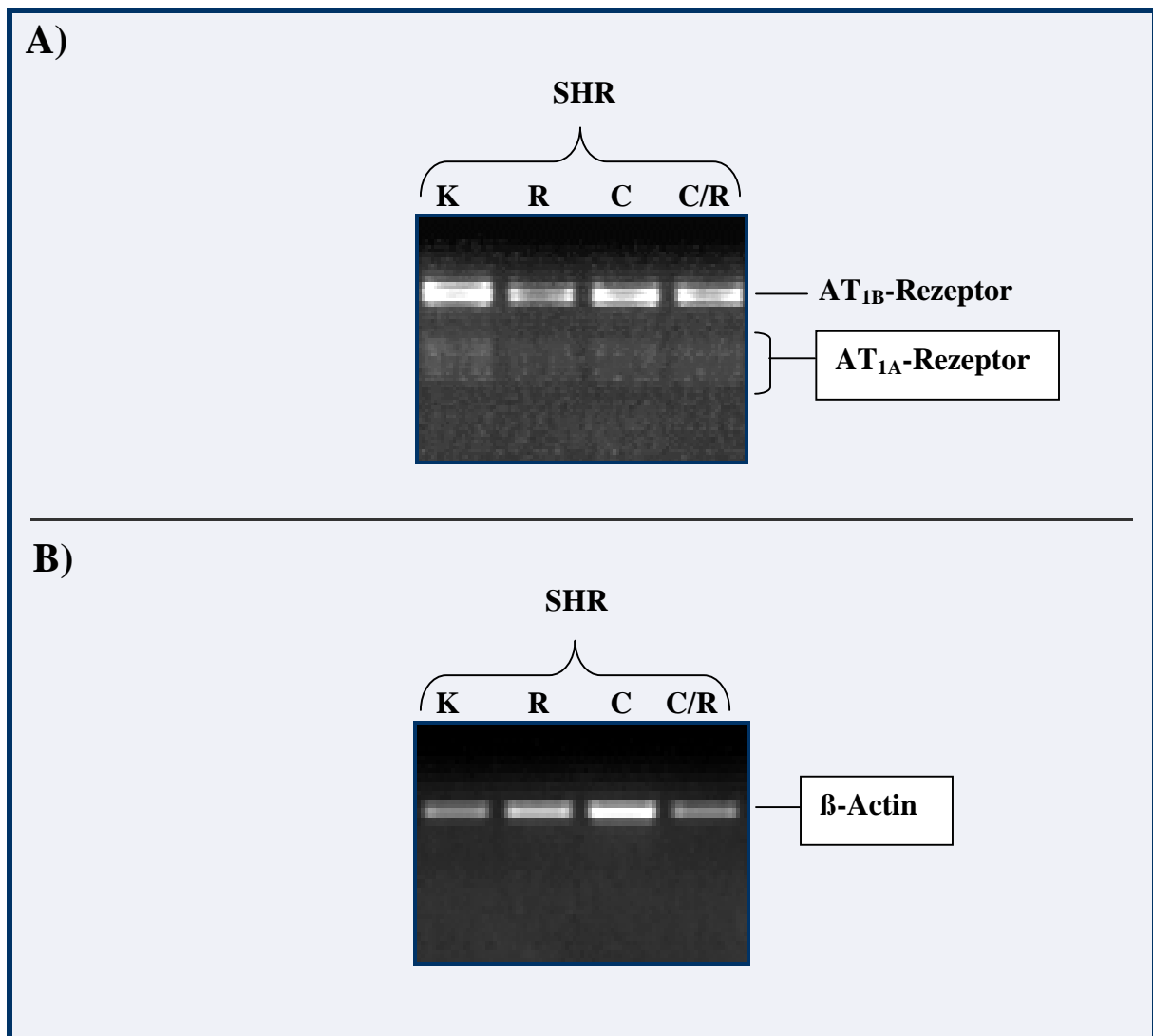
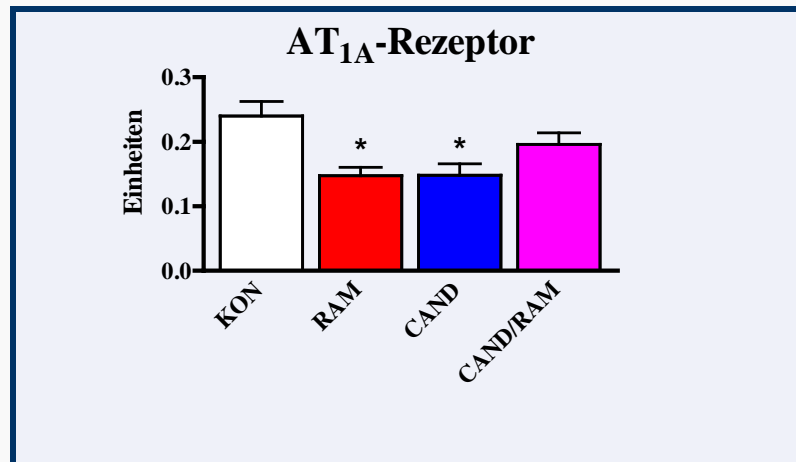


Abb. 4.9: RT-PCR. Amplifikation der AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor- (A) und β -Actin-cDNA (B) in der Hypophyse von SHR nach 3-monatiger Behandlung mit Candesartan, Ramipril bzw. der Kombination aus Candesartan und Ramipril im Vergleich zur Kontrollgruppe. SHR= spontan hypertensive Ratten, K= Kontrolle, R= Ramipril, C= Candesartan, C/R= Kombination aus Candesartan und Ramipril.

A)



B)

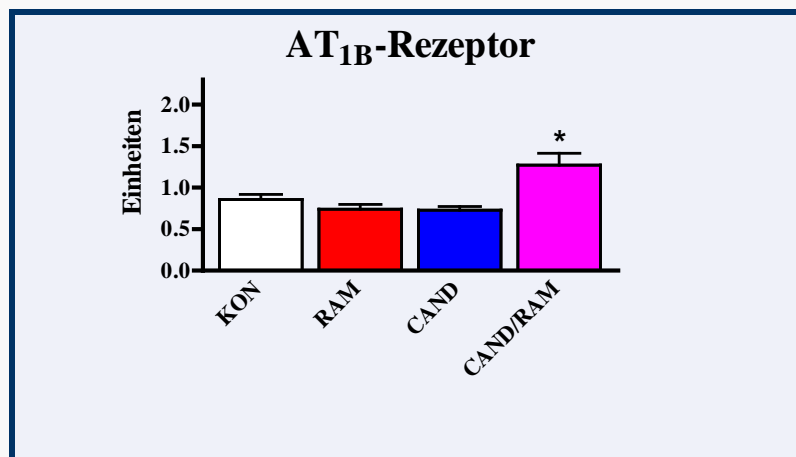


Abb.4.10 Einfluss einer 3-monatigen Behandlung mit Candesartan (2,5 mg/kg/d), Ramipril (1 mg/kg/d) bzw. einer Kombination von Candesartan (0,45 mg/kg/d) und Ramipril (0,15 mg/kg/d) auf die **A)** AT_{1A}- und **B)** AT_{1B}-mRNA-Level in der Hypophyse von SHR (n=14-15). *= p<0.05, KON= Kontrolle, RAM= Ramipril, CAND= Candesartan, CAND/RAM= Candesartan und Ramipril.

4.2.1.3 Nebenniere

In der Nebenniere zeigten sich signifikant erhöhte AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor-mRNA-Level in mit Ramipril behandelten spontan hypertensiven Ratten im Vergleich zu SHR, die mit Candesartan bzw. der Kombination aus Candesartan und Ramipril behandelt worden waren und zur unbehandelten Kontrollgruppe. Unter der Kombinationstherapie waren sowohl leicht erhöhte AT_{1B} - als auch AT_{1A} -Rezeptor-mRNA-Level gegenüber der Kontroll- und der Ramiprilgruppe nachweisbar, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichten. Die AT_2 -Rezeptor-mRNA-Level unterschieden sich in den einzelnen Behandlungsgruppen nicht signifikant. Es war eine Tendenz zu leicht erniedrigten AT_2 -Rezeptor-mRNA-Spiegeln unter Medikation mit Candesartan erkennbar (*Abb. 4.11 und 4.12*).

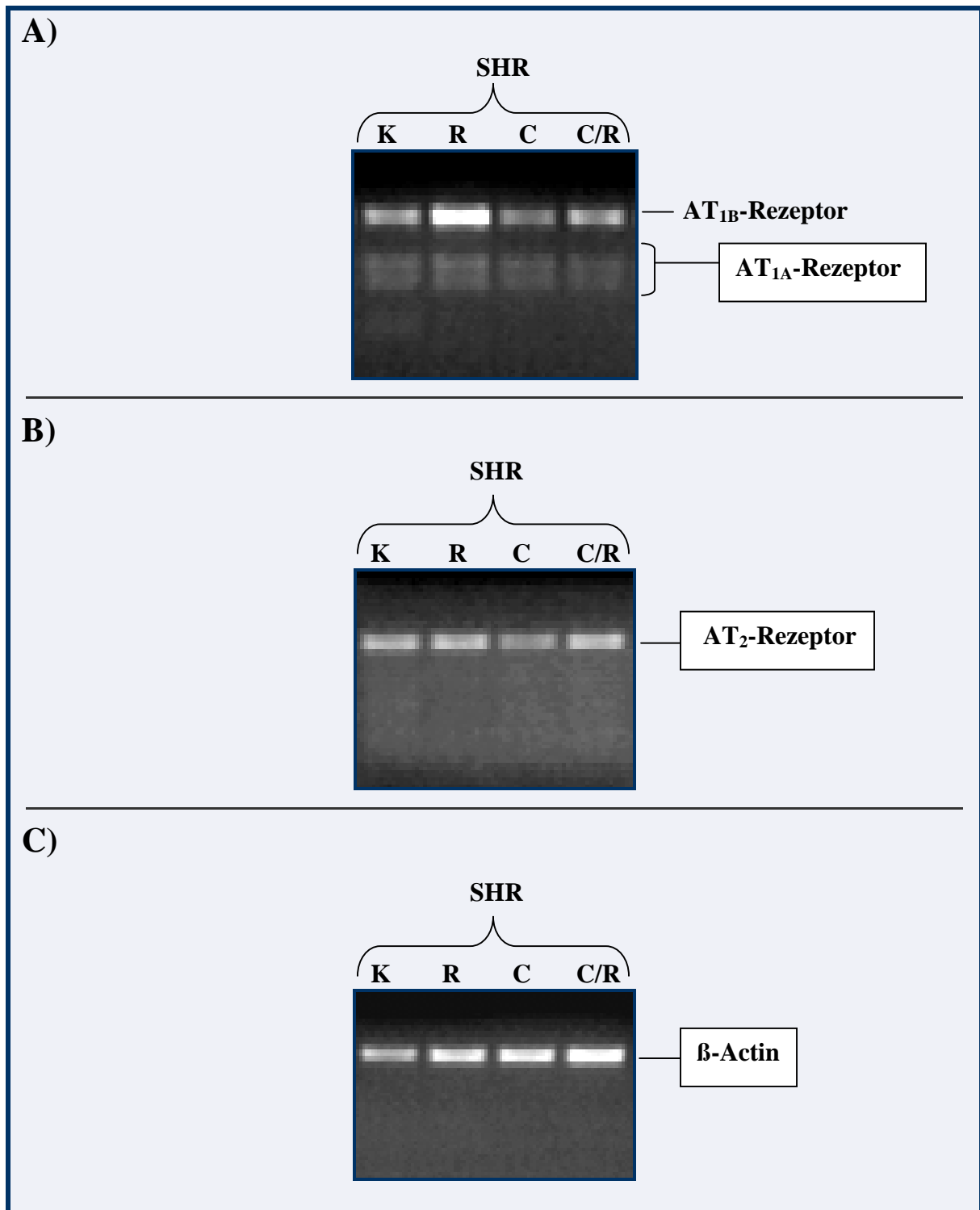
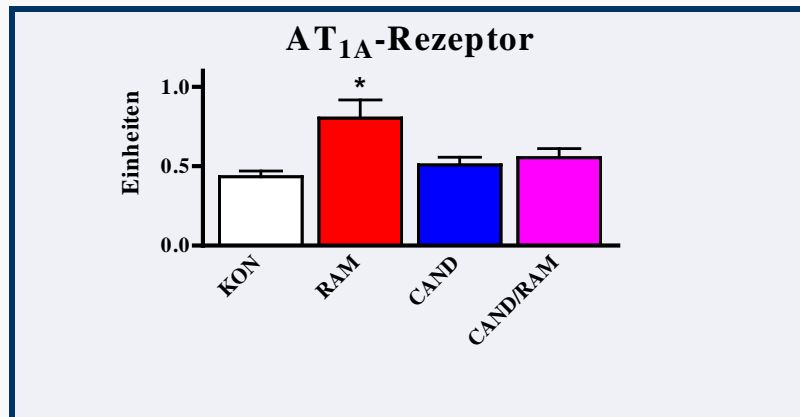
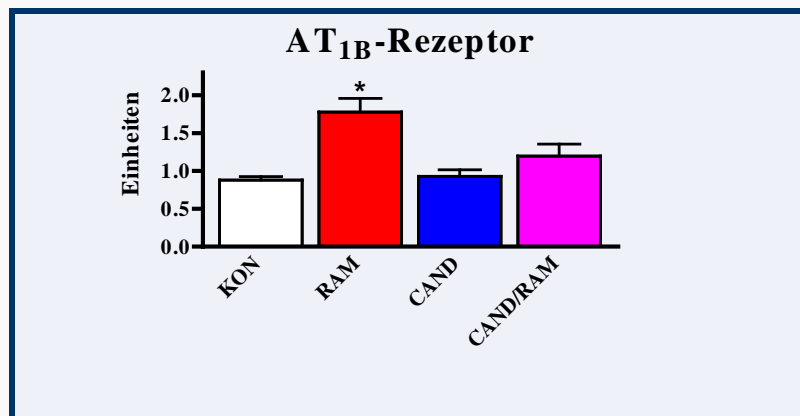


Abb. 4.11: RT-PCR. Amplifikation der AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor- (A), AT₂-Rezeptor- (B) und β-Actin-cDNA (C) in der Nebenniere von SHR nach 3-monatiger Behandlung mit Candesartan, Ramipril bzw. der Kombination aus Candesartan und Ramipril im Vergleich zur Kontrollgruppe. SHR= spontan hypertensive Ratten, K= Kontrolle, R= Ramipril, C= Candesartan, C/R= Kombination aus Candesartan und Ramipril.

A)



B)



C)

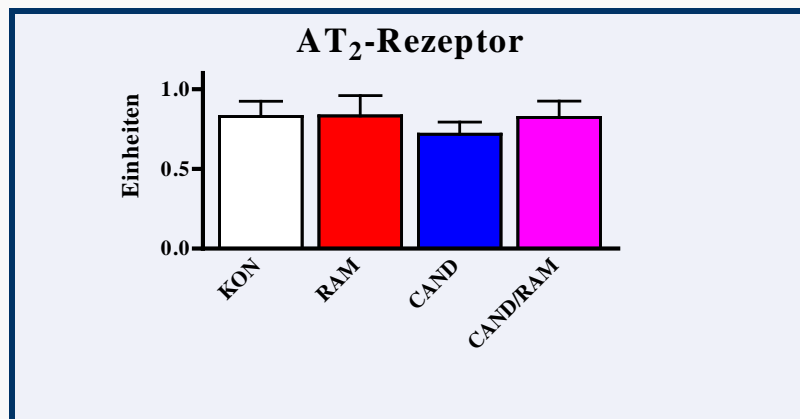


Abb. 4.12: Einfluss einer 3-monatigen Behandlung mit Candesartan (2,5 mg/kg/d), Ramipril (1 mg/kg/d) bzw. einer Kombination von Candesartan (0,45 mg/kg/d) und Ramipril (0,15 mg/kg/d) auf die **A)** AT_{1A}-, **B)** AT_{1B}-, **C)** AT₂-Rezeptor-mRNA-Level in der Nebenniere von SHR (n=13-15). *= p<0.05, KON= Kontrolle, RAM= Ramipril, CAND= Candesartan, CAND/RAM= Candesartan und Ramipril.

5 Diskussion

Das RAS spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Blutdrucks, des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie der Herz-Kreislauf Funktion. Mit seinem wichtigsten Effektorpeptid, dem Ang II, übt es seine Wirkungen vorwiegend über AT₁- und AT₂-Rezeptoren aus, wobei die bekannten physiologischen Wirkungen über Interaktionen mit dem AT₁-Rezeptor vermittelt werden. Bei Nagetieren konnten zwei Subtypen des AT₁-Rezeptors identifiziert werden, die als AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor bezeichnet werden [41]. Neben dem systemischen RAS geht man von der Existenz lokaler RAS in verschiedenen Organen aus [20, 39, 174]. Das Gehirn-RAS ist an der Auslösung kardiovaskulärer Effekte, der Durstentwicklung und der Sekretion hypophysärer Hormone beteiligt [25, 137, 162]. Ang II wird ferner eine Bedeutung bei der Aktivierung der HPA-Achse durch Stress beigemessen. Es konnte gezeigt werden, dass Stress neben einer Zunahme von zirkulierendem Ang II [193] auch zu einer veränderten Expression von Ang II-Rezeptoren führt [2, 21, 104].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer chronischen Behandlung mit Candesartan, Ramipril und einer Kombination beider Medikamente bei SHR auf die Ang II-Rezeptor-Expression der HPA-Achse untersucht.

5.1 Angiotensin-II-Rezeptorsubtypen auf der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Zu Beginn der Untersuchungen erfolgte mittels RT-PCR der Nachweis von Ang II-Rezeptoren in Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere von SHR. In allen drei Gewebetypen konnte AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA nachgewiesen werden, während AT₂-Rezeptor-mRNA lediglich in der Nebenniere nachweisbar war. Allerdings wurde in unseren Studien nicht zwischen verschiedenen Zelltypen bzw. Bezirken wie z. B. Nebennierenrinde und -mark differenziert. Somit bestätigen unsere Ergebnisse frühere Befunde aus der Literatur, in denen die Expression von AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptoren innerhalb der HPA-Achse gezeigt werden konnte. Dabei wurde demonstriert, dass AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA in einer Vielzahl von Geweben, die auch Nebenniere, Hypophyse und Gehirn umfassen, exprimiert wird. Mit Ausnahme von Hypophyse und Nebenniere, wo hauptsächlich AT_{1B}-Rezeptoren vorkommen, dominiert der AT_{1A}-Rezeptor [18, 54, 88, 89, 112]. In der Nebenniere bestehen darüber hinaus Unterschiede zwischen Cortex und Medulla. Die Zona glomerulosa der Nebennierenrinde enthält sowohl

AT_{1A}- als auch AT_{1B}-Rezeptoren. In der Zona fasciculata finden sich geringe Mengen beider Subtypen und im Nebennierenmark werden nur AT_{1A}-Rezeptoren exprimiert [29]. AT₂-Rezeptoren konnten in der vorliegenden Arbeit lediglich in der Nebenniere nachgewiesen werden. Hohe Konzentrationen von AT₂-Rezeptor-mRNA in der Nebenniere adulter Ratten konnten auch Shanmugam et al. nachweisen [158]. Das Fehlen von AT₂-Rezeptoren in der Hypophyse entspricht ebenfalls den Befunden aus der Literatur wonach Hypophyse und Leber keine AT₂-Rezeptoren enthalten sollen [35, 107]. Eine Studie die die Verteilung von Angiotensin-Rezeptorsubtypen im Gehirn adulter Ratten mittels Radioliganden-Bindung untersuchte [131], konnte geringe Mengen an AT₂-Rezeptoren in hypothalamischen Kernen nachweisen, obgleich AT₁-Rezeptoren vorherrschend waren. Der fehlende Nachweis von AT₂-Rezeptoren im Hypothalamus in dieser Dissertation ist möglicherweise auf die angewendete Methode (RT-PCR) zurückzuführen, da vielfältige Faktoren die Effektivität und Spezifität der RT-PCR beeinflussen.

Zusammenfassend konnte die Expression der Angiotensin-Rezeptorsubtypen in den Organen der HPA-Achse in dieser Dissertation bestätigt werden. Sie lässt auf eine Beteiligung des RAS bei der Aktivierung der HPA-Achse unter Stress schließen.

5.2 Einfluss von ACE-Hemmung und AT₁-Rezeptor Blockade auf die Angiotensin-II-Rezeptor-mRNA-Level innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Neben dem Vorkommen von Ang II-Rezeptoren in den Organen der HPA-Achse [29, 88, 173] gibt es weitere Hinweise, dass Ang II, insbesondere über den AT₁-Rezeptor, bei der Regulation der Aktivität der HPA-Achse unter Stress beteiligt ist [2, 4, 21, 87, 193]. So übt Ang II eine stimulierende Wirkung auf die CRH-Synthese [4] und Sekretion von ACTH [162] mit nachfolgender Corticosteroidsekretion aus. Ferner beeinflusst es direkt die adrenale Funktion, indem es die Aldosteronsekretion und Katecholaminfreisetzung steigert [1, 111]. Eine erhöhte AT_{1A}- und erniedrigte AT_{1B}-Rezeptor-Expression innerhalb der HPA-Achse bei Stress [104], lässt vermuten, dass die Beteiligung von Ang II an der Stressantwort selektiv über den AT_{1A}-Rezeptor erfolgt.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell, der SHR, konnte in früheren Arbeiten eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Stress demonstriert werden [99, 116]. Dabei soll das RAS an der veränderten Stressreaktion dieser Tiere beteiligt sein [55, 151]. Eine Hyperaktivität des Gehirn-RAS bei SHR [72, 144] wurde außerdem für die Entstehung des

arteriellen Hypertonus mit verantwortlich gemacht [179]. In einigen Arbeiten wird über eine veränderte Expression der Angiotensin-Rezeptoren bei SHR im Vergleich zu normotensiven Rattenstämmen, auch in den Organen der HPA-Achse, berichtet [68, 72, 91, 144]. Diese Befunde werden als Hinweise auf eine Beteiligung des RAS bzw. des Gehirn-RAS an der Stressantwort und der arteriellen Hypertension dieser Tiere gewertet [91, 179]. Die Auswirkungen einer Blockade des ACE bzw. der AT₁-Rezeptoren auf das Gehirn-RAS, u. a. auf die Stressantwort und zentrale Ang II Wirkungen, wurde in verschiedenen Studien untersucht, wobei insbesondere jüngere Arbeiten Vorteile der AT₁-Rezeptorantagonisten aufzeigen konnten [8, 9, 10, 13, 154, 157]. In der vorliegenden Dissertation wurden Ang II-Rezeptor-mRNA-Level bei SHR nach chronischer Behandlung (3 Monate) mit Candesartan, Ramipril bzw. einer Kombination von Candesartan und Ramipril in den Organen der HPA-Achse bestimmt (*Tab. 5.2*). Für die Interpretation der Ergebnisse ist von Bedeutung, dass in vorangegangenen funktionellen Untersuchungen bereits Blutdruck (SBP), Herzfrequenz (HF), linksventrikuläres Gewicht (LVG), ACE-Aktivität in verschiedenen Organen und Serum-Ang II-Spiegel an diesen Tieren bestimmt wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten in allen drei Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine äquivalente Blutdrucksenkung bei leichtem Herzfrequenzanstieg. Infolge der Blutdrucksenkung kam es zu einer Abnahme des linksventrikulären Gewichts, wobei der Effekt unter Ramipril etwas weniger ausgeprägt war als unter Candesartan und der Kombination. Die Plasma-ACE-Aktivität war unter Ramipril, sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie, signifikant vermindert. Obwohl in der Kombination die Dosierung von Ramipril geringer war, war der Effekt auf die ACE-Aktivität unter der Kombinationstherapie mit dem der Monotherapie vergleichbar. Die Ang II-Konzentration in Plasma, war unter AT₁-Blockade mit Candesartan ca. 6-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Unter der Behandlung mit Ramipril zeigte sich allerdings keine Verminderung der Konzentration von Ang II. Hingegen war eher eine Tendenz zu leicht erhöhten Ang II-Konzentrationen erkennbar, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichten. Auch unter der Kombinationstherapie konnte keine signifikante Veränderung der zirkulierenden Ang II-Konzentration registriert werden (*Tab. 5.1*).

Tabelle 5.1: Einflüsse einer chronischen Behandlung von SHR mit Candesartan (2,5 mg/kg/d), Ramipril (1 mg/kg/d) oder der Kombination aus Candesartan (0,45 mg/kg/d) und Ramipril (0,15 mg/kg/d) im Vergleich zur Kontrolle (Gummi arabicum-Lösung). *: $P < 0.05$ vs. K; †: $p < 0.05$ vs. R; ‡: $p < 0.05$ vs. C/R.

	Kontrolle	Ramipril	Candesartan	Candesartan/ Ramipril
SBP (mmHg)	215,8±1,6	156,5±1,1 *	149,0±0,9 *†‡	156,4±1,1 *
HF (n/min)	357,1±7,3	378,4±4,2 *	385,1±4,2 *	387,5±5,5 *
LVG (mg/g KG)	2,869±0,024	2,478±0,036 *	2,205±0,029 *†	2,183±0,033 *†
ACE-Akt in Plasma (nmol/min/ml)	29,7±0,8	15,3±0,9 *	25,9±2,2 †‡	18,2±1,5 *
Ang II in Plasma (pg/ml)	85,9±17,7	126,6±25,1	527,3±141,7 *†‡	133,8±27,4

Die in dieser Arbeit ermittelten Veränderungen der Ang II-Rezeptor-mRNA-Level innerhalb der HPA-Achse unter den verschiedenen Therapieprinzipien sind in *Tabelle 5.2* zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 5.2: Veränderungen der AT_{1A} -, AT_{1B} - und AT_2 -Rezeptor-mRNA-Level bei SHR unter einer chronischen Behandlung mit Candesartan (C), Ramipril (R), oder deren Kombination (C/R) bezogen auf die Kontrollgruppe. ∅: keine Veränderungen; é: gesteigerte Rezeptor-mRNA-Level; ê: verringerte Rezeptor-mRNA-Level.

Hypothalamus	R	C	C/R
AT _{1A}	⇒	⇒	⇒
AT _{1B}	⇒	⇒	⇒
Hypophyse	R	C	C/R
AT _{1A}	↓	↓	⇒
AT _{1B}	⇒	⇒	↑
Nebenniere	R	C	C/R
AT _{1A}	↑	⇒	⇒
AT _{1B}	↑	⇒	⇒
AT ₂	⇒	⇒	⇒

Wie bereits eingangs erwähnt werden nahezu alle bekannten physiologischen Effekte des Ang II über den AT₁-Rezeptor vermittelt. Dazu gehört auch die Verminderung der Renin-Sekretion durch einen negativen Feedback-Mechanismus [169]. Das hat zur Folge, dass AT₁-Antagonisten im Gegensatz zu den ACE-Inhibitoren die Synthese von Ang II fördern. Darüber hinaus wurde eine Feedback-Regulation zwischen der Ang II-Konzentration und der Expression des AT₁-Rezeptors beschrieben. Dementsprechend sollen hohe Konzentrationen von Ang II zu einer Abnahme und geringe Ang II-Konzentrationen zu einer Zunahme der AT₁-Rezeptordichte führen [34, 64, 101, 155]. Die vorangegangenen funktionellen Untersuchungen zeigten unter AT₁-Blockade mit Candesartan erhöhte zirkulierende Ang II-Konzentrationen aber keine signifikanten Veränderungen der Ang II-Konzentration unter Ramipril und der Kombination (*Tab. 5.1*). Als Folge des beschriebenen Feedback-Mechanismus zwischen Ang II-Konzentration und AT₁-Rezeptorexpression hätte man in der vorliegenden Arbeit unter Candesartan erniedrigte AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level erwarten können. Eine solche Verminderung zeigte sich allerdings lediglich für die AT_{1A}-Rezeptor-mRNA-Level in der Hypophyse. Andererseits hätte man unter Ramipril und der Kombination unveränderte AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level vermuten können. Es zeigten sich jedoch in der Nebenniere unter Ramipril erhöhte AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level und unter der Kombination eine signifikant erhöhte AT_{1B}-Rezeptorexpression in der Hypophyse. Demzufolge sprechen die vorliegenden Ergebnisse gegen eine einheitliche Feedback-Regulation zwischen zirkulierender Ang II-Konzentration und AT₁-Rezeptordichte. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass neben dem zirkulierenden RAS lokale RAS in verschiedenen Organen beschrieben sind [20, 39, 42, 123, 137, 174, 175]. Lokal produziertes Ang II, welches nicht bestimmt wurde, könnte daher unabhängig vom zirkulierenden Ang II Einfluss auf die Ang II-Rezeptor-mRNA-Level nehmen. Ferner ist zu bedenken, dass zahlreiche weitere Faktoren die AT₁-Rezeptor-Expression beeinflussen und verschiedene Mechanismen der AT₁-Rezeptor-Regulation zugrunde liegen [129], die ebenso wie die Aktivität der HPA-Achse in dieser Arbeit keine Berücksichtigung fanden. Unter ACE-Blockade sind auch mögliche Nebenwege der Ang II-Synthese zu beachten [16, 40, 167, 177, 188]. Da jedoch die AT₁-Rezeptorantagonisten, insbesondere Candesartan, eine hohe Affinität und Selektivität zum AT₁-Rezeptor aufweisen [32], sind Veränderungen der AT₁-Rezeptor-mRNA-Level zur effektiven Rezeptorblockade wahrscheinlich nicht entscheidend.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigten im Hypothalamus keine signifikanten Unterschiede der AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor-mRNA-Level zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Tab. 5.2). Einschränkend muss dabei jedoch angemerkt werden, dass sich unter Candesartan, wenn auch nicht signifikant, höhere AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor-mRNA-Level fanden. Für die Interpretation dieser Befunde könnte der Aspekt der spezifischen Verteilung hypothalamischer AT_1 -Rezeptoren von Bedeutung sein, da zwar eine Differenzierung zwischen AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptoren vorgenommen wurde, aber das spezifische Vorkommen der AT_1 -Rezeptoren in bestimmten hypothalamischen Kerngebieten keine Berücksichtigung fand. Im Hypothalamus konnten AT_1 -Rezeptoren im parvozellulären Teil des PVN, der an der Stressreaktion durch Produktion des CRH, und autonomen Regulation des kardiovaskulären Systems beteiligt sein soll, sowie im Nucleus supraopticus nachgewiesen werden [4, 137]. Eine geringe AT_1 -Rezeptorexpression zeigte sich im magnozellulareren Teil des PVN [4], die Perikarya synthetisieren u. a. Vasopressin und Oxytocin [105].

Bei SHR, die wie bereits erwähnt, eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Stress aufweisen sollen, konnte im Vergleich zu Wistar-Kyoto Ratten (WKY) eine höhere Expression von AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptoren im Hypothalamus beobachtet werden [144]. Eine andere Arbeitsgruppe fand sowohl eine erhöhte Anzahl von AT_1 - als auch AT_2 -Rezeptoren im Hypothalamus von SHR [72]. Im Gegensatz dazu konnten in einer jüngeren Untersuchung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptorexpression zwischen WKY und SHR registriert werden [91]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Stress zu einer Zunahme der AT_1 -Rezeptorexpression im PVN des Hypothalamus führt [2, 9, 21]. In einer anderen Studie ging Stress mit einer Zunahme der AT_{1A} -Rezeptor-mRNA-Expression im PVN des Hypothalamus einher. AT_{1B} -Rezeptor-mRNA konnte weder vor Stressexposition noch unter akutem und chronischem Stress nachgewiesen werden [104]. Bei stressexponierten Ratten führte die Vorbehandlung mit dem AT_1 -Antagonisten Candesartan in einer anderen Untersuchung zu einem deutlichen Rückgang der AT_1 -Rezeptor-Bindungsstellen im PVN [9]. Dass Candesartan nicht nur periphere sondern auch AT_1 -Rezeptoren im Gehirn, einschließlich des PVN, blockieren kann, wurde zuvor in einer anderen Studie demonstriert [130]. Eine frühere Arbeit konnte im Hypothalamus eine signifikante Abnahme der Ang II-Rezeptordichte unter ACE-Hemmer-Behandlung registrieren [187].

Im Gegensatz zu den zuletzt genannten Untersuchungen konnten wir weder unter ACE-Hemmung, AT_1 -Blockade noch der Kombination beider Therapieprinzipien eine

Veränderung der AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level beobachten. Es ist denkbar, dass in der vorliegenden Dissertation mögliche Unterschiede der AT₁-Rezeptorexpression in den jeweiligen Gruppen auf bestimmte hypothalamische Kerngebiete beschränkt sind und methodisch nicht erfasst wurden. Andererseits wäre es möglich, dass eine chronische Behandlung, wie in unseren Untersuchungen, sich im Gegensatz zur kurzfristigeren Intervention [9, 130] unterschiedlich auf die Ang II-Rezeptorexpression auswirkt.

In der Hypophyse waren die AT_{1A}-Rezeptor-mRNA-Level unter einer chronischen Behandlung mit Ramipril bzw. Candesartan signifikant erniedrigt, wohingegen unter der Kombination keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe messbar waren (*Tab. 5.2*). Andererseits waren unter der Kombinationsbehandlung die AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level signifikant erhöht, während unter der jeweiligen Monotherapie mit Candesartan bzw. Ramipril keine Unterschiede beobachtet wurden.

Aus der Literatur geht hervor, dass in der Hypophyse adulter Ratten AT_{1B}-Rezeptoren der vorwiegend vorliegende Rezeptorsubtyp sind [18, 54, 88, 89, 102, 112]. Es konnte gezeigt werden, dass AT_{1B}-Rezeptoren überwiegend von Prolaktin produzierenden Zellen und zu einem geringeren Anteil auch von ACTH bildenden Zellen exprimiert werden [103]. Die physiologische Funktion der AT_{1A}-Rezeptoren in der Hypophyse ist noch nicht hinreichend geklärt. Bei SHR konnten jedoch im Vergleich zu normotensiven WKY signifikant höhere AT_{1A}- und signifikant niedrigere AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level in der Hypophyse nachgewiesen werden [91]. Eine erhöhte AT_{1A}- und verminderte AT_{1B}-Rezeptorexpression in der Hypophyse konnte auch bei akut Stress-exponierten Ratten demonstriert werden. Wiederholter Stress führte zur Normalisierung der AT_{1B}-mRNA, die AT_{1A}-Rezeptor-mRNA-Level waren weiterhin erhöht [104]. Auch Wasserentzug ging bei Ratten mit erhöhten AT_{1A}- und erniedrigten AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Spiegeln in der Hypophyse einher [152]. Bei Stress und stressempfindlichen SHR scheint es demzufolge zu einer Up-regulation von AT_{1A}-Rezeptoren und Down-regulation von AT_{1B}-Rezeptoren zu kommen, was die Annahme unterstützt, dass Ang II seine Wirkungen unter Stress über den AT_{1A}-Rezeptor ausübt [104]. Die in dieser Arbeit signifikant erniedrigten AT_{1A}-Rezeptor-mRNA-Spiegel unter Candesartan und Ramipril, könnten somit als Folge der Blockade des unter Stress aktivierten RAS interpretiert werden und sind möglicherweise mit einer verminderten Aktivität der HPA-Achse verbunden. Die signifikant erhöhten AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level unter der Kombinationstherapie und die unveränderte AT_{1B}-Rezeptorexpression unter der jeweiligen Monotherapie mit Ramipril und Candesartan

unterstützen die Annahme, dass AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptoren bei der Stressantwort eine unterschiedliche Funktion ausüben [104] und unterstreichen die Bedeutung einer differentiellen Regulation und Expression von AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptoren [86, 92].

In der Nebenniere waren die AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor-mRNA-Level unter der Monotherapie mit Ramipril signifikant erhöht. Hingegen zeigten sich unter Candesartan und der Kombinationstherapie keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (*Tab. 5.2*).

Die im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant veränderten AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor-mRNA-Level unter Candesartan bzw. der Kombination sind möglicherweise ein Effekt der AT_1 -Rezeptorblockade. In der bereits erwähnten Studie von Leong et al. wurde unter Stress eine erhöhte Expression von AT_{1A} -Rezeptor-mRNA im Nebennierenmark und verminderte Expression von AT_{1B} -Rezeptor-mRNA in der Zona glomerulosa von Sprague-Dawley Ratten nachgewiesen [104]. Unter Berücksichtigung dieser Daten wäre denkbar, dass die Blockade des AT_1 -Rezeptors im Gegensatz zur ACE-Hemmung einer Up-regulation der möglicherweise für die Stressantwort bedeutenden AT_{1A} -Rezeptoren entgegenwirkt und dadurch eine Ang II vermittelte Stressreaktion abschwächt. Hier gilt es jedoch anzumerken, dass die Aktivität der HPA-Achse nicht weiter untersucht wurde. Vorteile einer AT_1 -Blockade konnten auch in einer Studie bei Wistar male Ratten durch in situ Hybridisierung und Bindungs-Studien demonstriert werden. Eine stressbedingte Zunahme der AT_1 -Rezeptor-Bindung und der AT_{1B} -Rezeptor-mRNA in der Zona glomerulosa der Nebenniere konnte durch AT_1 -Rezeptor-Blockade mit Candesartan aufgehoben werden [9]. Die AT_{1A} -mRNA-Expression in der Zona glomerulosa konnte durch eine Behandlung mit Candesartan ebenfalls reduziert werden. Im Nebennierenmark fanden sich unter Candesartan signifikant weniger AT_1 -Rezeptor-Bindungsstellen aber keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der AT_{1A} -mRNA-Expression [9]. Eine verminderte AT_1 -Rezeptor-Bindung in der Zona glomerulosa nach Candesartan-Gabe wurde auch in einer anderen Arbeit beobachtet [130].

Die Expression von AT_2 -Rezeptoren in der Nebenniere wies nach 3-monatiger Therapie keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen auf (*Tab. 5.2*). Ob die durch den AT_2 -Rezeptor vermittelten Effekte dementsprechend nicht beeinträchtigt wurden, war, ebenso wie eine mögliche Dosisabhängigkeit, nicht Gegenstand der Untersuchungen. Denkbar ist jedoch, dass die Therapie mit Candesartan allein und in Kombination im Vergleich zur ACE-Hemmer-Behandlung zu einer stärkeren

Aktivierung des AT₂-Rezeptors führt, da Ang II am blockierten AT₁-Rezeptor nicht wirksam werden kann. Der Einfluss einer AT₁-Rezeptorblockade auf die AT₂-Rezeptorexpression bei stressexponierten Wistar male Ratten in der Nebenniere wurde in der bereits erwähnten Publikation von Armando et al. untersucht [9]. Eine Vorbehandlung der Tiere mit dem AT₁-Antagonisten Candesartan über dreizehn Tage führte zu einer Steigerung der AT₂-Rezeptordichte und in hoher Dosis auch zu einer Zunahme der AT₂-Rezeptor-mRNA in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Im Nebennierenmark konnte unter Stress eine erhöhte AT₂-Rezeptordichte nachgewiesen werden, dieser Effekt wurde durch eine AT₁-Blockade aufgehoben. Im Gegensatz dazu kam es nach Gabe einer hohen Dosis des AT₁-Antagonisten zu einer signifikanten Steigerung der AT₂-Rezeptor-mRNA im Nebennierenmark. Die Autoren führten als Ursache der veränderten AT₂-Rezeptorexpression u. a. einen möglichen cross-talk zwischen AT₁- und AT₂-Rezeptoren an [82, 149]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte eine kürzlich publizierte Studie, bei der die orale Gabe von Candesartan über 40 Tage gefolgt von einer intraventrikulären Injektion von Ang II bei SHR ebenfalls zu einer Abnahme der AT₂-Rezeptor-Bindungsstellen im Nebennierenmark und einer Zunahme in der Nebennierenrinde führte [157]. Die in der vorliegenden Dissertation ermittelten AT₂-Rezeptor-mRNA-Level in der Nebenniere waren, wie bereits erwähnt, unter einer chronischen Behandlung mit Ramipril, Candesartan und der Kombination aus Candesartan und Ramipril nicht verändert. Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass im Vergleich zu den zitierten Untersuchungen keine Differenzierung zwischen Nebennierenrinde und -mark erfolgte und dass mit Hilfe der RT-PCR zwar die Genexpression auf der Stufe der RNA untersucht wurde, aus den Ergebnissen jedoch nicht zwangsläufig auf die tatsächlich an der Zelloberfläche exprimierten Ang II-Rezeptoren geschlossen werden kann. Allerdings könnte die alleinige AT₁-Rezeptorblockade therapeutisch von Vorteil sein, da Ang II durch Aktivierung des in seiner Expression möglicherweise unveränderten AT₂-Rezeptors positive Effekte ausüben könnte. So soll innerhalb der Nebenniere der AT₁-Rezeptor für die Freisetzung von Aldosteron und Katecholaminen verantwortlich sein [189]. Dabei soll die Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark über die Bildung von IP₃, Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und nachfolgender Exozytose erfolgen [189]. Die Stimulation des AT₂-Rezeptors im Nebennierenmark führt hingegen zu einer Abnahme der IP₃-Synthese [84]. Die vermehrte Aktivierung des AT₂-Rezeptors unter AT₁-Blockade könnte somit zu einer Abschwächung der Stressantwort durch verminderte Freisetzung von Katecholaminen und Aldosteron beitragen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte zum ersten Mal vergleichend den Einfluss einer chronischen Blockade der AT₁-Rezeptoren bzw. des ACE sowie der Kombination beider Wirkprinzipien auf die Expression der Angiotensin-Rezeptoren der HPA-Achse bei SHR. Im Hypothalamus zeigten sich keine Veränderungen der AT₁-Rezeptor-mRNA-Level zwischen den Therapiegruppen. In der Hypophyse kam es unter AT₁-Blockade und ACE-Hemmung zu einer Abnahme der AT_{1A}-Rezeptor-mRNA-Expression. In einer bereits erwähnten Studie konnten bei SHR erhöhte hypophysäre AT_{1A}-Rezeptoren einhergehend mit einer erhöhten ACTH-Freisetzung nachgewiesen werden. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass die gesteigerte Stress-Sensitivität bei SHR u. a. auf eine Hochregulation der hypophysären AT_{1A}-Rezeptoren zurückzuführen ist [91]. Vor diesem Hintergrund könnte die in dieser Dissertation gezeigte Down-regulation der hypophysären AT_{1A}-Rezeptoren unter Blockade des RAS zu einer Abschwächung der Stressantwort führen und mit positiven Effekten bei Stress einhergehen. Für eine Blockade des RAS durch AT₁-Rezeptorantagonisten sprechen der hier dargestellte Nachweis erhöhter AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level unter Ramipril bei unveränderten unter Candesartan in der Nebenniere und mögliche positive Wirkungen die Ang II über den hier unverändert exprimierten AT₂-Rezeptor auslösen könnte. Sowie die bekannte hohe Affinität und Selektivität der AT₁-Rezeptorantagonisten zum AT₁-Rezeptor.

Da jedoch die genauen Regulationsmechanismen der Ang II-Rezeptorexpression innerhalb der HPA-Achse derzeit noch nicht hinreichend geklärt sind, sind weitere Untersuchungen notwendig, um abzuschätzen welche Faktoren die Genexpression auf molekularer Ebene beeinflussen und welche Auswirkungen eine Blockade des RAS auf der HPA-Achse bei Stress bzw. Stress-assoziierten Erkrankungen beim Menschen zur Folge hat.

6 Zusammenfassung

Nachdem innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse die Existenz aller Subtypen von Ang II-Rezeptoren nachgewiesen wurde, war Ziel der vorliegenden Dissertation zu untersuchen, ob die therapeutische Intervention in das Renin-Angiotensin-System (RAS) einen Einfluss auf die Expression dieser Rezeptoren ausübt.

Deshalb wurde bei spontan hypertensiven Ratten (SHR), die 3 Monate lang mit dem AT₁-Antagonisten Candesartan, dem ACE-Hemmer Ramipril bzw. einer Kombination aus beiden Wirkstoffen behandelt worden waren, der mRNA Gehalt an AT_{1A}-, AT_{1B}- und AT₂-Rezeptoren in Organen der HPA-Achse bestimmt. Nach Isolierung von RNA aus Hypothalamus, Hypophysen und Nebennieren der einzelnen Behandlungsgruppen erfolgte mit Hilfe der RT-PCR zunächst das Umschreiben der RNA in cDNA und im folgenden die Amplifizierung der cDNA-Sequenzen für die entsprechenden Angiotensin-Rezeptoren. Zur Differenzierung zwischen AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Die Quantifizierung der Ang II-Rezeptor-mRNA-Level wurde durch eine densitometrische Auswertung der Elektrophoresegele vorgenommen.

In allen drei Gewebetypen der SHR konnte AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA nachgewiesen werden. AT₂-Rezeptor-mRNA fand sich lediglich in der Nebenniere. Dieses Ergebnis bestätigt die Expression der Ang II-Rezeptorsubtypen innerhalb der HPA-Achse und kann als Hinweis auf eine Beteiligung des RAS an der Stressantwort gewertet werden. Weitere bekannte Hinweise sind die Regulation der CRH-, ACTH-, Aldosteron- und Corticosteroid-Synthese und -Bildung via Ang II und nachfolgender AT₁-Rezeptorstimulation. Es wird vermutet, dass Ang II seine Wirkungen bei Stress über AT_{1A}-Rezeptoren vermittelt, da unter Stress eine Up-regulation von AT_{1A}- und Down-regulation von AT_{1B}-Rezeptoren innerhalb der HPA-Achse beobachtet wurde. Die Hochregulation von hypophysären AT_{1A}-Rezeptoren wird mit der gesteigerten Stress-Sensitivität bei SHR in Verbindung gebracht.

Unter der therapeutischen Intervention in das RAS zeigten sich im Hypothalamus keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der Hypophyse waren signifikant niedrigere AT_{1A}-Rezeptor-mRNA-Level unter Monotherapie mit Candesartan und Ramipril sowie signifikant höhere AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Level unter der Kombinationstherapie nachweisbar. Unter Berücksichtigung dass die gesteigerte Stress-Sensitivität bei SHR auf eine Hochregulation der hypophysären AT_{1A}-Rezeptoren zurückzuführen sein könnte, könnte die Down-regulation der AT_{1A}-Rezeptoren in der Hypophyse als positiver Effekt

der RAS-Blockade interpretiert werden. Da in den Nebennieren eine Up-regulation der AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptoren unter Ramipril nachweisbar war, bei unveränderten AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor-mRNA-Level unter Candesartan und der Kombinationstherapie und nicht signifikant veränderten AT_2 -Rezeptor-mRNA-Level in allen Gruppen, könnte eine AT_1 -Rezeptorblockade Vorteile bieten.

Zum ersten Mal konnte durch die genannten Ergebnisse vergleichend der Einfluss einer chronischen AT_1 -Rezeptor-Blockade, ACE-Hemmung bzw. Kombination beider Wirkprinzipien auf die Expression von Angiotensin-Rezeptorsubtypen der HPA-Achse von SHR demonstriert werden. Die Ergebnisse sind von potentiell klinischer Bedeutung, da die Downregulation der hypophysären AT_{1A} -Rezeptoren unter Blockade des RAS mit positiven Effekten bei Stress bzw. bei Stress-assoziierten Erkrankungen einhergehen könnte. Weitere gezielte Untersuchungen sind erforderlich um abzuschätzen welche Faktoren innerhalb der HPA-Achse die Expression der Angiotensin-Rezeptoren beeinflussen und ob die medikamentöse Blockade des RAS auf der HPA-Achse bei Stress bzw. Stress-assoziierten Erkrankungen auch beim Menschen positive Wirkungen zur Folge hat.

7 Literaturverzeichnis

1. Aguilera G, Factors controlling steroid biosynthesis in the zona glomerulosa of the adrenal. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993. 45:147-151.
2. Aguilera G, Kiss A, Luo X, Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. *J Neuroendocrinol.* 1995. 7:775-783.
3. Aguilera G, Kiss A, Luo X, Akbasak BS, The renin-angiotensin system and the stress response. *Ann NY Sci.* 1995. 77:173-186.
4. Aguilera G, Young WS, Kiss A, Bathia A, Direct regulation of hypothalamic corticotropin-releasing-hormone neurons by angiotensin II. *Neuroendocrinology.* 1995. 61:437-444.
5. AIRE-Study Investigators. *Lancet.* 1993. 342:821-828.
6. Allen AM, MacGregor DP, McKinley MJ, Mendelsohn FA, Angiotensin II receptors in the human brain. *Regul Pept.* 1999. 79:1-7.
7. Andersen NH, Mogensen CE, Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers: evidence for and against the combination in the treatment of hypertension and proteinuria. *Curr Hypertens Rep.* 2002. 4:394-402.
8. Ando H, Jezova M, Zhou J, Saavedra JM, Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases brain artery inflammation in a stress-prone rat strain. *Ann N Y Acad Sci.* 2004. 1018:345-350.
9. Armando I, Carranza A, Nishimura Y, Hoe KL, Barontini M, Terron JA, Falcon-Neri A, Ito T, Juorio AV, Saavedra JM, Peripheral administration of an angiotensin II AT(1) receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation Stress. *Endocrinology.* 2001. 142:3880-3889.
10. Baiardi G, Bregonzio C, Jezova M, Armando I, Saavedra JM, Angiotensin II AT1 receptor blockade prolongs the lifespan of spontaneously hypertensive rats and reduces stress-induced release of catecholamines, glucocorticoids, and vasopressin. *Ann N Y Acad Sci.* 2004. 1018:131-136.
11. Bain JS, Ferguson AV, Paraventricular nucleus neurons projecting to the spinal cord receive excitatory input from the subfornical organ. *Am J Physiol.* 1995. 268:625-633.
12. Benz J, Oshrain C, Henry D, Avery C, Chiang YT, Gatlin M, Valsartan, a new angiotensin II receptor antagonist: a double-blind study comparing the incidence of cough with lisinopril and hydrochlorothiazide. *J Clin Pharmacol.* 1997. 37:101-107.

13. Berecek KH, Swords BH, Lo S, Kirk KA, Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors upon brain angiotensin II binding. *J Hypertens.* 1992. 10:545-552.
14. Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C, Nuthulaganti P, Kerstein H, Elshourbagy N, Griffin E, Stadel JM, Aiyar N, Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.*1992. 183:989-995.
15. Bosch J, Yusuf S, Pogue J, Sleight P, Lonn E, Rangoonwala B, Davies R, Ostergren J, Probstfield J; HOPE Investigators, Heart outcomes prevention evaluation. Use of ramipril in preventing stroke: double blind randomised trial. *BMJ.* 2002. 324:699-702.
16. Boucher R, Asselin JH, Benest J, A new enzyme leading to direct formation of angiotensin II. *Circ Res.* 1974. 34:1203-1209.
17. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S; REENAL Study Investigators, Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001. 345:861-869.
18. Burson JM, Aguilera G, Gross KW, Sigmund CD, Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol.* 1994. 267:260-267.
19. Camp HS, Dudley DT, Modulation of angiotensin II receptor (AT₂) mRNA levels in R3T3 cells. *Receptor.* 1995. 5:123-132.
20. Campbell DJ, Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest.* 1987. 79:1-6.
21. Castrén E, Saavedra JM, Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in the rat paraventricular nucleus and subfornical organ. *Endocrinology.* 1988. 122:370-372.
22. Chen Y, Liu-Stratton Y, Hassanain H, Cool DR, Morris M, Dietary sodium regulates angiotensin AT1a and AT1b mRNA expression in mouse brain. *Exp Neurol.* 2004. 188:238-245.
23. Cohn JN, Tognoni G; Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A randomised trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2001. 345:1667-1675.
24. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-Dos-Santos AJ, Da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM, Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002. 417:822-828.

25. Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger T, The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT1-receptor blockers. *J Hum Hypertens*. 2002. 16:64-70.
26. Curnow KM, Pascoe L, White PC, Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol*. 1992. 6:1113-1118.
27. Dahlöf B, Keller S, Makris L, Goldberg AI, Sweet CS, Lim NY, Efficacy and tolerability of losartan potassium and atenolol in patients with mild to moderate essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1995. 8:578-583.
28. Danilczyk U, Eriksson U, Crackower MA, Penninger JM, A story of two ACEs. *J Mol Med*. 2003. 81:227-234.
29. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger Th, International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000. 52:415-472.
30. Dickstein K, Kjeksus J; OPTIMAAL Steering Committee of the OPTIMAAL Study Group, Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. *Lancet*. 2002. 360:752-760.
31. Dominiak P, Dendorfer A, (1999): Chemische Struktur. In: Dominiak P, Unger Th (Hrsg.): AT1-Rezeptorantagonisten Angiotensin II. Steinkopff, Darmstadt, 47.
32. Dominiak P, Häuser W, Äquivalenzdosen der in Deutschland verfügbaren AT1-Rezeptor-Antagonisten. *Dtsch Med Wochenschr*. 2003. 128 :2315-2318.
33. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S, A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000. 87:1-9.
34. Douglas JG, Brown GP, Effect of prolonged low dose infusion of angiotensin II and aldosterone on rat smooth muscle and adrenal angiotensin II receptors. *Endocrinology*. 1982. 111:988-992.
35. Dudley DT, Panek RI and Major TC, Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol Pharmacol*. 1990. 38:370-377.
36. Dudley DT, Summerfelt RM, Regulated expression of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells. *Regul Pept*. 1993. 44:199-206.

37. Düsing R, Schmitz U, Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten. Dosisabhängigkeit von Blutdrucksenkung, Organprotektion und Prognoseverbesserung. *Arzneimitteltherapie*. 2003. 21:84-87.
38. Dzau VJ, Gibbons GH, Autocrine and paracrine mechanisms of vascular myocytes in systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 1987. 60:991-1031.
39. Dzau VJ, Circulating versus local renin angiotensin systems in cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 1988. 77:14-113.
40. Dzau VJ, Sasamura H, Hein L, Heterogeneity of angiotensin pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens*. 1993. 11:513-518.
41. Elton TS, Stephan TC, Taylor GR, Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992. 184:1067-1073.
42. Engeli S, Negrel R, Sharma AM, Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000. 35:1270-1277.
43. Epstein AN, Fitzsimons JT, Rolls BJ, Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. *J Physiol*. 1970. 210:457-474.
44. Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallant EA, Angiotensin-(1-7): A new hormone of the angiotensin system. *Hypertension*. 1991. 18:123-133.
45. Finnegan PM, Gleason BL, Combination ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers for hypertension. *Ann Pharmacother*. 2003. 37: 886-889.
46. Fischler MP, Follath F, Vergleichende Evaluation der ACE-Hemmer: Welche Unterschiede sind relevant? *Schweiz Med Wochenschr*. 1999. 129:1053-1060.
47. Fogari R, Ambrosoli S, Corradi L, Degli Esposti E, Mos L, Nami R, Nicrosini F, Pessina AC, Salvetti A, Vaccarella A, Zanchetti A, Martin A, Reeves RA, 24-hour blood pressure control by once-daily administration of irbesartan assessed by ambulatory blood pressure monitoring: Irbesartan Multicenter Investigators' Group. *J Hypertens*. 1997. 15:1511-1518.
48. Fox KM; EUROpean trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators, Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet*. 2003. 362:782-788.

49. Fridman K, Andersson OK, Wysocki M, Friberg P, Sunzel M, Acute effects of candesartan cilexetil (the new angiotensin II antagonist) on systemic and renal haemodynamics in hypertensive patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998. 54:497-501.
50. Gallinat S, Edling O, Unger Th, (1999): Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems. In: Dominiak P, Unger Th (Hrsg.): AT1-Rezeptorantagonisten Angiotensin II. Steinkopff, Darmstadt, 13-27.
51. Gallinat S, Edling O, Unger Th, (1999): Angiotensin-II-Rezeptoren. In: Dominiak P, Unger Th (Hrsg.): AT1-Rezeptorantagonisten Angiotensin II. Steinkopff, Darmstadt, 9-13.
52. Gallinat S, Busche S, Schütze S, Krönke M, Unger T, AT₂ receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett.* 1999. 443:75-79.
53. Gallinat S, Busche S, MK, Summers C, The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol.* 2000. 278:357-374.
54. Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P, Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes: an in situ hybridization study. *Hypertension.* 1994. 24:531-537.
55. Gaudet E, Blanc J, Elghozi JL, Role of angiotensin II and catecholamines in blood pressure variability responses to stress in SHR. *Am J Physiol.* 1996. 270:1265-1272.
56. Gehlert DR, Gackenheimer SL, Schober DA, Autoradiographic localization of subtypes of angiotensin II antagonist binding in the rat brain. *Neuroscience.* 1991. 44:501-514.
57. Gerstein HC, Reduction of cardiovascular events and microvascular complications in diabetes with ACE inhibitor treatment: HOPE and MIKRO-HOPE. *Diabetes Metab Res.* 2002.18:82-85.
58. GISSI-3: effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6-week mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'infarto Miocardico. *Lancet.* 1994. 343:1115-1122.
59. Goebel M, Muscha Steckelings U, Unger T, Was leisten ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten jenseits der Blutdrucksenkung. *J Hyperton.* 2004. 8:7-11.
60. Goulter AB, Goddard MJ, Allen JC, Clark KL, ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart. *BMC Med.* 2004. 2:19.

61. Gradman AH, Arcuri KE, Goldberg AI, Ikeda LS, Nelson EB, Snavely DB, Sweet CS, A randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel study of various doses of losartan potassium compared with enalapril maleate in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1995. 25:1345-1350.
62. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE, Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest*. 1991. 88:921-933.
63. Grammatopoulos TN, Johnson V, Moore SA, Andres R, Weyhenmeyer JA, Angiotensin type 2 receptor neuroprotection against chemical hypoxia is dependent on the delayed rectifier K⁺ channel, Na⁺/Ca²⁺ exchanger and Na⁺/K⁺ ATPase in primary cortical cultures. *Neurosci Res*. 2004. 50:299-306.
64. Griendling KK, Delafontaine P, Rittenhouse SE, Gimbrone MA Jr, Alexander RW, Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1987. 262:14555-14562.
65. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF, Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*. 1991. 17:626-635.
66. Grobecker H (1999): Physiologie und Biochemie des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). In: Grobecker H (Hrsg.): Angiotensin-II-Rezeptor-antagonisten. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 17-27.
67. Gross V, Schunck WH, Honeck H, Milia AF, Kärgel E, Walther T, Bader M, Inagami T, Schneider W, Luft FC. Inhibition of pressure natriuresis in mice lacking the AT₂ receptor. *Kidney Int*. 2000. 57:191-202.
68. Gutkind JS, Kurihara M, Castrén E, Saavedra JM, Increased concentration of angiotensin II binding sites in selected brain areas of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1988. 6:79-84.
69. Guo DF, Uno S, Inagami T, Steroid hormones upregulate rat angiotensin II type 1A receptor gene: Role of glucocorticoid responsive elements in rat angiotensin II type 1A promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995. 53:69-73.
70. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R, Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*. 1990. 70:1067-1116.
71. Hakam AC, Hussain T, Renal angiotensin II type-2 receptors are upregulated and mediate the candesartan-induced natriuresis/diuresis in obese Zucker rats. *Hypertension*. 2005. 45:270-275.

72. Han NL, Sim MK, Hypothalamic angiotensin receptor subtypes in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1998. 275:703-709.
73. Hamroff G, Katz SD, Mancini D, Blaufarb I, Bijou R, Patel R, Jondeau G, Olivari MT, Thomas S, Le Jemtel TH, Addition of angiotensin II receptor blockade to maximal angiotensin-converting enzyme inhibition improves exercise capacity in patients with severe congestive heart failure. *Circulation.* 1999. 99:990-992.
74. Harrison-Bernard LM, El-Dahr SS, O'Leary DF, Navar G, Regulation of Angiotensin II Type 1 Receptor mRNA and Protein in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension.* 1999. 33:340-346.
75. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators, Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MIKRO-HOPE substudy. *Lancet.* 2000. 355:253-259.
76. Hebert LA, Falkenheim ME, Nahman NS Jr, Cosio FG, O'Dorisio TM, Combination ACE inhibitor and angiotensin II receptor antagonist therapy in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 1999. 19:1-6.
77. Holwerda N, Fogari R, Angeli P, Porcellati C, Hereng C, Oddou-Stock P, Heath R, Bodin F, Valsartan, a new angiotensin II antagonist for the treatment of essential hypertension: efficacy and safety compared with placebo and enalapril. *J Hypertens.* 1996. 14:1147-1151.
78. Hricik DE, Browing PJ, Kopelman R, Goorno WE, Madias NF, Dzau VJ. Captopril-induced functional renal insufficiency in patients with bilateral renal-artery stenoses or renal-artery stenosis in a solitary kidney. *N Engl J Med.* 1983. 308:373-376.
79. Huang XC, Shenoy UV, Richards EM, Sumners C, Modulation of angiotensin II type 2 receptor mRNA in rat hypothalamus and brainstem neuronal cultures by growth factors. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997. 47:229-236.
80. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BLM, Inagami T, Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 1995. 377:748-750.
81. Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K and Takeshita A, Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension.* 1998. 31:342-348.

82. Inagami T, Eguchi S, Numaguchi K, Motley ED, Tang H, Matsumoto T, Yamakawa T, Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. *J Am Soc Nephrol.* 1999. 10:57-61.
83. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet.* 1995. 345:669-685.
84. Israel A, Strömberg C, Tsutsumi K, Garrido MDR, Torres M, Saavedra JM, Angiotensin II receptor subtypes and phosphoinositide hydrolysis in rat adrenal medulla. *Brain Res Bull.* 1995. 38:441-446.
85. Iwai N, Inagami T, Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* 1992. 298:257-260.
86. Iwai N, Inagami T, Ohmichi N, Nakamura Y, Saeki Y, Kinoshita M, Differential regulation of rat AT1a and AT1b receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992. 188:298-303.
87. Jezova D, Ochedalski T, Kiss A, Aguilera G, Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol.* 1998. 10:67-72.
88. Jöhren O, Inagami T, Saavedra JM, AT1A, AT1B, and AT2 angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain. *Neuroreport.* 1995. 6:2549-2552.
89. Jöhren O, Saavedra JM, Expression of AT_{1A} and AT_{1B} angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-week-old rats. *Am J Physiol.* 1996. 271:104-112.
90. Jöhren O, Saavedra JM, Gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the cerebellar cortex of young rats. *Neuroreport.* 1996. 7:1349-1352.
91. Jöhren O, Golsch C, Dendorfer A, et al., Differential expression of AT₁ receptors in the pituitary and adrenal gland of SHR and WKY. *Hypertension.* 2003. 41:984-990.
92. Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC and Neill JD, Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: Differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992. 31:1090-1096.
93. Kambayashi Y, Nagata K, Ichiki T, Inagami T, Insulin and insulin-like growth factors induce expression of angiotensin type-2 receptor in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem.* 1996. 239:558-565.

94. Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Aviram M, Oxidative stress increases the expression of the angiotensin-II receptor type 1 in mouse peritoneal macrophages. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2002. 3:24-30.
95. Keller-Wood ME, Dallman MF, Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev.* 1984. 5:1-24.
96. Kijima K, Matsubara H, Murasawa S, Maruyama K, Mori Y, Inada M, Gene transcription of angiotensin II type 2 receptor is repressed by growth factors and glucocorticoids in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995. 216:359-366.
97. Kijima K, Matsubara H, Murasawa S, Mechanical stretch induces enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 1996. 79:887-897.
98. Kloner RA, Birnbaum Y. *Cardiovascular Trials Review.* 7th Edition. Le Jacq Communications Inc., CT, 2002.
99. Knardahl S, Hendley ED, Association between cardiovascular reactivity to stress and hypertension and behavior. *Am J Physiol.* 1990. 259:248-257.
100. Lacourcière Y, The incidence of cough: a comparison of lisinopril, placebo and telmisartan, a novel angiotensin II antagonist. *Int J Clin Pract.* 1999. 53:99-103.
101. Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK, Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol.* 1995. 48:601-609.
102. Lenkei Z, Corvol P, Llorens-Cortes C, The angiotensin receptor subtype AT1A predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control. *Mol Brain Res.* 1995. 30:53-60.
103. Lenkei Z, Nuyt AM, Grouselle D, Corvol P, Llorens-Cortes C, Identification of endocrine cell populations expressing the AT_{1B} subtype of angiotensin II receptors in the anterior pituitary. *Endocrinology.* 1999. 140:472-477.
104. Leong DS, Terron JA, Falcon-Neri A, Armando I, Ito T, Jöhren O, Tonelli LH, Hoe KL, Saavedra JM, Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. *Neuroendocrinology.* 2002. 75:227-240.
105. Leonhardt H, Krisch B, Zilles K, (1987): Graue und weiße Substanz des Zwischenhirns. In: Tillmann B, Töndury G, Zilles K (Hrsg.): *Anatomie des*

- Menschen. Band III. Nervensystem und Sinnesorgane. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 319-370.
106. Leri A, Liu Y, Li BS, Fiordaliso F, Malhotra A, Latini R, Kajstura J, Anversa P, Up-regulation of AT(1) and AT(2) receptors in postinfarcted hypertrophied myocytes and stretch-mediated apoptotic cell death. *Am J Pathol.* 2000. 156:1663-1672.
 107. Leung KH, Smith RD, Pieter, Timmermans BM, Chiu AT, Regional distribution of the two subtypes of angiotensin II receptor in rat brain using selective nonpeptide antagonists. *Neurosci Lett.* 1991. 123:95-98.
 108. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD, The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* 1993. 329:1456-1462.
 109. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I; Collaborative Study Group. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001. 345:851-860.
 110. Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A; SCOPE Study Group. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens.* 2003. 21:875-886.
 111. Livett BG, Marley PD, Wan DC, Zhou XF, Peptide regulation of adrenal medullary function. *J Neurol Transm.* 1990. 29:77-89.
 112. Llorens-Cortes C, Greenberg B, Huang H, Corvol P, Tissular expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Hypertension.* 1994. 24:538-548.
 113. Löffler G, (1997): Analyse der Basensequenz von Nucleinsäuren. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 168.
 114. Mancina R, Susini T, Renzetti A, Forti G, Razzoli E, Serio M, Maggi M, Sex steroid modulation of AT₂ receptors in human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996. 81:1753-1757.
 115. Mazzolai L, Burnier M, Comparative safety and tolerability of angiotensin II receptor antagonists. *Drug Safety.* 1999. 21:23-33.
 116. McDougall SJ, Paull JR, Widdop RE, Lawrence AJ, Restraint stress: differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000. 35:126-129.

117. McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, Tsuyuki RT, White M, Rouleau J, Latini R, Maggioni A, Young J, Pogue J, Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure. Randomized Evaluation of Strategies for Left Ventricular Dysfunction (RESOLVD) Pilot Study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation*. 1999. 100:1056-1064.
118. McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K, Granger CB, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Yusuf S, Pfeffer MA; CHARM Investigators and Committees, Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet*. 2003. 362:767-771.
119. Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T, The angiotensin AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1996. 122:59-67.
120. Mento PF, Pica ME, Hilepo J, Chang J, Hirsch L, Wilkes BM, Increased expression of glomerular AT₁-receptors in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1998. 1247-1253.
121. Mooser V, Nussberger J, Juillerat L, Burnier M, Waeber B, Bidiville J, Pauly N, Brunner HR. Reactive hyperreninemia is a major determinant of plasma angiotensin II during ACE inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990. 15:276-282.
122. Murasawa S, Matsubara H, Kijima K, Maruyama K, Ohkubo N, Mori Y, Iwasaka T, Inada M, Down-regulation by cAMP of angiotensin II type 2 receptor gene expression in PC12 cells. *Hypertens Res*. 1996. 19:271-279.
123. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H, Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*. 2002. 39:316-322.
124. Neutel J, Weber M, Pool J, Smith D, Fitzsimmons S, Chiang YT, Gatlin M, The efficacy and safety of valsartan compared with placebo in the treatment of essential hypertension. *Clin Ther*. 1996. 18:797-810.
125. Newton CR, Graham A (1994): Geräte, Reagentien und Hilfsmittel – Puffer und MgCl₂. In: Newton CR (Hrsg.): PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, 35-36.

126. Nickenig G, Murphy TJ, Down-regulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression. *Mol Pharmacol.* 1994. 46:653-659.
127. Nickenig G, Oliver J, Strehlow K, Zolk O, Linz W, Scholkens BA, Bohm M, Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT₁-receptor expression. *Am J Physiol.* 1997. 272:2701-2707.
128. Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Bohm M et al., Estrogen modulates AT₁-receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation.* 1998. 97:2197-2201.
129. Nickenig G, Harrison DG, The AT(1)-Type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part II: AT(1) receptor regulation. *Circulation.* 2002. 105:530-536.
130. Nishimura Y, Ito T, Hoe K, Saavedra JM, Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT(1) receptor antagonist candesartan blocks brain AT(1) receptors. *Brain Res.* 2000. 871:29-38.
131. Obermüller N, Unger Th, Culman J, Gohlke P, de Gasparo M, Bottari SP, Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei. *Neurosci Lett.* 1991. 132:11-15.
132. Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P, Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria Study Group, The effects of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001. 345:870-878.
133. Peach MJ, Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1977. 57:313-370.
134. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye´ LA, Basta L, Brown EJ Jr, Cuddy TE, Basta L, Brown EJ Jr, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al., Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med.* 1992. 327:669-677.
135. Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S; CHARM Investigators and Committees, Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet.* 2003. 362:759-766.

136. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM, Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial Investigators, Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med.* 2003. 349:1893-1906.
137. Phillips MI, Sumner C, Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept.* 1998. 78:1-11.
138. Pitt B, Segal R, Martinez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I, Deedwania PC, Ney DE, Snively DB, Chang PI, Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan In The Elderly study, ELITE). *Lancet.* 1997. 349:747-752.
139. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klingler GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B, Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial: the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet.* 2000. 355:1582-1587.
140. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH, Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res.* 1996. 79:748-756.
141. PROGRESS Collaborative Group, Randomized trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6.105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet.* 2001. 358:1033-1041.
142. Pryde PG, Sedman SB, Nugent CE, Barr MJ, Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy. *J Am Soc Nephrol.* 1993. 3:1575-1582.
143. Raasch W, Jöhren O, Schwartz S, Gieselberg A, Dominiak P, Combined blockade of AT₁-receptors and ACE synergistically potentiates antihypertensive effects in SHR. *J Hypertens.* 2004. 22:459-462.
144. Raizada MK, Sumners C, Lu D, Angiotensin II type 1 receptor mRNA levels in the brains of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Neurochem.* 1993. 60: 1949-1952.
145. Reid JL, ACE inhibitors: future perspectives. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993. 22:41-43.

146. Rosa FW, Bosco LA, Fossum-Graham C, Milstein JB, Dreis M, Creamer J, Neonatal anuria with maternal angiotensin-converting enzyme inhibition. *Obstet Gynecol.* 1989. 74:371-374.
147. Russo D, Pisani A, Balletta MM, De Nicola L, Savino FA, Andreucci M, Minuloto R, Additive antiproteinuric effect of converting enzyme inhibitor and losartan in normotensive patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 1999. 33:851-856.
148. Saavedra JM, Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev.* 1992. 13:329-380.
149. Saavedra JM, Häuser W, Ciuffo G, Egidy G, Hoe KL, Jöhren O, Sembonmatsu T, Inagami T, Sarmando A, Increased AT₁ receptor expression and mRNA in kidney glomeruli of AT₂ receptor gene-disruptes mice. *Am J Physiol.* 2001. 280:71-78.
150. Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Juorio A, Macova M, Anti-stress and anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT₁ receptor antagonists. *Regul Pept.* 2005. 128:227-238.
151. Saiki Y, Watanabe T, Tan N, Matsuzaki M, Nakamura S, Role of central ANG II in stress-induced cardiovascular and hyperthermic responses in rats. *Am J Physiol.* 1997. 272:26-33.
152. Sanvitto GL, Jöhren O, Häuser W, Saavedra JM, Water deprivation upregulates ANG II AT₁ binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1997. 273:156-163.
153. Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ, Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992. 185:253-259.
154. Schelling P, Felix D, Influence of captopril treatment on angiotensin II receptors and angiotensinogen in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1983. 5:935-942.
155. Schiffrin EL, Gutkowska J, Genest J, Effect of angiotensin II and deoxycorticosterone infusion on vascular angiotensin II receptors in rats. *Am J Physiol.* 1984. 246:608-614.
156. Sedman AB, Kershaw DB, Bunchman TE, Recognition and management of angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy. *Pediatr Nephrol.* 1995. 9:382-385.
157. Seltzer A, Bregonzio C, Armando I, Baiardi G, Saavedra JM. Oral administration of an AT₁ receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 2004. 1028:9-18.

158. Shanmugam S, Lenkei ZG, Gasc JM, Corvol PL, Llorens-Cortes, Ontogeny of angiotensin II type 2 (AT₂) receptor mRNA in the rat. *Kidney Int.* 1995. 47:1095-1100.
159. Shibata K, Makino I, Shibaguchi H, Niwa M, Katsuragi T, Furukawa T, Up-regulation of angiotensin type 2 receptor mRNA by angiotensin II in rat cortical cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. 239:633-637.
160. Shibata K, Ikuko M, Inoue K, Katsuragi T, Muscarinic acetylcholine receptor-mediated increase of angiotensin type 2 receptor mRNA in PC12 cells. *Neuroreport.* 1998. 9:3783-3789.
161. Song K, Allen AM, Paxinos G, Mendelsohn FA, Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J Comp Neurol.* 1992. 316:467-484.
162. Steckelings U, Obermüller N, Bottari SP, Quadri F, Veltmar A, Unger T, Brain angiotensin: receptors actions and possible role in hypertension. *Pharmacol Toxicol.* 1992. 70:23-27.
163. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Quadri F, Veltmar A, Unger T, The angiotensin AT₂ receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995. 95:651-657.
164. Swedberg K, Kjekshus J, Snapinn S, Long-term survival in severe heart failure in patients treated with enalapril. Ten year follow-up of CONSENSUS I. *Eur Heart J.* 1999. 20:136-139.
165. Swedberg K, Pfeffer M, Granger C, Held P, McMurray J, Ohlin G, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Candesartan in heart failure-assessment of reduction in mortality and morbidity (CHARM): rationale and design. *Charm-Programme Investigators. J Card Fail.* 1999. 5:276-282.
166. Tamura M, Wanaka Y, Landon EJ, Inagami T, Intracellular sodium modulates the expression of angiotensin II subtype 2 receptor in PC12W cells. *Hypertension.* 1999. 33:626-632.
167. Tang SS, Loscalzo J, Dzau VJ, Tissue plasminogen activator activates renin angiotensin in vitro. *J Vasc Med Biol.* 1989. 1:67-74.
168. The GISEN Group, Randomised placebo-controlled trial of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. *Lancet.* 1997. 349:1857-1863.

169. Timmermanns PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 1993. 45:205-251.
170. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ, A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000. 275:33238-33243.
171. Tissir F, Riviere M, DF, Tsuzuki S, Inagami T, Levan G, Szpirer J, Szpirer C, Localization of the genes encoding the three rat angiotensin II receptors, Agtr1a, Agtr1b, Agtr2, and the human AGTR2 receptor respectively to rat chromosomes 17q12, 2q24 and Xq34, and the human Xq22. *Cytogenet Cell Genet.* 1995. 71:77-80.
172. Tsutsumi K, Saveedra JM, Angioten-II receptor subtypes in fetal tissue of the rat; autoradiography, guanine nucleotide sensitivity, and association with phosphoinoside hydrolysis. *Endocrinology.* 1991. 129:1075-1082.
173. Tsutsumi K, Saveedra JM, Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol.* 1991. 261:209-216.
174. Unger Th, Badoer E, Ganten D, Lang RE, Rettig R, Brain angiotensin: pathways and pharmacology. *Circulation.* 1988. 77:140-154.
175. Unger Th, Gohlke P, Paul M, Rettig R, Tissue renin angiotensin System: fact or fiction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991. 19:20-25.
176. Unger T, The ongoing temisartan alone and in combination with ramipril global endpoint trial program. *Am J Cardiol.* 2003. 91: 28-34.
177. Urata H, Konoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A, Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem.* 1990. 265:22348-22357.
178. Van Rijnsoever EW, Kwee-Zuiderwijk WJ, Feenstra J, Angioneurotic edema attributed to the use of losartan. *Arch Intern Med.* 1998. 158:2063-2065.
179. Veerasingham SJ, Raizada MK, Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br J Pharmacol.* 2003. 139:191-202.
180. Velazquez EJ, Pfeffer MA, McMurray JV, Maggioni AP, Rouleau JL, Van de Werf F, Kober L, White HD, Swedberg K, Leimberger JD, Gallo P, Sellers MA, Edwards S, Henis M, Califf RM; VALIANT Investigators, VALsartan In Acute myocardial iNfarcTion (VALIANT) trial: baseline characteristics in context. *Eur J Heart Fail.* 2003. 5:537-544.

181. Viswanathan M, Saavedra JM, Expression of angiotensin II AT₂ receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides*.1992.13:783-786.
182. Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmitko P, Li RK, Mickle DA, Verma S, C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation*. 2003.107:1783-1790.
183. Wang DH, Qiu J, Hu Z, Differential regulation of angiotensin II receptor subtypes in the adrenal gland: role of aldosterone. *Hypertension*. 1998. 32:65-70.
184. Weber KT, Sun Y, Campbell SE, Structural remodelling of the heart by fibrous tissue: Role of circulating hormones and locally produced peptides. *Eur Heart J*. 1995. 16:12-18.
185. Weber KT, Sun Y, Katwa LC, Cleutjens JPM, Connective tissue - a metabolic entity. *J Mol Cell Cardiol*. 1995. 27:107-120.
186. Weir MR, Elkins M, Liss C, Vrecenak AJ, Barr E, Edelman JM, Efficacy, tolerability, and quality of life of losartan, alone or with hydrochlorothiazide, versus nifedipine GITS in patients with essential hypertension. *Clin Ther*. 1996. 18:411-428.
187. Wilson KM, Magargal W, Berecek KH, Long-term captopril treatment. Angiotensin II receptors and responses. *Hypertension*. 1988. 11:148-152.
188. Wintroub BU, Klickstein LB, Watt DW, A human neutrophil dependent pathway for generation of Ang II. *J Clin Invest*. 1981. 68:484-490.
189. Wong PC, Hart SD, Zaspel AM, Chiu AT, Ardecky RJ, Smith RD, Timmermanns PB, Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DuP753 (AII-1) and PD123177 (AII-2). *J Pharmacol Exp Ther*. 1990. 255:584-592.
190. Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW, The angiotensin IV system: Functional implications. *Front Neuroendocrinol*. 1995. 16:23-52.
191. Wyse B and Sernia C, Growth hormone regulates AT-1a angiotensin receptors in astrocytes. *Endocrinology*. 1997. 138:4176-4180.
192. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ, Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Acad Sci USA*. 1996. 93:156-160.
193. Yang G, Xi ZX, Wan Y, Wang H, Bi G, Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. *Biol Signals*. 1993. 2:166-172.
194. Yang HY, Erdos EG, Levin Y, A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta*. 1970. 214:374-376.

195. Ye MQ, Healy DP, Characterization of an angiotensin type-1 receptor partial cDNA from rat kidney: evidence for a novel AT1B receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992. 29:204-210.
196. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G, Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000. 342:145-153.
197. Yusuf S, From the HOPE to the ONTARGET and the TRANSCEND studies: challenges in improving prognosis. *Am J Cardiol.* 2002. 89:18-26.
198. Zanchetti A, Omboni S, DiBaggio C, on behalf of the Study Group. Candesartan cilexetil and enalapril are of equivalent efficacy in patients with mild to moderate hypertension. *J Hum Hypertens.* 1997. 11:57-59.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

- *Name* Inga Voges
- *Familienstand* ledig
- *Nationalität* deutsch
- *Geburtsdatum* 02.06.1975
- *Geburtsort* Braunschweig
- *Eltern* Kurt Voges
Hannelore Voges, geb. Hampel

Schulbildung

- *1981 – 1985* Grundschule Lindenberg in Braunschweig
- *1985 – 1987* Orientierungsstufe Lindenberg in Braunschweig
- *1987 – 1991* Realschule des Schulzentrums Heidberg in Braunschweig
- *1992 – 1996* Hainberg-Gymnasium in Göttingen
- *Mai 1996* Abitur

Hochschulbildung

- *Oktober 1996* Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
- *Oktober 1998* Ärztliche Vorprüfung
- *September 1999* Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- *Oktober 2001* Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- *Oktober 2001 – September 2002* Praktisches Jahr
 - Innere Medizin: Universität zu Lübeck
 - Chirurgie: Asklepios Klinik Bad Oldesloe, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität zu Lübeck
 - Pädiatrie: Kantonsspital Winterthur, Schweiz
- *Oktober 2002* Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Abschluss des Medizinstudiums

Berufstätigkeit

- *Dezember 2002 – Juni 2004* Ärztin im Praktikum an der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock
- *Seit Juni 2004* Assistenzärztin an der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock, Abteilung für Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin

Promotion

- *Seit 1999* Am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Durchführung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. P. Dominiak danke ich für die Überlassung des Themas und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. W. Raasch für die gute Betreuung dieser Arbeit. Durch die anregenden Diskussionen sowie die kritische und konstruktive Durchsicht des Manuskripts konnte er entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beitragen.

Herrn Dr. rer. nat. O. Jöhren danke ich für die Einarbeitung in die Methodik und seine vielfältigen Anregungen.

Ferner möchte ich mich für die Überlassung der Organe der spontan hypertensiven Ratten aus den funktionellen Untersuchungen von Herrn S. Schwartz bedanken.

Den Mitarbeitern und technischen Angestellten des Instituts für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und immer währende Hilfsbereitschaft.