

**Aus dem Institut für
Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Toxikologie
Kommissarische Leitung: Professor Dr. Helga Stopper**

Neuronale Genotoxizität von Angiotensin II

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Malte Tim Kircher

aus Münster

Stadtbergen, Mai 2020

Referenten

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

Korreferentin: Prof. Dr. med. Stefanie Hahner

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2020

Der Promovend ist Arzt

Widmung

Für Morayma,
für Elias und Raphael,
und für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

REFERENTEN	II
WIDMUNG	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 OXIDATIVER STRESS.....	1
1.2 DAS RENIN – ANGIOTENSIN – ALDOSTERON – SYSTEM	9
1.3 HYPERTONIE	17
1.4 ZIEL DER ARBEIT	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 MATERIAL	22
2.2 <i>IN VITRO</i> : ZELLINIEN	25
2.3 <i>IN VIVO</i> : TIERMODELL	26
2.4 METHODEN	27
2.5 STATISTIK	45
3 ERGEBNISSE	46
3.1 ETABLIERUNG EINER POSITIVKONTROLLE.....	46
3.2 AT-II-INDUZIERTER DNA-SCHÄDIGUNG.....	47
3.3 AT-II-INDUZIERTER SUPEROXIDGENERATION	50
3.4 SCHUTZ VOR AT-II-IND. DNA-SCHÄDEN DURCH NOX-INHIBITION	52
3.5 SCHUTZ VOR AT-II-INDUZIERTEN DNA-SCHÄDEN DURCH AT ₁ R-ANTAGONISIERUNG	53
3.6 AT-II-INDUZIERTER GLUTATHION-DEPLETION	54
3.7 GLUTATHION-STATUS NACH AT ₁ R-INHIBITION/-ANTAGONISIERUNG	55
3.8 GENEXPRESSIONSANALYSE NACH AT-II-BEHANDLUNG	57
3.9 AUSWIRKUNG VON AT-II AUF DAS MURINE SUBFORNIKALORGAN	59
4 DISKUSSION	63
4.1 OXIDATIVER STRESS, HYPERTONUS UND DEMENZ	63
4.2 DOSISABHÄNGIGE, NOX-VERMITTELTE GENOTOXIZITÄT VON AT-II ÜBER BINDUNG AN DEN AT ₁ -REZEPTOR	64
4.3 ZYTOTOXIZITÄT VON AT-II	65
4.4 AT-II-INDUZIERTER GLUTATHION-VERÄNDERUNGEN	66
4.5 AT ₁ R-UNABHÄNGIGE GENOTOXIZITÄT VON AT-II	68
4.6 SCHÄDIGUNGSMECHANISMEN VON AT-II IM GEHIRN.....	69
5 ZUSAMMENFASSUNG	72
5.1 ZUSAMMENFASSUNG.....	72
5.2 SUMMARY.....	74
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	75
DANKSAGUNG.....	IX
LEBENS LAUF	X
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	XI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Renin - Angiotensin - Aldosteron – System.	10
Abbildung 2: Für AT-II zugängige Gehirnareale.....	15
Abbildung 3: Hirneigenes RAAS und Mikroglia-Polarisation.....	16
Abbildung 4: Entstehungsweg der DNA-Schädigung durch AT-II.....	20
Abbildung 5: Schema Mausgehirn coronar.	29
Abbildung 6: MMS-Verdünnungsreihe.	47
Abbildung 7: DNA-Schädigung durch AT-II.....	48
Abbildung 8: Mikrokernfrequenz nach AT-II-Behandlung.	49
Abbildung 9: Mikrokernfrequenz nach AT-II-Behandlung #2.	50
Abbildung 10: Superoxidgeneration durch AT-II.	51
Abbildung 11: Mikrokernfrequenz nach AT-II-Behandlung mit / ohne NOX-Inhibition.....	52
Abbildung 12: DNA-Schäden nach AT-II-Behandlung mit / ohne AT ₁ R-Blockade.....	53
Abbildung 13: Reaktion von reduziertem / oxidiertem Glutathion auf AT-II-Beh..	55
Abbildung 14: AT-II-Wirkung mit/ohne AT ₁ R-/NOX-Inh./Radikalfänger auf Glutathion	56
Abbildung 15: Genexpression des Haushaltgens β -Actin nach AT-II-Behandlung.	57
Abbildung 16: Genexpression von Ogg1 und PARP-1 nach AT-II-Behandlung.	58
Abbildung 17: Genexpression von HO-1 und GPx1 nach AT-II-Behandlung.	58
Abbildung 18: Coronarer Schnitt durch das Mäusehirn (oben); Nahaufnahme Subfornikalorgan (SFO, unten).	59
Abbildung 19: γ -H2AX Positivität muriner SFO-Zellen (Wildtyp / AT _{1a} R-KO) nach AT-II-Behandlung.	61
Abbildung 20: γ -H2AX Färbungen SFO-Schnitte.....	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.	22
Tabelle 2: Puffer/Lösungen Glutathion Assay.....	22
Tabelle 3: Puffer/Lösungen NBT-Assay.....	23
Tabelle 4: Puffer/Lösungen TBARS-Assay.	23
Tabelle 5: Zusammensetzung PCR-Gel.	23
Tabelle 6: Puffer/Lösungen Comet Assay.....	23
Tabelle 7: Puffer/Lösungen γ -H2AX-Färbungen.....	24
Tabelle 8: Übersicht Tierversuch.....	26
Tabelle 9: Ansatz für die RT-PCR.....	41
Tabelle 10: Verwendete Primer.....	42
Tabelle 11: Optimale PCR-Temperatur und -Zyklen für verwendete Primer.	42
Tabelle 12: PCR-Ansatz.....	43
Tabelle 13: Auflistung Anzahl vergleichbarer SFO-Schnitte.	60

Abkürzungsverzeichnis

(P)RR	(Pro)Renin Rezeptor
•OH	Hydroxylradikal
8-oxo	8-oxoguanine, 8-Hydroxyguanin (Guanin-Analog)
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACE-I	ACE-Inhibitor
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AD	Alzheimer disease; Alzheimer Krankheit; Morbus Alzheimer
AGEs	Advanced Glycation End Products
AP	Area postrema
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Blocker
AT-1-7	Angiotensin-(1-7)
AT _{1a} R	(muriner) AT _{1a} -Rezeptor
AT _{1b} R	(muriner) AT _{1b} -Rezeptor
AT ₁ R	AT ₁ -Rezeptor
AT ₂ R	AT ₂ -Rezeptor
AT-I	Angiotensin I
AT-II	Angiotensin II
BckADH	Branched-Chain Ketoacid Dehydrogenase
BHS	Bluthirnschranke
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Comet Assay
Cand	Candesartan
CAT	Catalase; Katalase
cDNA	Complementary DNA; Komplementäre DNA
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Octane, auch TEDA (Triethylendiamin)
DAG	Diacylglycerol
DhoDH	Dihydroorotate Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure); „Ellman's Reagenz“
EGF(R)	Epidermal Growth Factor (Receptor)
ERK	Extracellular-Signal regulated Kinase
ETFQO	Electron Transfer Flavoprotein Oxidoreductase
FDA	Food and Drug Administration
G3PDH	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSR	Glutathion-Disulfid Reduktase
GSSG	Glutathion-Disulfid (oxidiertes Glutathion)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HNE	Hydroxynonenal
HO	Hämoxxygenase
HWZ	Halbwertszeit
IP3	Inositoltriphosphat
JAK	Januskinase
KO	Knock-Out
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase
MDA	Malondialdehyd
MN	Micronucleus; Mikrokern
mtDNA	Mitochondriale DNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NAPDH	Nicotinamid-Adeninindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazolium

NF-κB	Nuclear Factor κB
NOX	NAD(P)H-Oxidase
NTS	Nucleus tractus solitarii
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikal/Superoxidanion
ODH	2-Oxoglutarate Dehydrogenase
Ogg1	8-Oxoguanine Glycosylase
ONOO-	Peroxinitrit
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate-buffered Saline; Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PD	Parkinson's Disease; Morbus Parkinson
PDH	Pyruvate Dehydrogenase
P-gp	P-Glykoprotein
PI	Proliferationsindex
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
ProDH	Proline Dehydrogenase
PVN	Paraventriculäre Nuclei
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGE	Rezeptor für AGEs
RNA	Ribonukleinsäure
R-OOH	Organische Hydroperoxide
ROS	Reactive oxygen species; Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S6K	S6-Kinase
SFO	Subfornikalorgan
SOD	Superoxiddismutase
SON	Supraoptische Nuclei
SQR	Succinate:Quinone Reductase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TCA cycle	Tricarboxylic Acid Cycle
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure
UV	Ultraviolett
VaD	Vaskuläre Demenz
VLM	Rostral ventrolaterale medulla
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVO	Zirkumventrikuläres Organ

1 Einleitung

1.1 Oxidativer Stress

Das Konzept von oxidativem Stress wurde 1985 erstmalig umfassend durch Helmut Sies beschrieben, der von einer „Störung der pro- und anti-oxidativen Balance zugunsten der pro-oxidativen Seite“ sprach [1]. Konkret wird dieses Ungleichgewicht charakterisiert durch das Vorliegen von erhöhten Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), chemischen Verbindungen mit hochreaktiven Sauerstoffradikalen und Sauerstoffverbindungen [2].

Der Ursprung dieser ROS kann in exogenen oder endogenen Faktoren liegen [3, 4]. Quellen exogen-induzierter ROS sind mannigfaltig und können unter anderem über Nahrung aufgenommene Partikel, photo-oxidativer Stress (UV-A, UV-B), Radioaktivität, Schwermetalle oder Umweltgifte sein [5]. Der überwiegende Teil der endogen produzierten ROS in menschlichen Zellen hat seinen Ursprung in den Mitochondrien [6-9]. Hier wird als letzter biochemischer Schritt der Energiegewinnung über die Atmungskette Sauerstoff mit Wasserstoff zu Wasser reduziert. Aufgrund chemischer Ineffizienzen konvertieren jedoch Teile des molekularen Sauerstoffs chronisch zu ROS [10].

Zu den häufigsten auf diese Weise entstandenen ROS zählen Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($\bullet OH$) [11]. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität können ROS prinzipiell mit allen intra- und extrazellulären Strukturen reagieren, und verursachen insbesondere bei chronisch erhöht vorliegenden ROS-Konzentrationen dauerhafte Schäden [12]. Diese enorme Reaktivität macht die meisten ROS sehr kurzlebig. Das Hydroxylradikal beispielsweise hat eine *in vivo* Halbwertszeit (HWZ) von nur 10^{-9} Sekunden [13]. Daraus ergibt sich ein zeitlicher und örtlicher Charakter der ROS, denn an der Lokalisation ihrer Entstehung ist der ausgelöste oxidative Stress auch am größten. Für H_2O_2 trifft dies jedoch nur bedingt zu, da H_2O_2 deutlich stabiler ist, enzymatisch reguliert wird, und es vom Entstehungsort

wegdiffundieren und dementsprechend mit einem Zielmolekül an anderer Lokalisation reagieren kann [5].

1.1.1 Auswirkungen von oxidativem Stress auf Biomoleküle

Makromoleküle wie Proteine, Lipide oder Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) können durch den Kontakt mit ROS beeinflusst, in ihrer Struktur verändert und dadurch letztlich geschädigt werden [14].

Seitenketten von Aminosäuren, speziell die Schwefelelemente von Cystein und Methionin, sind besonders anfällig für Interaktionen mit ROS [15]. Proteine, Konglomerate aus bis zu tausenden Aminosäuren, können so ihre ursprüngliche Struktur und Funktion verlieren [16-18]. Über diese Strukturveränderungen wird die Akkumulation von unlöslichen Proteinaggregaten gefördert, die mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert ist [19]. ROS-induzierte Veränderungen der Proteinstruktur sind zudem mitbeteiligt an der Entstehung von *Advanced Glycation End-products* (AGE) [20]. AGE haben toxische Effekte und sind ihrerseits ebenso mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert [21]. Es wird vermutet, dass AGE über einen Rezeptor (RAGE) selbst oxidativen Stress auslösen können („glyco-oxidative stress“).

Weitreichende Folgen kann auch eine Lipidperoxidation haben, die oxidative Degradation von Fetten. Vor allem ungesättigte Fettsäuren sind anfällig für die durch ROS verursachten, strukturellen Schäden [18]. Insbesondere Phospholipide reagieren hochsensibel auf ROS, was zu Problemen der Zellmembranintegrität führen kann [22]. Eines der Produkte der ROS-induzierten Oxidation von Fetten ist Malondialdehyd (MDA), ein hochreaktives Dialdehyd, das in Bakterien und Säugerzellen eine mutagene, in Ratten eine karzinogene Wirkung hat [23]. Die Konzentration an MDA kann quantifiziert werden, was MDA zu einem beliebten Biomarker der Lipidperoxidation macht. Das ebenfalls mutagene 4-Hydroxynonenal (HNE) ist ein weiteres schädliches Produkt der Lipidperoxidation, welches ebenfalls als Biomarker Verwendung findet [22].

Folgeschwere Konsequenzen kann eine Erbgutveränderung aufgrund von ROS-induzierten DNA-Einzel- beziehungsweise DNA-Doppelstrangbrüchen nach sich ziehen [24]. Insbesondere mitochondriale DNA (mtDNA) ist anfällig für Genomschädigungen, da die Erkennungsrate von Mutationen durch mitochondriale DNA-Reparaturenzyme im Vergleich zu den im Zellkern lokalisierten chromosomalen Reparaturenzymen deutlich niedriger liegt. Die mtDNA ist zudem nicht von den schützenden und stabilisierenden Histonen umgeben [25]. Als Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen kommt es im Zellkern unter anderem zu einer Phosphorylierung des Histons H2AX unter Entstehung von γ -H2AX, einem gängigen Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche. Durch den Nachweis von γ -H2AX können Doppelstrangbrüche lokalisiert und quantifiziert werden [24, 26]. Die für oxidativen Stress anfälligste DNA-Base ist Guanin und die häufigste mutagene DNA-Veränderung ist eine Basenmodifikation mit dem Guanin-Analog 8-Hydroxyguanin (8-oxo). 8-oxo paart sich mit Adenin statt mit Cytosin und kann so eine Transversionsmutation nach der Replikation auslösen [27], welche sich in mehreren mutierten Onko- und Tumorsuppressorgenen findet [28-31]. Da die Konzentration von 8-oxo mit der Konzentration von ROS korreliert [32], ist 8-oxo ein weiterer beliebter Biomarker für oxidativen Stress [33].

ROS haben jedoch nicht nur eine schädigende Wirkung auf Biomoleküle. Sie sind beteiligt an der Steuerung von physiologischem Zellwachstum [34], einer balancierten Inflammationsreaktion [35], und sie modulieren die Genexpression [34, 36]. In den phagozytierenden Zellen des Immunsystems werden ROS beim „oxidativen Burst“ zur Zerstörung von Pathogenen verwendet [23, 37]. Zudem sind sie beteiligt an der Nekrose- und Apoptose-Induktion sowie der Steuerung der Proteaseaktivität über verschiedene zelluläre Signalwege wie der Inhibierung von Phosphatasen, Kinasen-Aktivierung oder der Regulation von Ionenkanälen [37-40]. Die als Neuroplastizität bezeichneten adaptiven Veränderungen des zentralen Nervensystems (ZNS) und die Aufrechterhaltung einer physiologischen Gedächtnisfunktion werden ebenfalls durch ROS mitreguliert [41]. All diese physiologischen ROS-Funktionen müssen selbstverständlich im Kontext einer

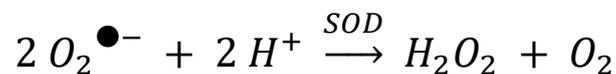
streng regulierten Homöostase aus ROS und anti-oxidativen Faktoren verstanden werden.

1.1.2 Antioxidantien

Antioxidantien sind Radikalfänger und können die Oxidation anderer Substanzen durch ROS verlangsamen, verhindern oder rückgängig machen [5]. Der Körper besitzt mit der Superoxiddismutase (SOD), dem Glutathion-System sowie der Katalase (Catalase, CAT) drei große Systeme zur Neutralisierung von ROS. Weitere enzymatische und nicht-enzymatische Systeme agieren ebenfalls als Antioxidantien. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten Antioxidantien gegeben werden.

1.1.2.1 Superoxiddismutase

Die SOD katalysiert den Abbau von Superoxidradikalen zu O_2 und dem weniger reaktiven H_2O_2 [42, 43].

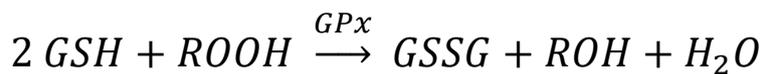
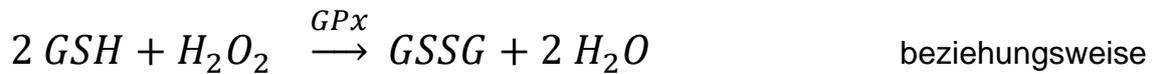


Von den drei bekannten Isoformen sind SOD1 und SOD2 intrazellulär und lediglich SOD3 extrazellulär lokalisiert [43]. Die SOD stellt gewissermaßen die erste „Verteidigungslinie“ gegen ROS dar [44].

1.1.2.2 Glutathionperoxidase

Die Glutathionperoxidase (GPx) ist Teil des zweiten großen anti-oxidativen Systems, dem Glutathion-System. Sie kommt in acht Isoformen vor (GPx1-8), die alle den Abbau von H_2O_2 / organischen Hydroperoxiden (ROOH) zu H_2O , unter

Verwendung der Schwefel-Wasserstoffbindung von reduziertem Glutathion (GSH) als Elektronendonator, katalysieren [45-47].

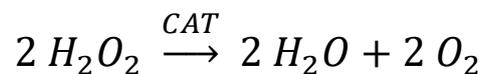


Im Anschluss kommt es zu einer Dimerisierung von zwei oxidierten Glutathionmolekülen über eine Disulfidbrücke unter Entstehung von einem Glutathion-Disulfid (oxidiertes Glutathion, GSSG).

Die Regeneration der anti-oxidativen Kapazität erfolgt durch eine Reduktion des oxidierten Glutathions zurück zu GSH durch die Glutathion-Disulfid Reduktase (GSR). Das aus dem Pentosephosphatweg stammende Reduktionsäquivalent NADPH / H⁺ fungiert als „Reduktionskraft“ [48].

1.1.2.3 Katalase

Die Katalase (Catalase; CAT) kommt ubiquitär in allen Körperzellen vor und katalysiert die Umwandlung von H₂O₂ zu H₂O und O₂ [49].



1.1.2.4 Sonstige enzymatische Antioxidantien

Weitere Moleküle, die zur enzymatischen ROS-Abwehr beitragen, sind beispielsweise die Gruppen der Thio-, Gluta- und Peroxiredoxine. Thioredoxin und die Thioredoxinreduktase stellen den wichtigsten zellulären Reduktions-

mechanismus für Protein-Disulfide dar [47, 50, 51], Glutaredoxine katalysieren reversible Reduktionen von Disulfidbrücken an Glutathion-Protein-Verbindungen im Zytoplasma [51, 52] und Peroxiredoxine können intrazelluläre Peroxide reduzieren, die beim physiologischen Metabolismus anfallen [53-55].

1.1.2.5 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Vitamin C und E sowie die Spurenelemente Zink und Selen sind seit Langem bekannte Antioxidantien. Ein Beispiel für ein weniger bekanntes, nicht-enzymatisches Antioxidans ist GSH, das auf Kosten der antioxidativen Kapazität des Glutathion-Systems beispielsweise die Vitamine C und E „recyclen“ und damit wieder verfügbar machen kann [48]. Die bei physiologischen pH-Werten in Form von Urat (Salze) vorliegende Harnsäure fungiert als Elektronendonator und schützt insbesondere gegen oxidativen Stress durch das Peroxinitrit-Anion (ONOO^-) im ZNS [56]. Das beim Hämoglobinabbau anfallende Bilirubin besitzt ebenfalls anti-oxidative Eigenschaften, insbesondere intravasal in der Albumin-gebunden Form [57-59].

1.1.3 Oxidativer Stress und Krankheit

Täglich werden durch ROS in jeder menschlichen Zelle mehr als 10^5 oxidative Schädigungen verursacht [60], in den meisten Fällen ohne weitreichende Konsequenzen. Es besteht allerdings eine hohe Korrelation zwischen dem Ausmaß von oxidativem Stress und dem Auftreten einer ganzen Reihe von Krankheiten, insbesondere der im Volksmund als „Alterskrankheiten“ bezeichneten Leiden [17]. So erhöht chronischer oxidativer Stress die Inzidenz von verschiedenen Krebserkrankungen [61, 62], wirkt nephrotoxisch [63, 64] und ist beteiligt an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wie Bluthochdruck, Atherosklerose und Herzrhythmusstörungen [65-68]. Auch aus diesem Grunde basieren die aktuellen Modelle zum Alterungsprozess auf den Erkenntnissen der

letzten Jahrzehnte über den maßgeblichen Einfluss von oxidativem Stress auf den menschlichen Körper [69-71].

1.1.4 Oxidativer Stress und neurologische Erkrankungen

Der Morbus Alzheimer (*Alzheimer disease, AD; Alzheimer-Krankheit*) ist die weltweit häufigste Ursache von Altersdemenz. AD ist auf zellulärer Ebene gekennzeichnet durch eine Akkumulation von fehlgefaltetem β -Amyloid, Peptiden, die sich als Plaques im Gewebe ablagern. Bis heute konnte kein kausaler Zusammenhang zwischen Amyloid-Plaques und fortschreitender Demenz bewiesen werden. Nachgewiesen ist jedoch eine Aktivierung von Mikrogliazellen, den primären Abwehrzellen im ZNS, durch die als pathogen eingestuft Amyloidablagerungen. Mikroglia produzieren und sezernieren als Abwehrreaktion ROS, die wiederum zytotoxisch auf die umliegenden Neurone wirken [72-79]. Diese Veränderungen können bereits bei AD-Vorstufen wie einer „leichten kognitiven Einschränkung“ beobachtet werden [77]. Bei etwa 20 % der Demenzkranken kann der kognitive Abbau auf eine vaskuläre Demenz (VaD) zurückgeführt werden [80], weitere 10 - 30 % weisen eine Mischform aus AD und VaD auf [81, 82].

Bei der komplexen Erkrankung des Morbus Parkinson (*Parkinson's disease, PD*) führt das Absterben von dopaminergen Neuronen letztlich zur Ausprägung motorischer und nicht-motorischer Symptome. Auch wenn der genaue Mechanismus der Krankheitsentstehung weiterhin ungeklärt bleibt, ist nach aktuellem wissenschaftlichem Konsens neben einer mitochondrialen Dysfunktion und Inflammation auch oxidativer Stress in der *substantia nigra*, der Hauptlokalisierung der beschriebenen dopaminergen Neurone, mitverantwortlich am Erkrankungsbild des PD [83-86]. Ähnlich wie bei der AD kommt es zu unlöslichen Ablagerungen eines fehlgefalteten Proteins, dem α -Synuclein. Und auch hier führt eine Mikroglia-Aktivierung zu ROS-Freisetzung und oxidativem Stress.

Analog hierzu kann der beschriebene Pathomechanismus bei weiteren, unter dem Sammelbegriff Synucleopathien zusammengefassten Erkrankungen wie der Lewy-Körper-Demenz und der Multisystematrophie [75, 79] sowie bei den Tauopathien, bei denen es zu Ansammlungen von Tau-Proteinen im Gehirn kommt, beobachtet werden [75]. Oxidativer Stress konnte zudem als Faktor bei der Krankheitsentstehung beziehungsweise als mitbeteiligter Pathomechanismus im Krankheitsverlauf der Präeklampsie [75, 87], der Multiplen Sklerose [75] und der Amyotrophen Lateralsklerose [78, 79] nachgewiesen werden.

1.1.5 Messung von oxidativem Stress

In der wissenschaftlichen Literatur sind viele Methoden unterschiedlicher Komplexität und Präzision zur Messung von oxidativem Stress beschrieben. Durchgesetzt haben sich Ansätze wie der Nachweis von Molekülen, die durch oxidativen Stress geschädigt wurden. Auch Verschiebungen innerhalb der bekannten Redox-Systeme, die Hochregulation von für die ROS-Abwehr codierender Gene oder die Messung von Markern der oxidativen Kapazität werden zum Nachweis von oxidativem Stress benutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden werden in dem zugehörigen Methodenteil näher beschrieben.

1.2 Das Renin – Angiotensin – Aldosteron – System

Das Renin – Angiotensin – Aldosteron – System (RAAS) ist wichtiger Regulator von Blutdruck, Elektrolytkonzentrationen im Blutserum und der Nierenfunktion. Es beschreibt den Zusammenhang von Renin, Angiotensin und Aldosteron untereinander und deren Wirkung im Körper.

In den epitheloiden Myozyten der *Macula densa* – Teil des *juxtaglomerulären Apparates* der Niere – wird Renin aus Prorenin gebildet. Bei einem Blutdruckabfall in den *Vasa afferentes*, einer niedrigen Natriumkonzentration im distalen Nierentubulus oder bei einer β -adrenalen Aktivierung durch Katecholamine wird Renin in die *Vasa afferentes* der Niere ausgeschüttet. Es gelangt in den Blutkreislauf, fungiert dort als Protease und spaltet das in der Leber gebildete Peptid Angiotensinogen zu Angiotensin I (AT-I). Durch Hydrolyse von der membranständigen und insbesondere im Lungenepithel exprimierten Exopeptidase Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) wird AT-I in das aktive Peptidhormon Angiotensin II (AT-II) gespalten. Als eines der Hauptprodukte des RAAS agiert AT-II primär über den G-Proteingekoppelten Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor (AT₁R). In der Nebenniere kommt es über den aktivierten AT₁R zu einer Ausschüttung des Steroidhormons Aldosteron aus den Zellen der *Zona glomerulosa*. Aldosteron führt zu einer Natrium- und Wasserretention, was wiederum das Blutvolumen und damit den Blutdruck erhöht. Durch eine negative Rückkoppelung reguliert das System sich selbst: Hoher Blutdruck, AT-II und Aldosteron hemmen die Renin-Freisetzung [88].

Weitere Effekte werden über eine Bindung von AT-II an den Angiotensin-II-Typ2-Rezeptor (AT₂R) eingeleitet. Zudem kann AT-II durch das Angiotensin-Converting-Enzyme 2 (ACE2) zu Angiotensin-(1-7) (AT-1-7) gespalten werden, das als Ligand des Mas-Rezeptors agiert. Sowohl eine Aktivierung des AT₂R, als auch des Mas-Rezeptors wirken den Effekten eines aktivierten AT₁R entgegen. Prorenin und Renin können an den (Pro)Renin Rezeptor [(P)RR] binden, so länger am Wirkungsort verbleiben und damit ihre Wirkung verstärken (**Abbildung 1**; [89]).

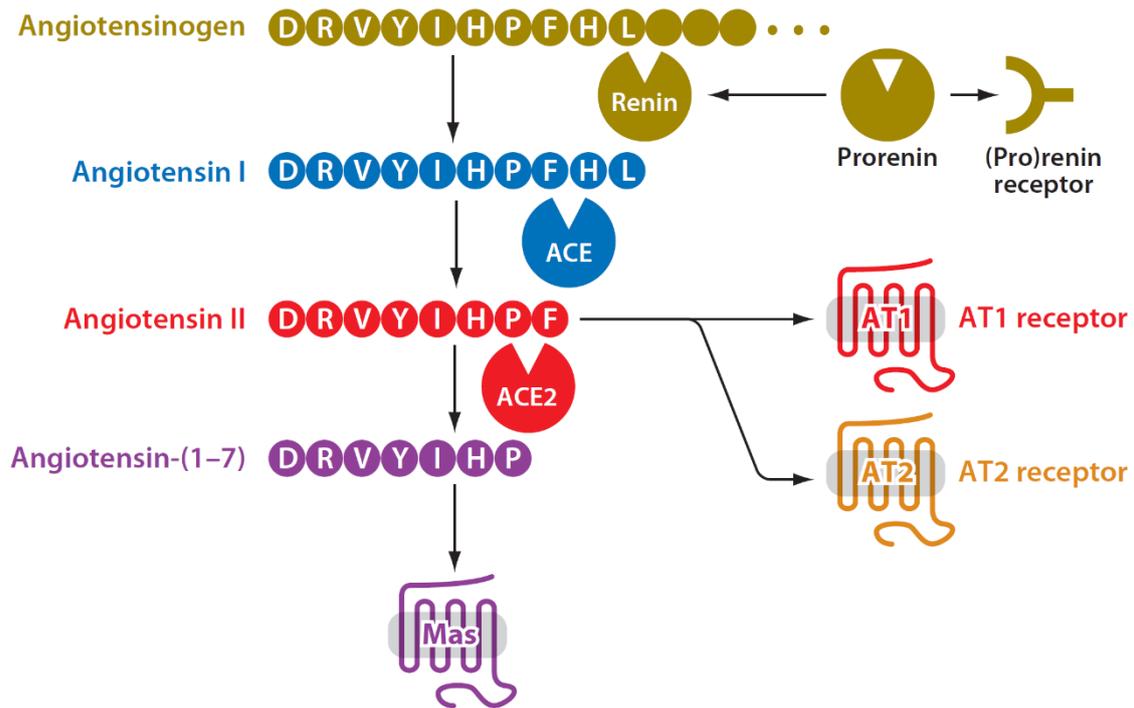


Abbildung 1: Renin - Angiotensin - Aldosteron – System.

Mit freundlicher Genehmigung von Annual Reviews Inc.; Order License Id: 4347660577053 [89]. Übersetzung aus dem Englischen: „Neben dem AT₁-Rezeptor (AT₁) kann Angiotensin-II auch mit dem AT₂-Rezeptor (AT₂) interagieren, und es kann vom Angiotensin-Converting-Enzyme 2 (ACE2) zu Ang-(1-7) metabolisiert werden, das ein Ligand für den Mas Rezeptor (Mas) ist. Beide Stoffwechselwege wirken den durch den AT₁-Rezeptor ausgelösten Effekten meist entgegen. Darüber hinaus können Renin und seine Vorstufe Prorenin an den (Pro)renin-Rezeptor ((P)RR) binden, der sie im Gewebe hält, ihre Angiotensin I-Erzeugungskapazität verstärkt und nach der Bindung Signale in die Zelle sendet.“ [89].

Während es in Menschen nur ein einziges für den AT₁R-codierendes Gen gibt [90], finden sich in Mäusen zwei zu über 90 % Sequenz-identische Unterformen, den AT_{1a}R und den AT_{1b}R [91-93].

1.2.1 Wirkung von AT-II über Bindung an den AT₁-Rezeptor

Eine Aktivierung des AT₁R durch den Agonisten AT-II führt zu einer kaskadenförmigen, intrazellulären Signaltransduktion über mehrere Wege, deren Auswirkungen weit über die oben genannten Blutdruck-, Elektrolyt- und Nierenfunktionsregulation hinausgehen. In den vergangenen Jahrzehnten ist das Verständnis um die hohe Komplexität des RAAS stetig größer geworden. Im Folgenden werden einige der Signalkaskaden beispielhaft aufgeführt.

Mehrere heterotrimere G-Proteine (unter anderem $G_{q/11}$, i , 12 , 13) interagieren mit dem AT_1R . In der Folge kommt es zur Aktivierung von Schlüsseffektoren wie den Phospholipasen A, C und D (PLA, PLC, PLD). Es erhöht sich die intrazelluläre Konzentration der beiden *second messenger* Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), die letztlich zu einer erhöhten Calcium- (Ca^{2+}) Konzentration führen [94, 95]. Das intrazelluläre Ca^{2+} ist unter anderem der primäre Trigger für die Kontraktion von Myozyten. Über weitere Kaskaden sind die erhöhten Ca^{2+} Konzentrationen zudem an der Induktion von Zellhyperplasie beteiligt [96].

Ohne vorherige G-Protein Aktivierung kann der AT_1R darüber hinaus via β -Arrestin-Rekrutierung direkt eine Signalkaskade über die *Extracellular-Signal regulated Kinase 1 und 2* (ERK1/2) aktivieren und so die Genexpression beeinflussen [97-99].

Über eine Amplifikation der Proteinkinase C (PKC) kommt es zu einer Aktivierung von GTPasen wie Ras, Raf und RhoA. Diese interagieren zu späterem Zeitpunkt in der Signalkaskade mit Enzymen der Mitogen-aktivierten Kinase-Familie (MAPKs) wie ERK1/2 oder der *Januskinase / Signal Transducers and Activators of Transcription* (JAK/STAT) [94]. So werden Transkriptionsfaktoren wie der *Nuclear Factor κB* (NF- κB), STATs oder das *Activating Protein-1* (AP-1) aktiviert, die zu einer Expression von Wachstumsgenen führen [100]. Über die PKC Aktivierung kommt es zudem zu einer erhöhten NAD(P)H-Oxidase (NOX)-Aktivität. So werden ROS gebildet, die als Signalmoleküle agieren und zur Expression von EGF- (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) und Aldosteron-Rezeptoren führen [101-104]. Des Weiteren erhöht AT-II über eine Aktivierung der S6-Kinase, einem wichtigen Effektor des *mammalian target of rapamycin* (mTOR) Systems, die Proteinsynthese [105].

Für eine optimale Funktion des komplexen Systems ist ein fragiles Gleichgewicht von AT-II Konzentration im Serum, der Stimulationsfrequenz des AT_1R und vielen weiteren Faktoren notwendig. Wird diese Homöostase gestört, kann es zur Entwicklung von Dysfunktion und zuletzt Krankheit kommen.

Chronische Stimulation durch AT-II führt beispielsweise zu Hypertrophie von vaskulären Myozyten, einem Remodelling des Herzmuskels [106], Inflammation und oxidativem Stress, der zur Entstehung kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt [107].

1.2.2 Antagonisierung des AT₁-Rezeptors

Mehrere Pharmakonzerne begannen Anfang der 1970er Jahre mit der Erforschung pharmakologischer Interventionsmöglichkeiten im RAAS. Miguel Ondetti gelang es 1977 Captopril zu synthetisieren, den ersten ACE-Inhibitor mit vertretbarer oraler Bioverfügbarkeit [108]. Captopril erlangte 1981 durch die Food and Drug Administration (FDA) eine Zulassung als Antihypertonikum [109]. Das Chemie- und Pharmaunternehmen DuPont entdeckte 1986 den ersten selektiven AT₁R-Blocker (ARB), Losartan [110]. Bis zur Zulassung durch die FDA dauerte es weitere neun Jahre. In den 1990er Jahren folgten dann die AT₁R-Blocker Valsartan, Irbesartan, Eprosartan, Candesartan und Telmisartan [95, 110]. Als dritter pharmakologischer Ansatzpunkt für ein Antihypertonikum innerhalb des RAAS wurde 2007 Aliskiren als erster Renin-Inhibitor von der FDA zugelassen.

Losartan hat eine relativ kurze HWZ von wenigen Stunden (die effektive HWZ wird durch einen Metaboliten jedoch verlängert) und die Rezeptorblockade kann durch hohe Konzentrationen von Agonisten überwunden werden [95]. Candesartan hingegen hat eine längere HWZ und führt zu einer vollständigen Blockade des Rezeptors, die eine Stimulation des Rezeptors selbst bei maximaler Agonistenkonzentration verhindert [95]. Aufgrund einer besseren Bioverfügbarkeit findet in der Praxis ein Prodrug, der Resorptionsester Candesartancilexetil, Verwendung.

1.2.3 Lokales Renin – Angiotensin – Aldosteron – System im Gehirn

Neben dem systemischen gibt es lokale RAAS in Herz, Gefäßwänden, Nieren, Nebennieren, Augen, Hoden und im Gehirn. Diese Gewebe sind imstande, die Bestandteile des RAAS unabhängig von der systemischen Hormon-Kaskade zu produzieren und werden eigenständig reguliert [111, 112].

Alle Komponenten des RAAS konnten bereits im Gehirn identifiziert werden [113, 114], inklusive ACE2 [115], dem Mas-Rezeptor [116] und dem (P)RR [117]. Zudem gibt es im ZNS mit Cathepsin [118] und Tonin [119] weitere Enzyme, die Angiotensinogen zu Angiotensin spalten können.

Eine hohe AT₁R-Expression findet sich insbesondere in Hirnarealen, die an der Blutdruck- und Flüssigkeitsregulation beteiligt sind. Dazu gehören die *paraventriculären-* (PVN) und *supraoptischen Nuclei* (SON) im Hypothalamus, der *Nucleus tractus solitarii* (NTS) und die *Rostral ventrolaterale medulla* (VLM), die für die basale Sympathikusaktivität und deren Reflexkontrolle zuständig ist [120-123]. Weitere Funktionen des zerebralen RAAS sind die über den AT₂R-vermittelte axonale Regeneration [124] und eine Modulation höherer Kognition, insbesondere von Gedächtnis, Schmerzwahrnehmung und Verhalten [125, 126].

Das ZNS wird über die Bluthirnschranke (BHS) vor schädlichen Substanzen im Blutkreislauf geschützt. Die BHS wird hauptsächlich durch Endothelzellen der Blutgefäße gebildet, die über *tight junctions* Gefäßlücken schließen und so eine Infiltration unerwünschter Substanzen verhindern. Selektiv werden wichtige Nährstoffe passagiert und über Astrozyten, die mit den Perizyten auch Teil der BHS darstellen, an die Neurone weitergegeben. Neben der mechanischen Barriere gibt es Transporter wie das P-Glykoprotein (P-gp), die aktiv und selektiv unerwünschte Substanzen aus der Zelle, im Falle der BHS zurück in den Blutkreislauf transportieren [127]. Das Peptidhormon AT-II kann die BHS nicht überwinden.

Als *zirkumventrikuläre Organe* (ZVO) werden Strukturen an der Wand des III. und IV. Ventrikels im Gehirn bezeichnet, die physiologischerweise ein fenestriertes Endothel aufweisen und damit eine Unterbrechung der BHS darstellen. Um ihrer sensorischen Funktion nachzukommen sind sie durchlässig für sonst nicht zentralgängige Moleküle aus dem Blutkreislauf. Zu diesen Arealen zählen das *Subfornikalorgan* (SFO), das *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und die *area postrema* (AP) (**Abbildung 2**; [89]).

Das am Dach des III. Ventrikels unter dem Gewölbe (Fornix) des limbischen Systems liegende SFO besitzt ein für AT-II besonders durchgängiges, fenestriertes Endothel, welches es speziellen Neuronen ermöglicht, die AT-II-Serumkonzentration zu messen. Über efferente Axone werden Signalreize an den SON und die PVN gesandt und so die Vasopressin- und Adrenocorticotropin (ACTH)-Ausschüttung im Hypothalamus moduliert [128]. Ein Durstreiz wird ausgelöst, der nach Flüssigkeitsaufnahme den Blutdruck erhöht und in Folge zu einer geringeren Renin- und AT-II-Ausschüttung führt. Dies hat zur Konsequenz, dass weniger AT-II das SFO erreicht und das Durstsignal gestoppt wird.

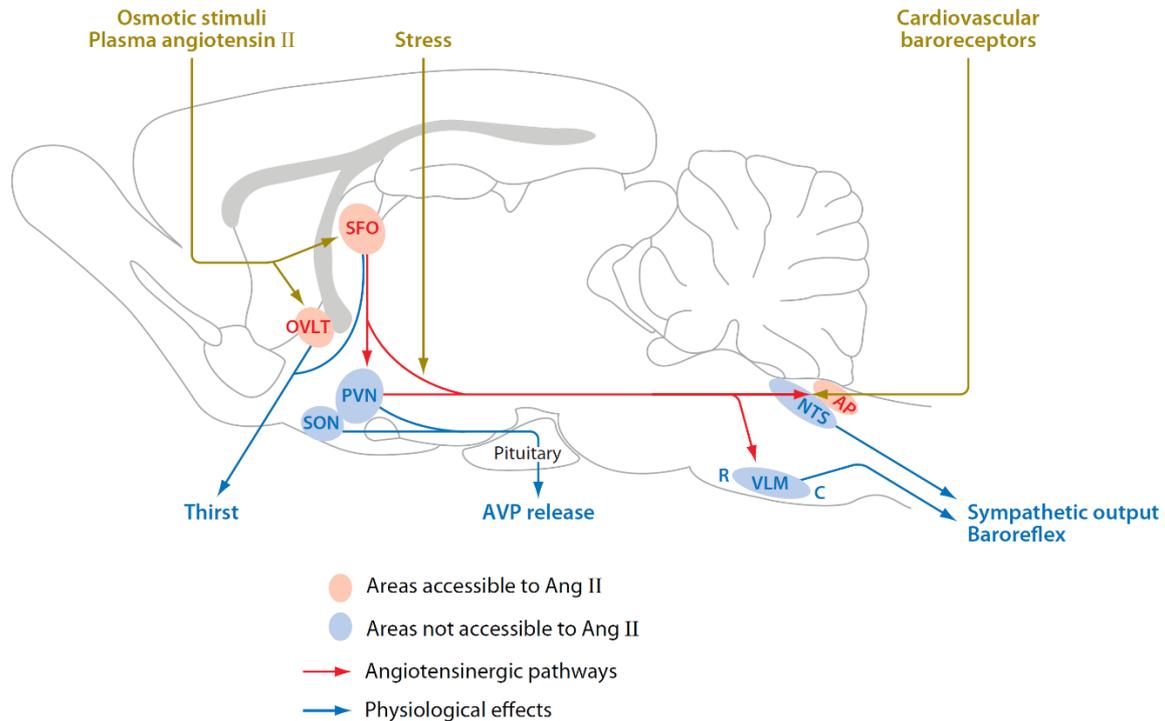


Abbildung 2: Für AT-II zugängliche Gehirnareale.

Mit freundlicher Genehmigung von Annual Reviews Inc.; Order License Id: 4351401423037 [89].

Übersetzung aus dem Englischen: „Im Gehirn gibt es Bereiche (rot) wie das Subfornikalorgan (SFO), das organum vasculosum laminae terminalis (OVL) und die Area postrema (AP), die AT₁-Rezeptoren exprimieren und die für zirkulierendes Ang II zugänglich sind. Andere Bereiche (blau), wie die supraoptischen Nuclei (SON) und die PVN = paraventriculären Nuclei (PVN) des Hypothalamus, die rostrale (R) und kaudale (C) ventrolaterale medulla (VLM) sowie der Nucleus tractus solitarii (NTS), exprimieren zwar auch AT₁-Rezeptoren, sind aber aufgrund der Blut-Hirn-Schranke von systemischem Ang II nicht erreichbar. Diese Regionen sind nur für Ang II zugänglich, das lokal im Gehirn synthetisiert wird. Die Angiotensin-sensitiven Bereiche werden von außen beeinflusst. Effektoren, einschließlich Plasma-Ang II (rot), die durch angiotensinerge Bahnen (rote Pfeile) miteinander verbunden sind, die die angegebenen physiologische Wirkungen (blaue Pfeile).“ [89].

Ein wichtiger Aspekt bei der Betrachtung des hirneigenen RAAS ist die Mitbeteiligung von Mikrogliazellen. Mikroglia sind die Makrophagen des ZNS und machen bis zu 10 % der Hirnzellen aus [129]. Wie bereits beschrieben sind Mikroglia an der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie AD oder PD beteiligt. Hierbei „triggern“ β -Amyloid beziehungsweise α -Synuclein eine Autoimmunität via Mikroglia-Aktivierung [130]. Diese kommen abhängig von externen Stimuli in einem pro-inflammatorischen M1-Phänotyp oder in einem tendenziell anti-inflammatorischen M2-Phänotyp vor [131]. Die Polarisierung von

Mikroglia entscheidet hierbei über das vorliegende Milieu in Hinsicht auf oxidativen Stress. Ein inadäquat hoher Anteil an M1-Mikroglia ist nachweislich neurotoxisch und führt zur Schädigung beziehungsweise teilweise bis zum Absterben von Neuronen [132]. Das hirneigene RAAS steht in engem Zusammenhang zum Mikroglia-Phänotyp mit einer Induktion des proinflammatorischen M1-Phänotyps über (Pro)renin/PRR und AT-II/AT₁R, beziehungsweise einer Induktion des anti-inflammatorischen M2-Phänotyps über AT-II/AT₂ und AT-1-7/MasR (**Abbildung 3**; [133]).

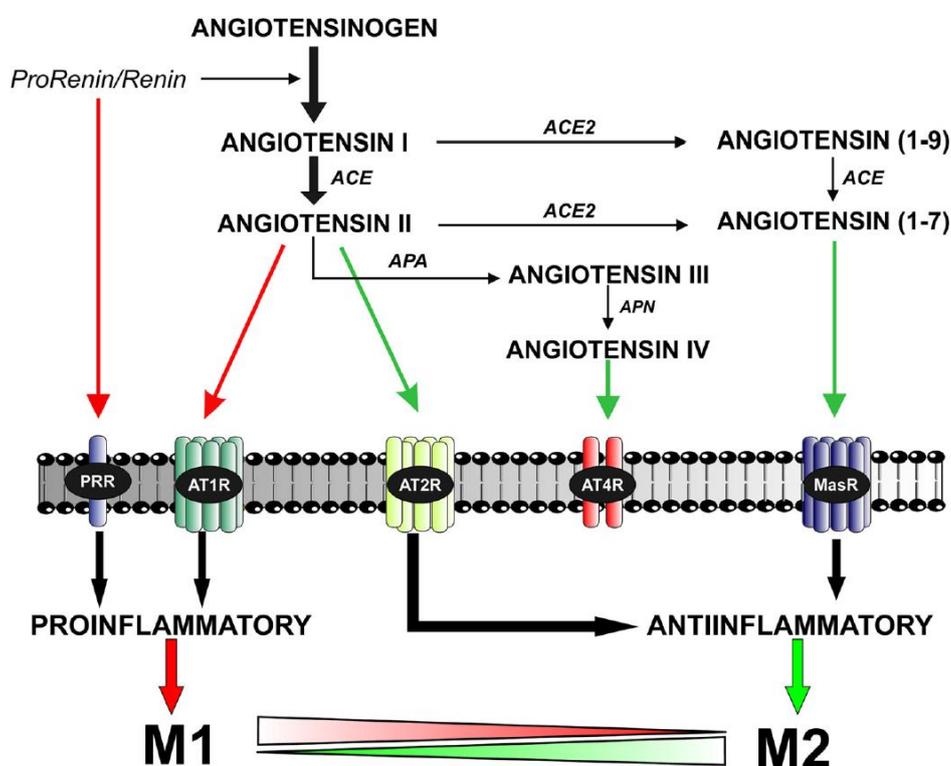


Abbildung 3: Hirneigenes RAAS und Mikroglia-Polarisation.

Mit freundlicher Genehmigung von Frontiers. Abbildung originalgetreu wie von Labandeira-Garcia et al. publiziert (2017). *Front Aging Neurosci.* 9:129. doi: 10.3389/fnagi.2017.00129 [133].

Übersetzt aus dem Englischen: „Angiotensin II wird durch die sequentielle Aktivität der beiden Enzyme Prorenin-Renin (das Angiotensin I bildet) und Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) auf das Vorläuferprotein Angiotensinogen gebildet. Renin und sein Vorläufer Prorenin wirken auch auf spezifische PRR-Rezeptoren. Zusätzlich zu Angiotensin II werden mehrere Angiotensin-Peptide wie Angiotensin (1-7), Angiotensin III und Angiotensin IV durch die Wirkung von Angiotensin-Converting-Enzyme 2 (ACE2), Aminopeptidase A (APA) und N (APN) aus Angiotensin I und II gebildet. Angiotensin II induziert über AT1-Rezeptoren proinflammatorische Effekte und den M1-Phänotyp. Diesen Effekten wird jedoch durch einen RAS-Gegenarm entgegengewirkt, der durch den Angiotensin II/AT2-Rezeptor-Signalweg und den Angiotensin 1-7/MasRezeptor (MasR)-Signalweg gebildet wird. Darüber hinaus kann die Aktivierung von Prorenin-Renin-Rezeptoren zur Aktivierung des proinflammatorischen Phänotyps beitragen.“ [133].

1.3 Hypertonie

Arterielle Hypertonie oder Bluthochdruck ist eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten unserer Zeit, weltweit ist etwa ein Viertel aller Erwachsenen betroffen [134]. In Industrienationen wie den USA oder den europäischen Ländern liegt die Prävalenz einigen Studien zufolge mit etwa 30 % und teilweise über 40 % noch deutlich höher [135]. In den meisten Fällen kann keine organische Ursache für den Bluthochdruck ausgemacht werden. Unabhängig von der Ätiologie findet sich beim Hypertonus jedoch ein aus der Homöostase geratenes RAAS.

1.3.1 Hypertonie und neurologische Erkrankungen

Bluthochdruck ist ein Risikofaktor für eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen [136-138], besonders umfangreich ist die wissenschaftliche Datenlage für einen Zusammenhang zwischen dysfunktionalem RAAS und Neuropathologien. In Gehirnen von PD- und Chorea Huntington-Patienten konnte eine erhöhte AT₁R- und AT₂R- [139], bei AD-Patienten eine erhöhte AT₁R-, AT₂R-, ACE- und AT-II- [139, 140] und bei Patienten mit Multipler Sklerose eine erhöhte ACE-Konzentration beziehungsweise -Expression [141] nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine anti-hypertensive Therapie den kognitiven Verfall nicht-dementer Personen verlangsamt [142], und dass Patienten unter ACE-I Therapie seltener AD entwickeln [143]. Eine potentielle Erklärung hierfür ist die Beobachtung, dass ACE nicht nur AT-I, sondern auch Peptide wie Tau oder Amyloid spalten kann. Der protektive Effekt ist deshalb möglicherweise nicht auf eine Modulation des RAAS alleine, sondern auf die Protease-Aktivität von ACE zurück zu führen. Es wird bereits darüber spekuliert, ob ACE-I eine Rolle bei der AD-Therapie spielen sollten [144]. Einige Studien weisen darauf hin, dass AT₁R-Blocker einen noch größeren protektiven Effekt als ACE-I vor dementiellen Erkrankungen haben könnten [145, 146]. Auf genetischer Ebene kann beobachtet werden, dass eine Modifikation im ACE1-Gen hinter dem etablierten APOE-ε4 Allel den zweitwichtigsten prädiktiven Faktor

für die Entwicklung von AD darstellt [147]. Zudem schützen ACE-I bei Patienten mit einem Polymorphismus im Angiotensinogen-Gen, der zu einer erhöhten RAAS-Aktivität und damit erhöhtem Blutdruck führt, gegen den Verfall von exekutiven Funktionen [136, 148].

Hypertoniker haben nicht nur ein deutlich erhöhtes Risiko einen Schlaganfall zu erleiden, sondern auch eine Demenz zu entwickeln [149]. Obwohl der genaue Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, spielt eine durch Bluthochdruck ausgelöste endotheliale Dysfunktion in kleinen Hirngefäßen eine entscheidende Rolle, welche zu einer chronischen Unterversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff und einer erhöhten Anfälligkeit der betroffenen Neurone für hypoxische Zellschäden führt [150].

Diskutiert wird, ob eine Überaktivierung des RAAS, insbesondere des lokalen RAAS im Gehirn, einen weiteren Schädigungsmechanismus darstellen könnte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein positiver Feed-forward Mechanismus im Gehirn vorhanden ist, der zu einer Auto-Potenzierung von AT-II führt [151]. Eine Rezeptorbindung von AT-II an den AT₁R führt hierbei zu einer weiteren Sensibilisierung des AT₁R gegenüber AT-II, was seinen Effekt verstärkt [152, 153].

1.3.2 Entstehungsmechanismus von oxidativem Stress bei Hypertonie

Multiple begünstigende Faktoren der Hypertonieentstehung konnten bereits identifiziert werden, darunter eine chronische Aktivierung des sympathischen Nervensystems, ein dysfunktionales RAAS und chronische Inflammation [154, 155]. Allen gemeinsam ist die Entstehung von oxidativem Stress, welcher auf der einen Seite Hypertonie mitverursachen und einen bestehenden Bluthochdruck negativ beeinflussen kann. Auf der anderen Seite verstärkt beziehungsweise verursacht Hypertonie oxidativen Stress [68, 156].

1.3.2.1 NADPH-Oxidase

Eine wichtige Quelle von physiologischen Mengen an $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 im kardiovaskulären System sind Enzyme aus der Familie der Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat-Oxidasen, kurz NADPH-Oxidasen (NOX) [157]. Die primäre Funktion der sieben bekannten NOX-Isoformen ist die ROS-Produktion. Bei Hypertonikern findet sich eine gesteigerte NOX1-Aktivität in den glatten Muskelzellen der Vaskulatur, welche über den Gefäßtonus einen maßgeblichen Einfluss auf den Blutdruck haben [158]. Eine intravenöse AT-II-Infusion in Ratten führt zu erhöhter NOX-Expression und -Aktivität, was in der Folge zu vermehrter ROS-Produktion führt [159]. Eine unkontrollierte ROS-Produktion induziert erwartungsgemäß zelluläre Schäden [159].

1.3.2.2 AT-II-induzierte DNA-Schäden

Durch erhöhte AT-II Spiegel in der Niere kommt es zu einer vermehrten ROS-Produktion durch die NADPH-Oxidase (NOX) [160]. Diese wird durch Bindung von AT-II an den AT₁R eingeleitet, was zu einer G-Protein-gekoppelten Stimulation von PLC führt. PLC führt Ca²⁺-abhängig zu einer Aktivierung von PKC, welches wiederum am ehesten für die Aktivierung von NOX in Frage kommt (siehe **Abbildung 4**). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass NOX die Produktion von ROS induziert, welche dann unter anderem Schäden an der DNA auslöst [160]. AT-II führt zudem zu einer zusätzlichen Hochregulation von NOX [101].

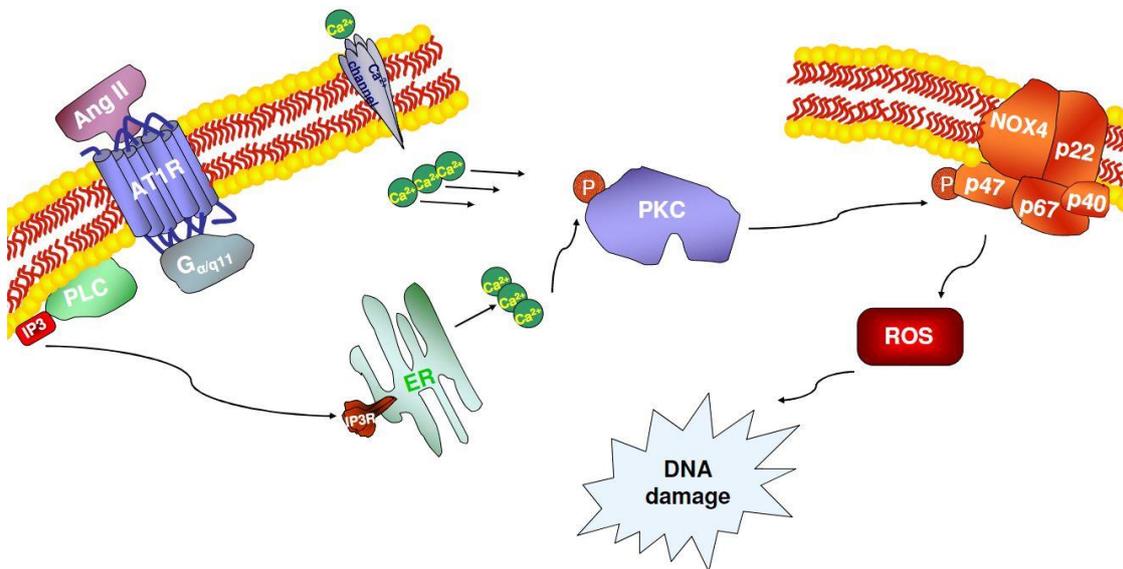


Abbildung 4: Entstehungsweg der DNA-Schädigung durch AT-II.

Mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press.; Order License Id: 4351791070178 [160]. Übersetzung aus dem Englischen: „Vorgeschlagenes Modell der Signalübertragung bei Angiotensin II (Ang II)-induzierter DNA-Schädigung. Die Bindung von Ang II an den Angiotensin Typ1-Rezeptor (AT₁R) aktiviert die Phospholipase C (PLC) durch Stimulation von G Proteinen, was zu einer Kalzium (Ca²⁺)-abhängigen Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt die wiederum die NADPH-Oxidase aktiviert. Die NADPH-Oxidase mit Beteiligung seiner Nox4-Untereinheit produziert dann reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die DNA-Schäden verursachen können.“ Abkürzungen: G_{α-q/11} = G-Protein-Untereinheiten G_{α-q/11}; IP₃ = Inositoltriphosphat; ER = endoplasmatisches Retikulum. [160]

1.4 Ziel der Arbeit

Es wurde bereits gezeigt, dass erhöhte Konzentrationen von AT-II DNA-Schädigungen in der Niere verursachen. Ob andere Organe durch erhöhte AT-II Konzentrationen ebenfalls geschädigt werden können ist jedoch weitgehend ungeklärt.

Ziel der Dissertation ist es die Zytotoxizität beziehungsweise die Genotoxizität von AT-II in Nervenzellen zu prüfen. Diese Untersuchungen werden zunächst *in vitro* mithilfe je einer murinen und einer humanen Zelllinie durchgeführt. Im Falle einer nachweisbaren Neurotoxizität von AT-II soll die Hypothese untersucht werden, ob AT-II möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der (vaskulären) Demenz spielen könnte. Hierfür soll *in vivo* untersucht werden, ob in AT-II-behandelten Mäusen vermehrte DNA-Schäden im murinen Subfornikalorgan, einer bestimmten für systemisch appliziertes AT-II zugängigen Gehirnregion, nachweisbar sind.

Langfristiges Ziel der Demenzforschung sollte eine Translation vom Labor in die Klinik sein. Nur so können zielgerichtete pharmakologische Therapieoptionen entwickelt werden. Unsere Daten könnten zu einem tieferen Verständnis der Demenzentwicklung führen, was eines Tages zu der Möglichkeit einer kompletten Krankheitsprävention beitragen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Name	Hersteller	Verwendung
CASY® Cell Counter	OMNI Life Science	Zellzählung
Cytospin™	Thermo Fisher Scientific	MN-Test
Eclipse 55i Mikroskop	Nikon	diverse
Fluoreszenzmikroskop Diavert	Leica	MN-Test
Gel Doc™ 2000	Bio-Rad	PCR
Labophot-2	Nikon	Comet Assay
Leica RM2165 Mikrotom	Leica	Gewebeschnitte
Magnetrührer Combimag Ret	IKA Labortechnik	diverse
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad	Gel Elektrophorese
Paraffinstreckbad	MEDAX	Paraffinschnitte
Photometer Evolution 160	Thermo Fisher Scientific	diverse
Power Pac 300	Bio-Rad	Elektrophorese
PTC-100 und PTC-200	MJ Research	PCR
SpectraMax Microplate Reader	Molecular Devices	NBT Assay
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad	Western Blot
U-2000 UV/Vis Spectrophometer	Hitachi	Bestimmung [RNA]
Universal-Kühlzentrifuge 16R	Hettich	diverse
Vortexer VF2	IKA Labortechnik	diverse
Wärmestrecktisch	MEDAX	Paraffinschnitte
Wasserbad WA	IKA Labortechnik	diverse

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

2.1.2 Puffer, Lösungen und Kits

2.1.2.1 Glutathion Assay

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
0,1 M Kalium Phosphat EDTA Puffer „KPE Puffer“	16 ml einer 6,8 g KH_2PO_4 in 500 ml VE- H_2O Lösung 84 ml einer 8,5 g K_2HPO_4 in 500 ml VE- H_2O Lösung EDTA, 327 mg pH-Wert mittels KOH auf 7,5 titriert
Extraktionspuffer	0,1 % Triton X-100 (20 μl) + 0,6 % Sulfosalicylsäure (120 mg) in 20 ml KPE Puffer
2-Vinylpyridin Lösung	1:10 Verdünnung von 2-Vinylpyridin in KPE Puffer
Triethanolamin Lösung	1:6 Verdünnung von Triethanolamin in KPE Puffer
NADPH (in Alufolie)	NADPH, 2 mg in 3 ml 0,1 M KPE Puffer
DTNB / GR (in Alufolie)	DTNB, 2 mg in 6 ml 0,1 M KPE Puffer GR, 22,17 μl

Tabelle 2: Puffer/Lösungen Glutathion Assay.

Abkürzungen: DTNB = Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure); EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure; GR = Glutathionreduktase; KOH = Kaliumhydroxid; KPE Puffer = Kalium Phosphat EDTA Puffer; NADPH = Nicotinamidadeninucleotidphosphat; VE- H_2O = destilliertes Wasser.

2.1.2.2 NBT-Assay

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
NBT	1,2 mM in PBS
KOH	2 M

Tabelle 3: Puffer/Lösungen NBT-Assay. Abkürzungen: KOH = Kaliumhydroxid; NBT = Nitroblau-Tetrazolium; PBS = Phosphate-buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung).

2.1.2.3 TBARS-Assay

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
TBA reagent	111,6 mg Thiobarbituric Acid (TBA) in 15 ml VE-H ₂ O
TBARS standard	500 µM Tetramethoxy-Propane (TMP) in VE-H ₂ O
TBARS acid reagent	0,6 N Trichloroacetic Acid (TCA) in 30 ml VE-H ₂ O

Tabelle 4: Puffer/Lösungen TBARS-Assay. Abkürzungen: TBA = Thiobarbituric Acid; TCA = Trichloroacetic Acid; TMP = Tetramethoxy-Propane; VE-H₂O = destilliertes Wasser.

2.1.2.4 PCR

Gel	Zusammensetzung
TAE Buffer (50 ml, pH 8)	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 40 mM Acetat
Agarose (NEEO Ultra Qualität) 0,5 g	Fa. Roth
Ethidiumbromid 5 µl GelRed®	

Tabelle 5: Zusammensetzung PCR-Gel. Abkürzungen: EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure; PCR = Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion); TAE = Tris-Acetat-EDTA; Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan.

2.1.2.5 Comet Assay

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Lysepuffer, pH 10	2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Na-Sacrosinat
Lyselösung (4 °C, lichtgeschützt)	Lysepuffer, 66,75 ml; DMSO, 7,5 ml; Triton X-100, 0,75 ml
5 M NaOH-Lösung	
0,2 M EDTA-Lösung	
Elektrophoresepuffer (4 °C)	5 M NaOH, 120 ml; 0,2 M EDTA-Lösung in 10 ml auf 2 L VE-H ₂ O
0,4 M Tris – Neutralisationspuffer	pH-Wert mittels konzentrierter HCl auf 7,5 titriert
Methanol	→ auf -20 °C gekühlt
1,5% HMP-Agarose-lösung in PBS / CMF	
0,5% LMP-Agarose-lösung in PBS / CMF	kurz in Mikrowelle aufgekocht und im Wasserbad auf 37 °C temperiert
GelRed™ Gebrauchslösung	10 µl Stocklösung + 990 µl destilliertes H ₂ O

Tabelle 6: Puffer/Lösungen Comet Assay. Abkürzungen: CMF = Calcium-Magnesium-frei; DMSO = Dimethylsulfoxid; HMP = High Melting Point; LMP = Low Melting Point; PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung; Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (THAM).

2.1.2.6 γ -H2AX-Färbung

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Citratpuffer, 10 mM, pH 6	Citronensäure-Monohydrat, 1,05 g Millipore H ₂ O, 500 ml
Blockierlösung	500 μ l Donkey-Serum in 9,5 ml PBS
H ₂ O ₂	3 %-ig (in PBS)
Avidinlösung	0,001 %-ig
Biotinlösung	0,001 %-ig
Primärer Antikörper (AK)	Rabbit IgG, anti- γ -H2AX AK, 1:200 mit SignalStain™ verdünnt (Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb #9718, <i>Cell Signaling Technology</i>)
Sekundärer AK	Donkey anti-rabbit AK, 1:200 mit PBS verdünnt (donkey anti-rabbit IgG-B:sc-2089, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>)
ABC Reagenz	Puffer, 2,5 ml (10 mM Natriumphosphat, 0,9% NaCl, pH 7,5) Reagenz A, 1 Tropfen Reagenz B, 1 Tropfen (ABC Peroxidase Staining Kit, <i>ThermoFisher Scientific</i>)
DAB Reagenz	Millipore H ₂ O, 2,5 ml Puffer Stock Solution, 1 Tropfen DAB Stock Solution, 2 Tropfen H ₂ O ₂ Solution, 1 Tropfen (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, <i>Vector Laboratories</i>)
Roti™-Histol	(<i>Fa. Roth</i>)
Eukitt®	(<i>Fa. ORSA Technologies</i>)

Tabelle 7: Puffer/Lösungen γ -H2AX-Färbungen. Abkürzungen: ABC = Avidin-Biotin-Complex; AK = Antikörper; DAB = Diaminobenzidin; IgG = Immunglobulin G; mAb = monoclonal antibody (monoklonaler Antikörper); PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung.

2.2 *In vitro*: Zelllinien

Da sich vollständig differenzierte Nervenzellen nicht mehr teilen, finden in der täglichen Praxis häufig transformierte Zellen Verwendung, die Neuronen-artige Eigenschaften besitzen. Die ersatzweise Verwendung humaner Tumorzellen ist eine pragmatische Vorgehensweise, bei der jedoch nicht vergessen werden darf, dass sich die Neurobiologie gesunder Neurone und Tumorzellen teilweise (dramatisch) unterscheidet.

2.2.1 SH-SY5Y

Die SH-SY5Y Zelllinie stammt aus einer 1970 durchgeführten Knochenmarksbiopsie bei einem vier-jährigen Mädchen mit metastasiertem Neuroblastom [161], und wurde im Verlauf mehrere Male subklont. Die Zellen besitzen ein abnormales Chromosom 1q, teilen sich durch Mitose und differenzieren sich durch Verzweigung von Neuriten. Da es sich um haftende Zellen handelt, wurden diese beim Ernten mit EDTA-Trypsin von der Gefäßoberfläche gelöst. Die Trypsinlösung wurde anschließend mit doppeltem Volumen Medium neutralisiert. Neuroblastomzellen beziehungsweise Neuroblasten sind nicht terminal-differenzierte Zellen des autonomen Nervengewebes. Sie wachsen außerhalb des ZNS, sind aber ein gutes Modell, um zu prüfen, ob AT-II DNA-Schäden in Nervenzellen hervorrufen kann.

2.2.2 HT-22

Bei der HT-22-Zelllinie handelt es sich um murine hippocampale Primärzellen, welche für die Zellkultur immortalisiert wurden. Sie stammen ursprünglich von der HT-4-Zelllinie ab. Auch diese Zellen haften und wurden mit EDTA-Trypsin beim Ernten von der Gefäßoberfläche gelöst. Nach Genehmigung von Prof. Dr. David Schubert (Salk Institute, La Jolla, CA) wurden die Zellen freundlicherweise von Prof. Dr. Tilman Grune (Universität Potsdam) zur Verfügung gestellt.

2.3 *In vivo*: Tiermodell

Der Tierversuch wurde von Frau Dr. Anna Zimnol und Frau Priv. Doz. Dr. Nicole Schupp betreut und die Tiere waren Teil eines Experimentes mit der Fragestellung zur Relevanz des AT_{1a}R und der NOX für die Entstehung von AT-II-vermittelter DNA-Schäden. Ergebnisse dieser Studie zum AT_{1a}R wurden 2017 veröffentlicht [162].

2.3.1 Versuchsaufbau

Insgesamt wurden vierzig Mäuse bei dem Experiment untersucht, davon 24 männliche Wildtyp-C57BL/6J-Mäuse (WT) (Hersteller: Janvier, Le Genest Saint Isle, Frankreich) sowie 16 männliche B6.129P2-Agtr1a^{tm1Unc}/J-Mäuse (Hersteller The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) mit einem Knockout des AT_{1a}Rezeptors (AT_{1a}R-KO). Die WT-Mäuse wurden in drei Gruppen mit je acht Tieren, die AT_{1a}R-KO-Mäuse in zwei Gruppen mit je acht Tieren eingeteilt (siehe **Tabelle 8**). Die Gruppeneinteilung erfolgte in einem Alter von fünfzehn Wochen, allen Tieren wurde eine osmotische Minipumpe im Nackenbereich implantiert [162].

Gruppe	Behandlung	Tiere
WT K	PBS	<i>n</i> = 8
WT AT-II	AT-II (600 ng/kg/min)	<i>n</i> = 8
WT AT-II + Cand	AT-II (600 ng/kg/min) Candesartan (8 mg/kg/Tag)	<i>n</i> = 8
AT _{1a} R-KO K	PBS	<i>n</i> = 8
AT _{1a} R-KO AT-II	AT-II (600 ng/kg/min)	<i>n</i> = 8

Tabelle 8: Übersicht Tierversuch.

[162].

Abkürzungen: AT_{1a}R = Angiotensin Rezeptor Typ1a; AT-II = Angiotensin II; Cand = Candesartan; K = Kontrolle; KO = Knock-Out; PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung; WT = Wildtyp.

Über die osmotische Pumpe wurde den Tieren über 28 Tage entweder PBS (Kontrollgruppe) oder AT-II mit/ohne dem AT₁R-Antagonisten Candesartan infundiert. Bei der Interventionsgruppe WT AT-II wurde den WT-Mäusen 600 ng pro Kilogramm Körpergewicht pro Minute verabreicht. Den Mäusen der WT AT-II + Cand Gruppe wurde zusätzlich 8 mg Candesartan pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag verabreicht. Die KO-Mäuse wurden analog ebenfalls mit PBS beziehungsweise AT-II (600 ng/kg/min) infundiert.

Ziel meiner Untersuchungen war es, die Wirkung von AT-II auf das Subfornikalorgan (SFO) zu untersuchen. Das SFO ist eine der wenigen Strukturen im Gehirn, in denen die Bluthirnschranke unterbrochen ist. Daher ist es dem systemischen, über die osmotische Pumpe applizierten, AT-II ausgesetzt. Das SFO ist hochsensibel gegenüber AT-II, was möglicherweise zu einem potenzierten Effekt hinsichtlich seiner Toxizität führen könnte.

2.4 Methoden

2.4.1.1 Zellkulturtechniken

Die SH-S5Y5 Zellen wurden in einem Inkubator mit 5 % CO₂ bei 37 °C gehalten. Als Wachstumsmedium wurde modifiziertes Eagle's Medium (DMEM und Ham's F12 in einem Verhältnis von 1:1) mit 10 % FBS (Fetal Bovine Serum), 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin in Kollagen-beschichteten Flaschen verwendet. Die Zellen wurden wöchentlich zweimal gesplittet und nach dem Auftauen bis maximal zur zwanzigsten Passage verwendet. Für die Versuche wurden Zellen benutzt, die 24 Stunden zuvor in neue Zellkulturflaschen ausgesät worden waren.

Beim Passagieren der Zellen wurde zunächst das Medium verworfen und die Zellkulturflaschen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Zum Lösen der haftenden Zellen wurden 3 ml einer 10:1 verdünnten Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche gegeben und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinierung

wurde mit 6 ml eines Serum-enthaltenden Mediums neutralisiert und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen manuell mithilfe einer Neubauer Zählkammer sowie maschinell mithilfe eines CASY® Cell Counter (OMNI Life Science GmbH, Bremen) gezählt. Die Vitalitätsprüfung wurde nach Färbung mit einer Vitalitätsfärbelösung (72 nM Fluoresceindiacetat und 2 µl GelRed®-Lösung in 2 ml PBS) unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Es wurden jeweils 200 Zellen ausgezählt, die Vitalität wurde in % angegeben.

2.4.2 Gewebetechniken

2.4.2.1 Entnahme der Gehirne

Sinngemäßer Auszug aus Frau Dr. A. Zimnols Dissertation [163]: „Die Tiere wurden narkotisiert (Xylazin, Ketamin), in Rückenlage fixiert, der Bauchraum geöffnet und die Aorta abdominalis freigelegt. Der Thorax wurde geöffnet, der linke Ventrikel mit der Perfusionskanüle punktiert und die Aorta abdominalis mit Beginn der Perfusion durchtrennt. Diese erfolgte für zwei Minuten mit Deltadex 40, gefolgt von einer Spülung mit eiskalter 0,9 %-iger Natriumchloridlösung. Nach erfolgreicher Perfusion wurden die Nieren und das Herz entnommen.“

Anschließend wurden die Gehirne entnommen, für 24 Stunden in 4 % Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Fa. Leica) wurden die Gehirne in 10 µm dicke Paraffinschnitte geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Es wurde hierbei gezielt versucht das SFO zu schneiden, mit anschließender Kontrolle unter dem Lichtmikroskop. Das SFO liegt am Dach des dritten Ventrikels (siehe **Abbildung 5**).

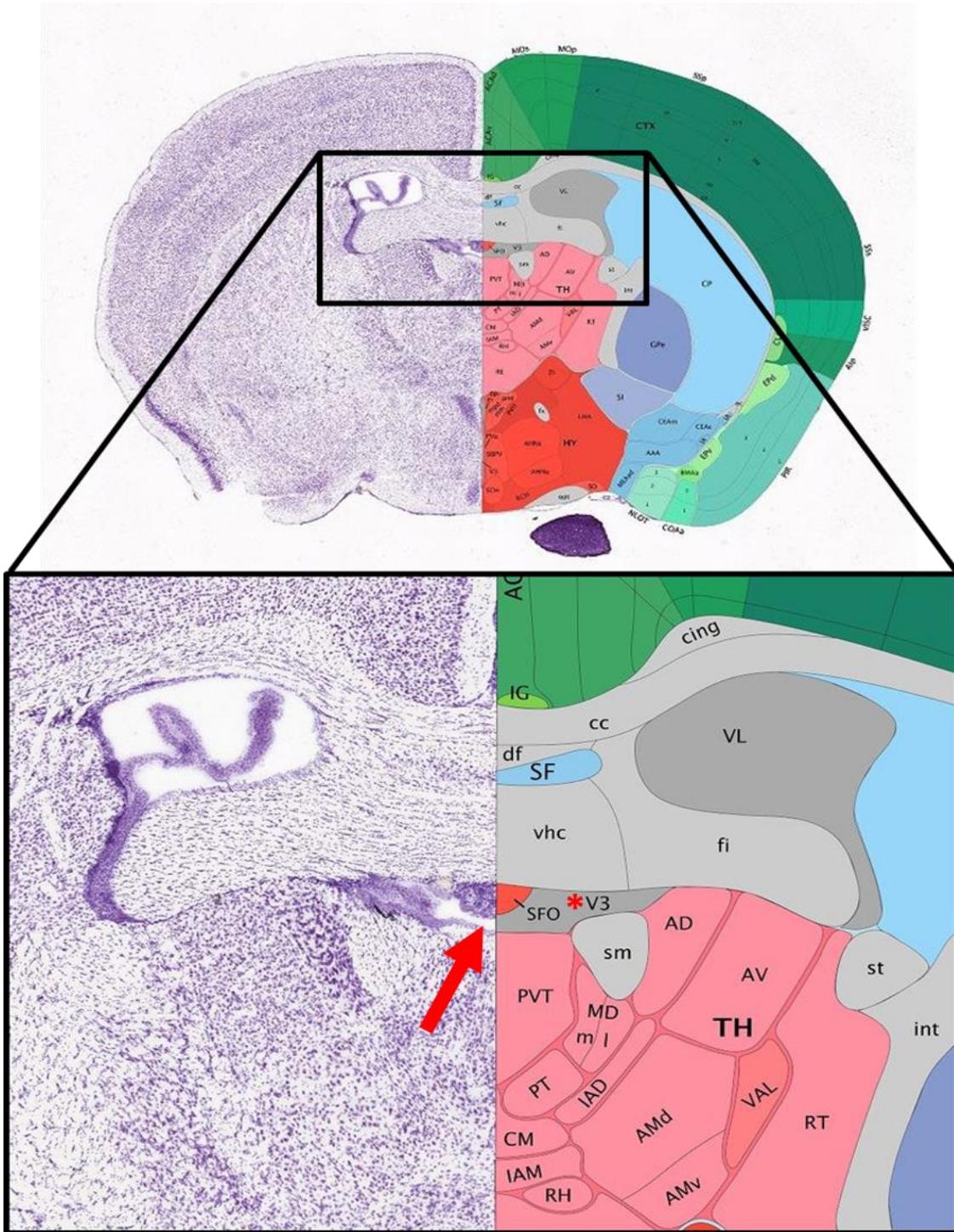


Abbildung 5: Schema Mausgehirn coronar.

P56 Mouse, Bild 61/132, Allen Brain Atlas. Mit freundlicher Genehmigung vom Allen Institute [164].
Ober: Coronarer Schnitt durch das Mausgehirn; *Unten:* Vergrößerung des schwarz eingegrenzten Bereiches. Abkürzungen (auszugsweise): AD = antedorsal nucleus; cc = corpus callosum; PVT = Paraventricular nucleus of the thalamus; SFO = Subfornikalorgan (roter Pfeil); sm = stria medullaris; TH = Thalamus; V3 = dritter Ventrikel; vhc = ventral hippocampal commissure.

2.4.3 Comet Assay

2.4.3.1 Nachweis von DNA-Schäden individueller Zellen

Der 1984 eingeführte und seitdem mehrfach optimierte Comet Assay ist eine sichere Methode, um DNA-Strangbrüche individueller eukaryotischer Zellen nachzuweisen [165-167].

Die zu analysierenden Zellen werden in einer Agaroselösung bei 37 °C auf speziell beschichteten Objektträgern eingekapselt, mit einer alkalischen Salzlösung lysiert und in einer Elektrophoresekammer für zwanzig Minuten einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die in der Agarose eingebettete, negativ geladene DNA wandert nun Richtung Anode. Durch DNA-Strangbrüche geschädigte, bruchstückhafte DNA wandert hier aufgrund ihrer geringeren Größe schneller zur Anode. Nicht geschädigte DNA verbleibt in ihrer stark gewundenen Form im Zellkern. Durch Färbung mit dem fluoreszierenden GelRed® im Anschluss an die Elektrophorese werden die Nukleinsäuren angefärbt und können unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die im elektrischen Feld aus der Zelle gewanderte DNA stellt sich unter dem Mikroskop als „Schweif eines Kometen“ (= der Zelle) dar und kann mittels geeigneter Bildanalyse-Software quantifiziert werden. Das Verhältnis von fluoreszierendem Schweif zu der Größe des zugehörigen Zelleibs repräsentiert die Anzahl der DNA-Strangbrüche und damit das Ausmaß des DNA-Schadens.

2.4.3.2 Durchführung

Die Zellen wurden geerntet, die Zellzahl bestimmt und dann eine Suspension mit einer Zelldichte von 1 Millionen pro Milliliter hergestellt. Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit vorgewärmter Agarose (0,5 % LMP) gemischt, 45 µl der Suspension auf einen Objektträger (OT) aufgebracht (je zwei OT pro Sample), mit einem Deckglas bedeckt, fixiert und getrocknet. Die Deckgläser wurden vorsichtig von der erstarrten LMP-Agarose abgezogen und die OT für

mindestens eine Stunde bei 4 °C in eine lichtgeschützte Küvette mit Lyselösung gestellt. Eine Elektrophoresekammer wurde in einer Eiswanne platziert und mit 4 °C kaltem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die OT wurden mit destilliertem Wasser gespült und für zwanzig Minuten zur DNA-Entwindung in einen Elektrolysepuffer gestellt. Im Anschluss wurde die Elektrophorese für zwanzig Minuten bei 25 V und 300 mA durchgeführt. Die OT wurden entnommen, für zehn Minuten mit Tris Puffer gewaschen, zehn Minuten in -20 °C kaltem Methanol fixiert und schließlich zehn Minuten im lichtgeschützten Brutschrank getrocknet. Zur Färbung wurde den OT 20 µl GelRed® aufpipettiert. Es wurde ein Tropfen Öl auf ein Deckglas gegeben und auf die OT gelegt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Komet 6.0 (Andor Technology, Belfast, UK) bei 20 x Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Labophot-2, Fa. Nikon). Pro Behandlung wurden je zwei OT mit 25 Zellen analysiert. Soweit nicht anders angegeben, wurde jede Behandlung dreimal wiederholt. Das angegebene Ergebnis beschreibt den prozentualen DNA-Anteil der Zelle im „Kometenschweif“.

2.4.4 Mikrokernfrequenztest

2.4.4.1 Nachweis von Chromosomenschäden

Der Mikrokernfrequenztest ermöglicht eine zuverlässige, visuelle Beurteilung von DNA-Schäden auf Chromosomenebene und kann nicht nur Verluste von ganzen Chromosomen detektieren, sondern auch einzelne Fragmente nach Chromosomenbrüchen [168]. Eine erhöhte Frequenz an Mikrokernen geht hierbei nachweislich mit einem erhöhten Krebsrisiko einher [61, 169, 170].

Da eine Erkennung der Mikrokerne nur nach einer seit Einwirkung des Agens erfolgten Zellteilung möglich ist, wird die Zytokinese mithilfe von Cytochalasin-B blockiert, um die Analyse auf sich teilende Zellen zu limitieren. Das Mykotoxin verhindert hierbei die Polymerisation von Actin-Monomeren und damit die Bildung von Mikrofilamenten, die zur Ausbildung des kontraktilen Ringes bei der mitotischen Zytoplasma-Teilung essentiell sind. Die Zellkerne

können sich weiter teilen, das Zytoplasma verliert diese Fähigkeit jedoch und eine Zelle mit zwei Zellkernen entsteht. Bleiben bei der Kernteilung nun Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke zurück, so entstehen die beschriebenen Mikrokerne, welche zum Einschätzen der Genotoxizität des zu untersuchenden Stoffes verwendet werden können.

2.4.4.2 Durchführung

Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet, fünf Minuten bei 1.000 rpm (rounds per minute; Umdrehungen pro Minute) und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf einer 6-well Platte unter Zugabe von 12 µl Cytochalasin-B neu kultiviert und über Nacht inkubiert. Nach einem kompletten Zellzyklus wurden die Zellen erneut geerntet, die Zellzahl bestimmt und im Anschluss mithilfe der Cytospin™ (fünf Minuten, 1.000 rpm) je 40.000 Zellen auf einen Objektträger (OT) aufgebracht. Die OT wurden in -20 °C kaltem Methanol für mindestens zwei Stunden konserviert, unter dem Abzug getrocknet und im Anschluss mit GelGreen® (5 µl, mindestens acht Minuten Einwirkzeit unter Deckglas) gefärbt. Färbelösung und Deckglas wurden danach mit destilliertem Wasser abgespült und die Zellen für zehn Minuten mit 10 µl DABCO eingedeckt.

Unter 400-facher Vergrößerung und Nutzung eines Long-Pass Fluoresceinisothiocyanat-Filters (FITC-Filters) wurden das rötlich fluoreszierende Zytoplasma beziehungsweise die gelblich/grünlich fluoreszierenden Kerne visualisiert. Pro OT wurden 1.000 Zellen ausgezählt mit Klassifizierung in Einkernige, Doppelkernige, Mehrkernige, Mitosen, Apoptosen sowie Doppelkernige mit Mikrokerneln. Anschließend wurden so viele Doppelkernige Zellen gezählt, bis insgesamt 1.000 von ihnen pro OT registriert wurden. Anhand der erhobenen Werte wurde der Cytochalasin-B-Proliferationsindex (PI) der Zellen nach der Methode von Eastmond und Tucker berechnet [171]:

$$\frac{\text{Einkernige} + (2 \cdot \text{Doppelkernige}) + (3 \cdot \text{Mehrkernige})}{\text{Einkernige} + \text{Doppelkernige} + \text{Mehrkernige}}$$

Je höher der PI, umso mehr Mitosen haben stattgefunden. Bei der Präsentation der Ergebnisse wurde auf eine Angabe des PI der Übersicht wegen verzichtet, auch weil dieser in allen Experimenten stabil bei $1,8 \pm 0,2$ lag.

2.4.5 Glutathion Assay

2.4.5.1 Bestimmung von oxidiertem- / reduziertem Glutathion

Das als Cystein-Reserve fungierende Glutathion ist eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien. Der chemische Zustand des Glutathion-Systems ist daher ein wertvoller Indikator für das intrazelluläre Milieu hinsichtlich oxidativer Stressoren. Mithilfe des Glutathion Assays (GSH-Assay) wird das Verhältnis von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) bestimmt [172]. Hierzu wird 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB; „Ellman's Reagenz“) verwendet, welches mit GSH unter Entstehung des Chromophors 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) reagiert. TNB kann photometrisch bei seinem Absorptionsmaximum von 412 nm nachgewiesen werden. Das als Nebenprodukt entstehende GSH-TNB kann durch das Enzym Glutathionreduktase (GR) gespalten und so „recycelt“ werden. Die GR spaltet außerdem GSSG in 2 x GSH. Die Bildungsrate von TNB ist dabei proportional zur GSH-Konzentration und konstant über die Zeit. Mithilfe einer Standardreihe kann eine Geradengleichung errechnet werden und eine unbekannte GSH-Konzentration anhand folgender Rechnung ermittelt werden:

$$[GSH]_{total} = [GSH] + 2 \cdot [GSSG]$$

2.4.5.2 Durchführung

Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und dann fünf Minuten mit Trypsin-EDTA bei 37 °C vom Gefäßboden gelöst. Das Trypsin wurde mit doppeltem Volumen Serum-enthaltenden Mediums neutralisiert, die Zellen geerntet und auf Eis gestellt. Bei 4 °C und 1.000 g wurde für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut für fünf Minuten bei 1.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Aufgrund der starken UV-Sensitivität von GSH/GSSG wurde das Zellpellet im Dunkeln in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert, die Zellmembranen mit einem Teflonpistill (im Röhrchen auf Eis) zerstört und im Anschluss kurz gründlich gemischt. Die Röhrchen wurden dann für fünf Minuten in ein Ultraschallbad gestellt, um die Zellstruktur komplett zu zerstören. Im Anschluss wurde bei 4 °C und 3.000 g für vier Minuten zentrifugiert. 800 µl des Überstandes (mit dem gelösten Glutathion) wurden im Dunkeln abgenommen und in ein UV-undurchlässiges Röhrchen pipettiert. Aus diesem Überstand wurde später die totale GSH Konzentration gemessen.

Zur Bestimmung der GSSG Konzentration wurden von den 800 µl genau 100 µl in ein weiteres, UV-undurchlässiges Röhrchen pipettiert. Diesem wurde umgehend 2 µl 2-Vinylpyridin hinzugegeben, um das enthaltene freie GSH zu binden. Im Anschluss wurden die Röhrchen für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Nach dieser Zeit wurde 6 µl Triethanolamin hinzugefügt, um das überschüssige 2-Vinylpyridin zu neutralisieren. Während der etwa zehnmütigen Neutralisationsreaktion standen die Röhrchen auf einem Schüttler.

Für die photometrische Messung wurden je 20 µl der Proben (immer dreimal) sowie der Standardreihen und Leerproben auf eine 96-well Platte pipettiert. Dann wurde 120 µl einer DTNB/GR-Mischung hinzugegeben. Nach dreißig Sekunden Wartezeit wurde 60 µl NADPH-Lösung hinzu pipettiert und unverzüglich die photometrische Messung bei 405 nm durchgeführt.

Als Messzeitpunkte wurden null, eine und zwei Minuten gewählt, so dass die Geschwindigkeit der Absorptionsänderung festgestellt werden konnte. Zunächst wurde die Konzentration von GSH_{total} gemessen, gefolgt von der Bestimmung der GSSG Konzentration. Letztere wurde als äquivalente GSH Konzentration gemessen, da ein GSSG Molekül durch die GR zu zwei GSH Molekülen gespalten wird, welche dann mit DTNB reagieren können. Die Messergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle exportiert.

Mittels der Bradford-Methode wurde aus dem Überstand (Röhrchen zur Messung der GSH_{total} Konzentration) die Proteinkonzentration bestimmt. So wurde sichergestellt, dass die gleiche Zellzahl geerntet und für die Messung verwendet wurde.

Die erhobenen Werte wurden wie beschrieben nach der Formel $[GSH]_{total} = [GSH] + 2 * [GSSG]$ zur Berechnung der GSH-Konzentration verwendet. Das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion ($[GSSG]/[GSH]$) ist umso größer, je höher der oxidative Stresslevel der Zelle ist.

2.4.6 Nitroblau-Tetrazolium Assay

2.4.6.1 Quantifizierung intrazellulären Superoxids

Das Prinzip hinter dem Nitroblau-Tetrazolium (NBT)-Assay ist der photometrische Nachweis und die Quantifizierung von intrazellulärem Superoxid [173]. Mit dem wasserlöslichen NBT inkubierte Zellen nehmen dieses in ihr Zytoplasma auf. Durch die Reaktion mit Superoxid wird NBT zu unlöslichen, bläulichen Formazankristallen reduziert. Diese Kristalle können mit DMSO gelöst werden und haben ein Absorptionsmaximum bei etwa 620 nm [174, 175], welches photometrisch in der entstandenen Lösung quantifiziert werden kann.

Da die NOX (NADPH-Oxidase) für einen Großteil der Superoxid-Generation verantwortlich ist, kann die Messung der Superoxid-Konzentration als indirekte Möglichkeit gesehen werden die NOX-Aktivität zu messen [174]. Es ist

jedoch zu bedenken, dass es noch weitere Enzyme gibt, die kleinere Mengen Superoxid produzieren können [176]. Der NBT Assay kann Superoxid, unabhängig von dessen Entstehungsweg, nachweisen.

2.4.6.2 Durchführung

Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet, fünf Minuten bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, je 10.000 Zellen in 100 µl Medium auf eine 96-well-Platte pipettiert (je dreimal) und die Platte dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und durch 10 µl Behandlungslösung und 90 µl 1,2 mM NBT ersetzt. Die 96-well-Platte wurde zunächst lichtgeschützt für sechzig Minuten bei 37 °C inkubiert, dann die Flüssigkeit abgenommen und danach jedes Well mit 100 µl warmem PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 100 µl Methanol (50 %-ig) zur Fixierung in jedes Well zugegeben und alles für zehn Minuten erneut lichtgeschützt inkubiert. Das Methanol wurde abgenommen und die 96-well-Platte für dreißig Minuten zum Trocknen unter den Abzug gestellt. Dann wurden zum Lysieren der Zellen 30 µl KOH zugegeben und die 96-well-Platte für zehn Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl DMSO wurde weitere zehn Minuten auf dem Schüttler inkubiert.

Die Messung der Absorption bei 620 nm erfolgte mit der Software „SoftMax Pro“ (Molecular Devices, San José, USA) am Mikroplattenleser. Aus den drei Einzelmessungen wurde der Mittelwert gebildet.

2.4.7 TBARS-Assay

2.4.7.1 Nachweis von Malondialdehyd

Der Thiobarbituric Acid Reactive Substances-, oder kurz TBARS-Assay, ermöglicht es Malondialdehyd (MDA) nachzuweisen. MDA entsteht bei der Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und ist ein Marker von oxidativem Stress. Die Methode basiert auf der Reaktion von MDA mit Thiobarbituric Acid (TBA). Diese bilden unter Hitze- und Säureeinwirkung ein bei 532 nm photometrisch nachweisbares Produkt [177].

2.4.7.2 Durchführung

Die Zellen wurden geerntet, mit kaltem PBS gewaschen, gezählt und anschließend in VE-H₂O resuspendiert (1 Millionen Zellen pro Milliliter). Zur Lyse der Zellen wurden diese je drei Mal für zehn Sekunden in ein Ultraschallbad gestellt beziehungsweise je drei Mal eingefroren (unter -20 °C) und aufgetaut. Zur Säure-Behandlung wurden 300 µl Probe und 300 µl „TBARS acid reagent“ gemischt. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei RT wurde für vier Minuten bei 12.000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Für die Erstellung einer Eichkurve wurde eine Standardreihe hergestellt. Hierfür wurde aus 100 µl „TBARS standard“ und 200 µl „TBARS acid reagent“ unter dreißigminütigem Schütteln eine Stocklösung erstellt. Hieraus wurde eine Verdünnungsreihe mit 16,7 µM, 8,35 µM, 4,18 µM, 2,09 µM, 1,04 µM, 0,52 µM sowie 0,26 µM hergestellt. Als Standard für den Nullpunkt wurde VE-H₂O verwendet. Pro Sample wurden 150 µl auf eine 96-well-Platte pipettiert und 75 µl „TBA reagent“ zugegeben. Nun erfolgte die erste photometrische Messung bei 532 nm. Später wurde nach einer dreistündigen Inkubation bei 50 °C eine zweite photometrische Messung bei 532 nm durchgeführt. Die Differenz der ersten und zweiten photometrischen Messwerte wurde errechnet und mithilfe der erstellten Eichkurve aus der Verdünnungsreihe die MDA-Konzentration in µM abgelesen.

2.4.8 γ -H2AX Färbung

2.4.8.1 *Immunhistochemischer Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen in Gewebeschnitten*

Histone sind Proteine, die eine zentrale Rolle bei der platzsparenden Organisation der DNA spielen. Eines dieser Histone, H2AX, wird bei DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Kinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) unter Bildung von γ -H2AX phosphoryliert. Ein spezifischer Antikörper kann das γ -H2AX binden und mithilfe eines Zweitantikörpers sichtbar machen. Die gefärbten Bereiche korrelieren mit den DNA-Doppelstrangbrüchen und können mikroskopisch quantifiziert werden.

2.4.8.2 *Durchführung*

Die OT mit den Schnitten durch das murine SFO (siehe **Kapitel 2.3.1**) wurden für sechzig Minuten bei 60 °C im Brutschrank getrocknet. Zum Entparaffinieren wurden die OT dreimal für je vier Minuten in eine Roti-Histol™ Lösung, dreimal für je zwei Minuten in eine 100 %ige Ethanol-Lösung und zuletzt für zwei Minuten in eine 70 %ige Ethanol-Lösung gestellt. Im Anschluss wurden die OT mit PBS gewaschen. Zur Antigendemaskierung wurden die OT für fünfzehn Minuten in einen 95 °C heißen Citratpuffer gestellt, für dreißig Minuten im Citratpuffer abgekühlt und dann mit PBS gewaschen. Die Gewebestrukturen auf dem OT wurden mit einem Fettstift umrandet, zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 250 μ l Blockierlösung (Donkey Serum in PBS) belegt, lichtgeschützt für sechzig Minuten bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert und mit PBS gewaschen. Mit 250 μ l 3 %-igem H₂O₂ für fünfzehn Minuten bei RT wurde die endogene Peroxidase blockiert und die OT im Anschluss mit PBS gewaschen. Nun wurden nacheinander je 200 μ l 0,001 % Avidin beziehungsweise 0,001 % Biotin auf den OT pipettiert, für fünfzehn Minuten bei RT inkubiert und dann mit PBS gewaschen. Es wurden 100 μ l des 1:200 in

SignalStain™ verdünnten Primärantikörpers hinzugegeben, der OT mit Parafilm abgedeckt und lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Am Folgetag wurde mit PBS gewaschen, 100 µl des 1:200 in PBS verdünnten Sekundärantikörpers aufgetragen und der OT für 45 Minuten bei RT inkubiert. Erneut wurde mit PBS gewaschen, anschließend folgten das Auftragen von 250 µl ABC-Reagenz und das Inkubieren für dreißig Minuten bei RT. Erneut wurde mit PBS gewaschen, dann 200 µl DAB-Reagenz aufgetragen und der OT für zehn Minuten inkubiert. Nach sorgfältigem, mehrstufigem Spülen in verschiedenen mit H₂O gefüllten Küvetten wurden die Gewebeschnitte für zehn Sekunden mit Hämatoxylin gefärbt und unverzüglich im Anschluss für fünf Minuten mit H₂O abgewaschen. Zur Entwässerung wurden die OT für eine Minute in 70 %iges Ethanol, viermal für zwei Minuten in 100 %iges Ethanol, eine Minute in Roti™-Histol und zuletzt zweimal für drei Minuten in Roti™-Histol-Lösung gestellt. Die OT wurden getrocknet, mit Eukitt® eingedeckt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop durch Auszählung der positiv angefärbten Zellkerne.

2.4.9 Polymerasekettenreaktion

2.4.9.1 Amplifikation geringer Mengen von Nukleinsäuren

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein 1983 vom Chemiker Kary Mullis entwickeltes Verfahren zur Amplifikation kleinster Mengen von Nukleinsäure. Diese können dann für weitere Untersuchungen verwendet werden. Die PCR besteht im Prinzip aus den drei Schritten Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und Elongation. Diese Schritte werden dann mehrmals wiederholt.

Für den Nachweis von Ribonukleinsäure (RNA) kann eine Reverse Transkriptase eingesetzt werden, mit deren Hilfe ein komplementärer DNA Strang synthetisiert wird (cDNA). Dieser cDNA Strang kann nun in der PCR eingesetzt werden (RT-PCR).

2.4.9.2 RNA-Extraktion

Die Zellen wurden geerntet, gespült und zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert. Für die RNA Extraktion wurde das „High Pure RNA Isolation Kit“ (Fa. Roche) verwendet. Es wurden 400 µl Lysis/-Binding Buffer zur Probe gegeben und diese für fünfzehn Sekunden gut gemischt. Die Probe wurde zum Herausfiltern der RNA in ein „High Pure Filter Tube“ gegeben und fünfzehn Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und der Filter wieder auf ein Röhrchen gesetzt. Dann wurden 90 µl „DNase Inkubations Buffer“ mit 10 µl „DNase I“ gemischt, auf den Filter pipettiert und für fünfzehn Minuten bei RT inkubiert. 500 µl „Wash Buffer I“ wurden auf den Filter pipettiert und alles für fünfzehn Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Das Gleiche wurde mit „Wash Buffer II“ wiederholt. Dann wurden 200 µl „Wash Buffer II“ auf den Filter gegeben und für zwei Minuten bei 13.000 g zentrifugiert um verbliebene Pufferreste zu entfernen. Um die RNA aus dem Filter zu eluieren, wurde 75 µl Elutionspuffer auf den Filter pipettiert und für eine Minute bei 8.000 g zentrifugiert.

Die eluierte RNA wurde entweder sofort weiterverwendet, oder bei -80 °C für spätere Analysen eingefroren. 5 µl der Probe wurde für die Bestimmung der RNA-Konzentration mit einem UV-/Vis-Spektrophotometer bei 260 nm verwendet. Zudem wurde eine Messung bei 280 nm durchgeführt und der Quotient der Messungen bei 260/280 nm gebildet um eine Protein-Kontamination auszuschließen.

2.4.9.3 cDNA Synthese (RT-PCR)

Im nächsten Schritt wurde eine komplementäre cDNA der extrahierten RNA synthetisiert. Bei der cDNA Synthese wird die RNA mithilfe einer Reversen Transkriptase (RT) in einen komplementären DNA-Doppelstrang umgeschrieben, welcher deutlich stabiler und so für längere Zeit verwertbar ist. Denn wegen RNAsen in unserer Umwelt ist RNA extrem fragil. Für die cDNA Synthese wurde

das „RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fa. Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der in **Tabelle 9** aufgeführte Ansatz wurde für dreißig Minuten bei 50 °C im Thermozykler (PTC-100/200, Fa. MJ Research) inkubiert, gefolgt von fünf Minuten bei 85 °C zum Abbruch der Reaktion. Die cDNA Proben wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C für spätere Analysen eingefroren.

Template RNA	1 µg
Oligo dT-Primer	1 µl
dNTP Mix (100 nM)	1 µl
RNAse freies VE-H ₂ O	12 µl
5x RT Buffer	4 µl
RevertAid Premium Enzyme Mix	1 µl

Tabelle 9: Ansatz für die RT-PCR.

Abkürzungen: dNTP = Deoxynucleotide; PCR = Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion); RNA = Ribonukleinsäure; RT = Reverse Transkriptase; VE-H₂O = destilliertes Wasser.

2.4.9.4 Primer

Mehrere Primer mit Zusammenhang zum RAAS wie Renin (Ren), Angiotensinogen (AGT) und Angiotensin converting enzyme (ACE) kamen zur Anwendung. Als Indikatoren für das Vorliegen von vermehrtem oxidativen Stress wurden die Genexpression der DNA-Reparaturenzyme Oxoguanine glycosylase (Ogg1) und Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) sowie der Glutathionperoxidase 1 (GPx1) und Hämoxygenase 1 (HO-1) studiert. β -Actin wurde als Haushaltsgen mitbestimmt. Die in der PCR zu Verwendung gekommenen Primer sind in **Tabelle 10** aufgeführt.

Primer	Forward-Sequenz	Reverse-Sequenz
β-Actin	TACAGCTTCACCACCACAGC	GTGGACAGTGAGGCCAAGAT
Ren	TTTGACGGGGTTCTAGGCAT	CCTGGGAGAGAATGTGGTCA
AGT	CCACCCCTTCCATCTCCTTT	ATTCACAGGGGAGGTCTTGG
ACE	TGAGAAAAGCACGGAGGTATCC	AGAGTTTTGAAAGTTGCTCACATCA
GPx1	TTGGTGATTACTGGCTGC	TGATATTCAGCACTTTATTCTTAGTAG
Ogg1	TGAGACTGCTGAGACAAGA	GGAAGCCATGATAAGTGACA
PARP-1	GGAAAGGGATCTACTTTGCCG	TCGGGTCTCCCTGAGATGTG
HO-1	TCTCAGGGGGTCAGGTC	GGAGCGGTGTCTGGGATG

Tabelle 10: Verwendete Primer.

Abkürzungen: Ren = Renin; AGT = Angiotensinogen; ACE = Angiotensin-Converting-Enzyme; Gpx1 = Glutathionperoxidase 1; Ogg1 = Oxoguanine glycosylase; PARP-1 = Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; HO-1 = Hämoxygenase 1.

2.4.9.5 Bestimmung der optimalen PCR Bedingungen

Zunächst wurde für jedes verwendete Primer-Paar in vielen Versuchen die optimale Annealing-Temperatur sowie die optimale Anzahl an Zyklen bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 11** aufgeführt.

	Annealing-Temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
ACE	54	40
AGT	53	40
GPx1	55	34
HO-1	54	40
Ogg1	57	40
PARP-1	55	34
Ren	53	40
β-Actin	55	20

Tabelle 11: Optimale PCR-Temperatur und -Zyklen für verwendete Primer.

Abkürzungen: Ren = Renin; AGT = Angiotensinogen; ACE = Angiotensin-Converting-Enzyme; Gpx1 = Glutathionperoxidase 1; Ogg1 = Oxoguanine glycosylase; PARP-1 = Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; HO-1 = Hämoxygenase 1.

2.4.9.6 Durchführung PCR

Der Ansatz für die PCR ist in **Tabelle 12** aufgeführt. Als Polymerase wurde entweder „REDTaq[®]“ (Fa. Sigma-Adrich) oder „OneTaq[®] 2x Master Mix with Standard Buffer“ (Fa. BioLabs) verwendet.

Primer (forward), 25 µM	1,0 µl
Primer (reverse), 25 µM	1,0 µl
cDNA (50 ng/µl)	1,0 µl
Taq Polymerase	12,5 µl
Nuklease-freies H ₂ O	9,5 µl

Tabelle 12: PCR-Ansatz.

Abkürzungen: cDNA = complementary DNA (komplementäre DNS); PCR = Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)

Die PCR-Produkte wurden mit einer Gelelektrophorese nachgewiesen. Hierfür wurde je 20 µl der Probe sowie 3 µl des Längenstandards „GeneRuler 100 bp DNA Ladder“ (Fa. Thermo Fisher Scientific) auf das Gel aufgetragen. Für 55 Minuten wurde es in der mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gefüllten Elektrophoresekammer einer Spannung von 80 V ausgesetzt und im Anschluss unter UV-Transluminationsmithilfe des „Gel Doc[®] 2000“ (Fa. Bio-Rad) fotografiert.

2.4.10 Bradford-Test

2.4.10.1 *Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen*

Der 1976 entwickelte Bradford-Test ermöglicht die relativ einfache photometrische Bestimmung von unbekanntem Proteinkonzentrationen [178]. Die sogenannte Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) und hat im ungebundenen Zustand eine rötliche Farbe. Mischt man diese mit einer Proteinlösung, so bilden sich bläuliche Protein-Farbstoff-Komplexe, die bei einem Absorptionsmaximum von 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. Durch Eichproben bekannter Proteinkonzentration (Protein: Bovines Serumalbumin, BSA) wird eine Eichkurve erstellt, deren Gleichung für das Errechnen der Proteinkonzentration der Probe verwendet wird.

2.4.10.2 *Durchführung*

Für die Erstellung einer Eichgeraden wurden 800 µl der Eichproben mit Konzentrationen von 0 / 2 / 4 / 8 / 12 / 16 / 20 µg/ml mit je 200 µl Bradford-Reagenz gemischt und in Messküvetten pipettiert. Es wurden je zwei Messungen pro Probe gemacht und aus den Daten eine Eichkurve erstellt. Mithilfe der Geradengleichung wurde später die Konzentration der zu bestimmenden Probe errechnet. Je Probe wurden insgesamt sechs Messungen durchgeführt. 5 µl der Probe wurden mit 45 µl Millipore H₂O gemischt. Anschließend wurden die Messküvetten wie folgt vorbereitet:

Je 3 x	5 µl der Verdünnung +	795 µl Millipore H ₂ O +	200 µl Bradford-Reagenz
Je 3 x	10 µl der Verdünnung +	790 µl Millipore H ₂ O +	200 µl Bradford-Reagenz

Der Mittelwert aus drei Einzelmessungen wurde errechnet und mithilfe der Eichkurve die Proteinkonzentration ausgerechnet.

2.5 Statistik

Die statistischen Berechnungen und Analysen wurden mit der IBM Software SPSS Statistics (Version 24.0, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, sind die Daten als der Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die Signifikanz einer bivariaten, linearen Korrelation wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurde auf eine Normalverteilung der Daten getestet. Auf Signifikanz normalverteilter Daten wurde mit der Varianzanalyse und anschließender Bonferroni-Korrektur geprüft. Für nicht normalverteilte Daten kam der Mann-Whitney U-Test beziehungsweise der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen und dementsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer Positivkontrolle

Eine Positivkontrolle demonstriert die Funktionsfähigkeit der Methode zum Zeitpunkt des Experiments und hilft sicherzustellen, dass ein beobachteter Effekt nicht durch Störfaktoren verursacht wurde. Im Folgenden wurde das Alkylans und Karzinogen Methylmethansulfonat (MMS) als Positivkontrolle etabliert. Die Versuchsreihe wurde mit SH-SY5Y-Zellen durchgeführt, als Methode zur Messung der DNA-Schädigung wurde der Comet Assay gewählt (*Anmerkung: Die Etablierung der Positivkontrolle basiert auf einer Versuchsreihe, nicht wie alle folgenden Experimente auf drei unterschiedlichen Versuchsreihen*).

Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an MMS behandelt (12,5 µg/ml oder 113,5 µM, 25 µg/ml oder 227 µM, 50 µg/ml oder 454 µM und zuletzt 200 µg/ml oder 1,8 mM).

Es zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen MMS-Konzentration und prozentualer DNA-Schädigung ($r = 0,98$, $p < 0,0001$; **Abbildung 6**). Ebenfalls signifikant war der Vergleich der MMS-Konzentrationen untereinander (alle $p < 0,01$). Als Negativkontrolle diente in diesem und allen folgenden Experimenten eine Behandlung mit PBS.

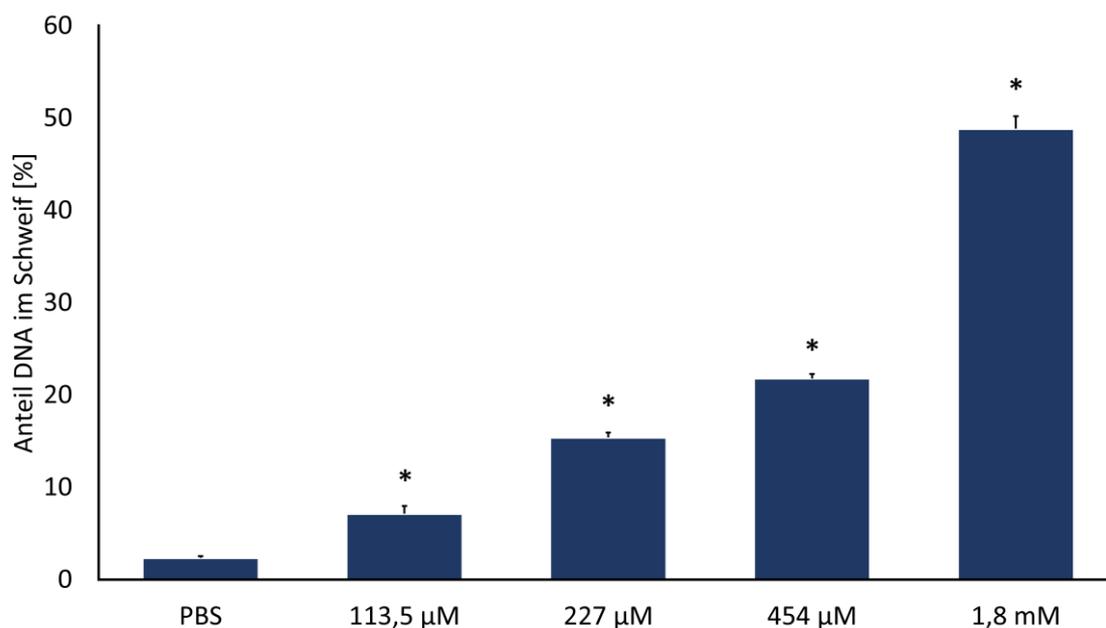


Abbildung 6: MMS-Verdünnungsreihe.

Die Abbildung zeigt die DNA-Schädigung durch verschiedene MMS-Konzentrationen in SH-SY5Y Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von DNA im „Kometenschweif“ gemessen mit dem Comet Assay. * $p < 0,0001$ gegenüber der Negativkontrolle. Abkürzungen: MMS = Methylmethansulfonat; PBS = phosphate-buffered saline.

Eine MMS-Konzentration von 113,5 μM reichte aus, um den gewünschten Effekt zu erreichen und wurde fortan bei allen folgenden Experimenten verwendet.

3.2 AT-II-induzierte DNA-Schädigung

Um zu testen, ob AT-II wie in Nierenzellen [160] auch DNA-Schäden in Nervenzellen verursachen kann, wurden SH-SY5Y-Zellen jeweils für 4 Stunden mit einer AT-II-Konzentration von 50, 100, 200 und 400 nM behandelt und die Schädigung mittels Comet Assay quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung in % DNA-Anteil im Schweif angegeben.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Dosierung der AT-II-Behandlung und DNA-Schädigung der SH-SY5Y-Zellen ($r = 0,90$, $p < 0,0001$; **Abbildung 7**). Im Vergleich zur Negativkontrolle ($3,0 \pm 0,6 \%$) zeigte sich in den 50 nM- ($3,9 \pm 0,6 \%$; $p > 0,05$) und 100 nM-Behandlungen ($3,9 \pm 0,8 \%$; $p > 0,05$) kein signifikant höherer DNA-Anteil im Schweif. Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle erreichten die 200 nM- ($5,4 \pm 0,6 \%$; $p < 0,05$) und die 400 nM-Behandlungsgruppen ($7,3 \pm 0,8 \%$; $p < 0,005$). Beim Vergleich der AT-II-Gruppen untereinander wurde nur zwischen der 200 nM- und 400 nM-Behandlung ein signifikantes Ergebnis erreicht ($p < 0,05$).

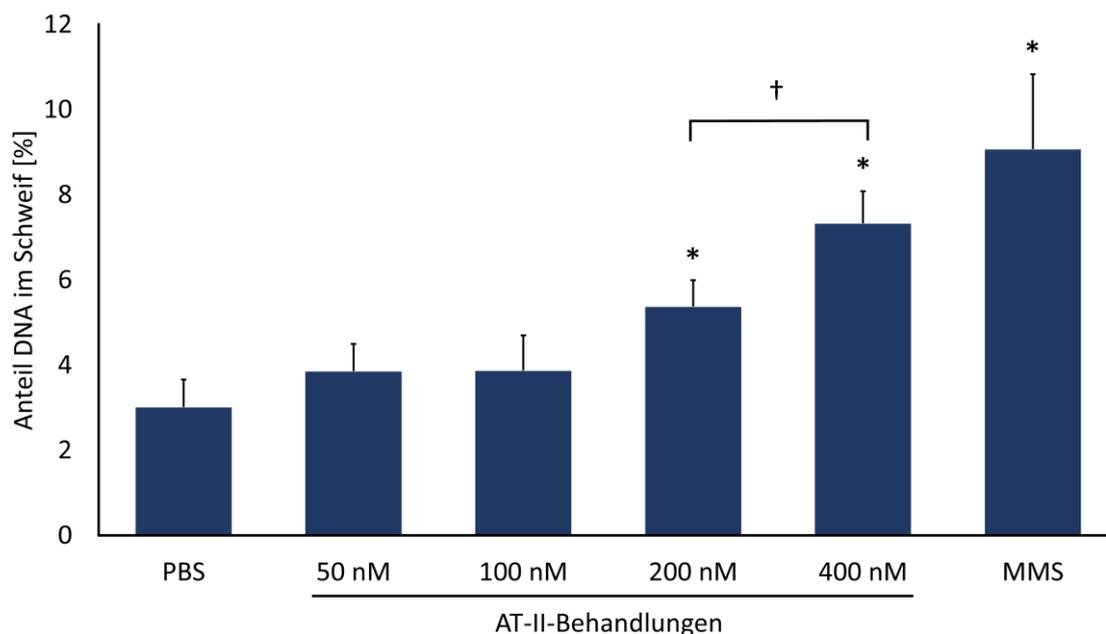


Abbildung 7: DNA-Schädigung durch AT-II.

Die Abbildung zeigt die DNA-Schädigung in SH-SY5Y Zellen, welche über vier Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Angiotensin II (AT-II) behandelt wurden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von DNA im „Kometenschweif“ gemessen mit dem Comet Assay. * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle (PBS = phosphate-buffered saline). † $p < 0,05$ zwischen den 200 nM- und 400 nM-Behandlungen. Positivkontrolle: Methylmethansulfonat (MMS).

Im Mikrokernfrequenztest konnte das Ergebnis bestätigt werden. Die Ergebnisse sind als Mikrokerne pro 1.000 binukleäre Zellen angegeben. Hier zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen AT-II-Konzentration und Anzahl der Mikrokerne ($r = 0.84$, $p < 0,0001$; **Abbildung 8**). Bereits eine Konzentration von 50 nM AT-II ($12,7 \pm 0,6$ Mikrokerne) war in den untersuchten SH-SY5Y Zellen imstande, eine signifikante Erhöhung der Mikrokerne gegenüber der Negativkontrolle ($6,5 \pm 0,4$) auszulösen ($p < 0,0005$). Ebenso konnten die 100 nM- ($18,3 \pm 1,4$; $p < 0,001$), die 200 nM- ($22,7 \pm 4,5$; $p < 0,01$) und die 400 nM-Behandlungsgruppen ($25,8 \pm 4,1$; $p < 0,005$) Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle erreichen. Beim Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen 50 nM und 100 nM ($p < 0,05$). Die Dosissteigerungen von 100 nM auf 200 nM ($p = 0,27$) und von 200 nM auf 400 nM ($p = 0,50$) führten jedoch zu keinem signifikanten Anstieg der Mikrokernfrequenz. Der PI lag bei 1,8.

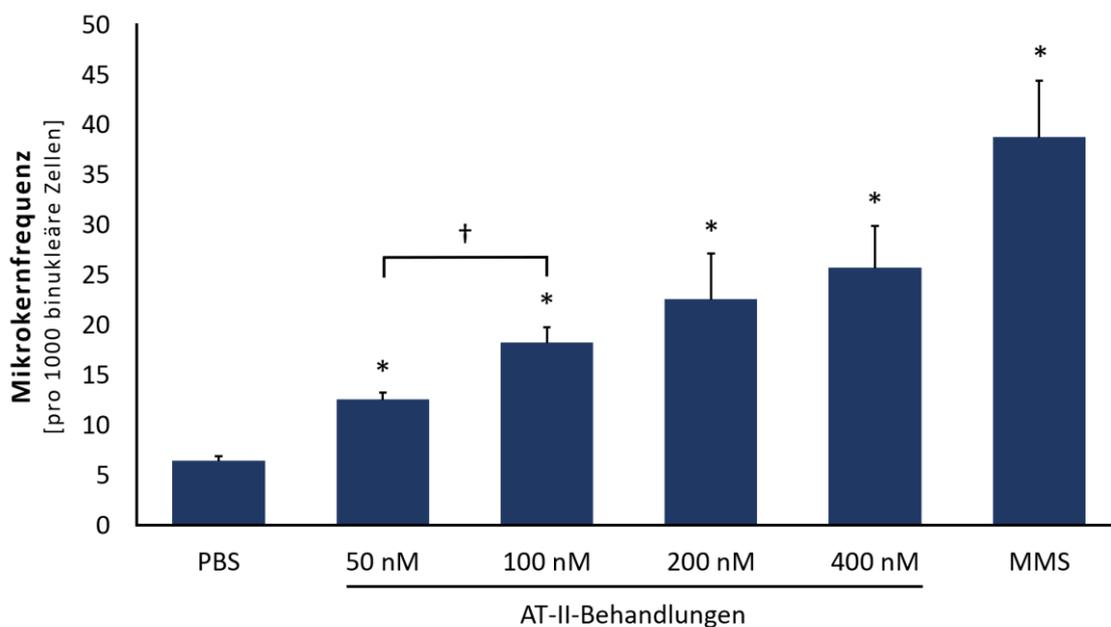


Abbildung 8: Mikrokernfrequenz nach AT-II-Behandlung.

Die Abbildung zeigt die Mikrokernfrequenz in SH-SY5Y Zellen, welche über vier Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Angiotensin II (AT-II) behandelt wurden. Dargestellt ist die Anzahl an Mikrokernen pro 1000 binukleäre Zellen gemessen mit dem Mikrokernfrequenztest. * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle (PBS = phosphate-buffered saline); † $p < 0,05$ zwischen den 50 nM- und 100 nM-Behandlungen. Positivkontrolle: Methylmethansulfonat (MMS).

Ähnliche Effekte wurden bei den mit AT-II-behandelten HT-22 Zellen beobachtet (**Abbildung 9**). Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen AT-II Konzentration und Mikrokernfrequenz ($r = 0,56$, $p < 0,05$). Im Vergleich der Negativkontrolle ($7,0 \pm 2,2$) mit der 50 nM- ($12,7 \pm 3,0$; $p = 0,09$), der 100 nM- ($14,0 \pm 6,1$; $p = 0,20$) sowie der 200 nM-Behandlungsgruppe ($15,0 \pm 4,9$; $p = 0,10$) wurde jedoch keine Signifikanz erreicht. Lediglich die 400 nM-Behandlungsgruppe wies eine signifikante Zunahme der Mikrokerne im Vergleich zur Negativkontrolle auf ($17,8 \pm 4,1$; $p < 0,05$). Im Vergleich der AT-II-Behandlungsgruppen untereinander zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen der Mikrokernfrequenz. Auch hier lag der PI bei 1,8.

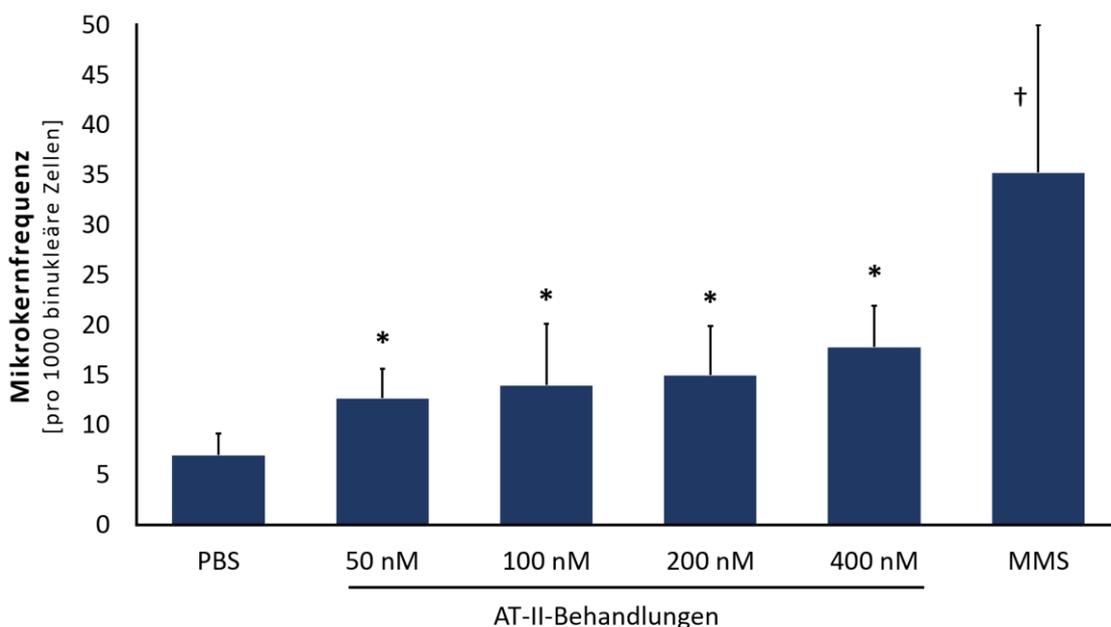


Abbildung 9: Mikrokernfrequenz nach AT-II-Behandlung #2.

Die Abbildung zeigt die Mikrokernfrequenz in HT-22 Zellen, welche über vier Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Angiotensin II (AT-II) behandelt wurden. Dargestellt ist die Anzahl an Mikrokernen pro 1000 binukleäre Zellen gemessen mit dem Mikrokernfrequenztest. * $p < 0,05$ bzw. † $P < 0,01$ gegenüber der Negativkontrolle (PBS = phosphate-buffered saline). Positivkontrolle: Methylmethansulfonat (MMS).

Die Ergebnisse dieser ersten Experimente zeigen, dass die verwendeten AT-II-Konzentrationen imstande sind, DNA-Schäden in neuronalen Zellen zu verursachen.

3.3 AT-II-induzierte Superoxidgeneration

Um die Hypothese zu testen, ob die beobachteten DNA-Schäden tatsächlich durch ROS entstanden sind, wurde der NBT-Assay durchgeführt. Dieser kann Superoxid nachweisen, welches unserer Hypothese nach vermehrt durch die NOX produziert wird. Die Absorption bei 620 nm entspricht der intrazellulären Superoxidkonzentration. Als Positivkontrolle diente eine Behandlung mit Antimycin A, das den mitochondrialen Komplex III inhibiert und zu einer Unterbrechung des Elektronentransfers zu erhöhten Superoxid-konzentrationen führt [179]. Dreißig Minuten nach Behandlung von HT-22 Zellen mit 200 nM

beziehungsweise 400 nM AT-II konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Superoxid- und der AT-II-Konzentration festgestellt werden ($r = 0,50$, $p < 0,01$; **Abbildung 10**). Gegenüber der Negativkontrolle ($0,092 \pm 0,007$) war sowohl die Superoxid-Konzentration in der 200 nM AT-II- ($0,127 \pm 0,024$; $p < 0,05$) als auch in der 400 nM AT-II-Behandlung ($0,152 \pm 0,062$; $p < 0,05$) signifikant höher.

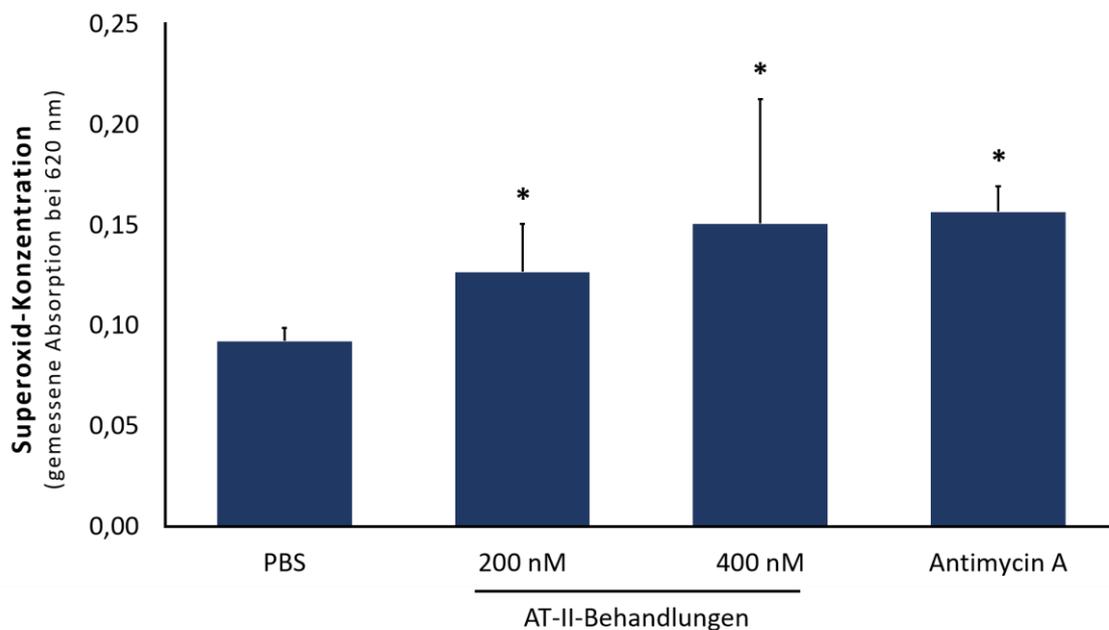


Abbildung 10: Superoxidgeneration durch AT-II.

Die Abbildung zeigt die Superoxid-Konzentration von HT-22 Zellen, welche über dreißig Minuten mit 200 nM beziehungsweise 400 nM Angiotensin II (AT-II) behandelt wurden. Dargestellt ist die photometrisch gemessene Absorption bei 620 nm unter Verwendung des NBT Assays. Als Positivkontrolle diente eine Behandlung mit dem Mykotoxin Antimycin A. * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle (PBS = phosphate-buffered saline).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine AT-II Behandlung zu erhöhten Superoxid-Konzentrationen in HT-22 Zellen führt. Die zuvor beobachteten DNA-Schäden könnten durch dieses Superoxid verursacht werden, welches möglicherweise über NOX produziert wird.

3.4 Schutz vor AT-II-ind. DNA-Schäden durch NOX-Inhibition

Um zu beweisen, dass das Superoxid durch NOX produziert wird, wurde geprüft, wie sich eine NOX-Inhibition durch den spezifischen NOX-Inhibitor VAS2870 auf die AT-II-induzierte DNA-Schädigung in HT-22 Zellen auswirkt. Eine Gruppe wurde für vier Stunden mit VAS2870 (1 μ M) beziehungsweise mit AT-II (200 nM) alleine, eine dritte Gruppe mit VAS2870 und AT-II gleichzeitig behandelt. Die AT-II-Behandlungsgruppe ($21,7 \pm 2,6$) hatte signifikant mehr Mikrokerne als die PBS- ($7,7 \pm 1,3$; $p < 0,005$) und VAS2870-Behandlungen ($9,7 \pm 2,6$; $p < 0,01$). Eine gleichzeitige AT-II- und VAS2870-Behandlung hingegen führte zu einer annähernd normalisierten Mikrokernfrequenz gegenüber der AT-II-Behandlung alleine ($10,3 \pm 1,3$; $p = 0,005$). VAS2870-behandelte Zellen (mit oder ohne AT-II) zeigten gegenüber der Negativkontrolle keinen Unterschied in der Mikrokernfrequenz ($p > 0,05$; siehe **Abbildung 11**).

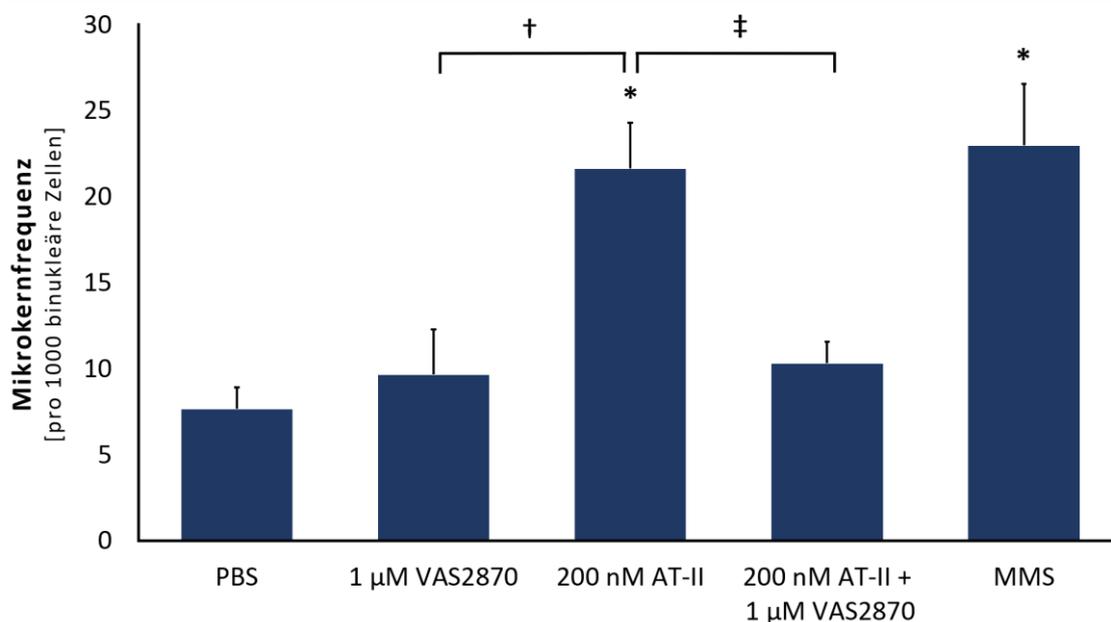


Abbildung 11: Mikrokernfrequenz nach AT-II-Behandlung mit / ohne NOX-Inhibition.

Die Abbildung zeigt die Mikrokernfrequenz in HT-22 Zellen nach vierstündiger Behandlung mit 200 nM Angiotensin II (AT-II), 1 μ M des NOX-Inhibitors VAS2870 (VAS2870) oder VAS2870 und AT-II gleichzeitig (AT-II + VAS2870). * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle (PBS = phosphate-buffered saline); † $p < 0,01$ AT-II- gegenüber VAS2870-Behandlung; ‡ $p = 0,005$ AT-II-Behandlung gegenüber gleichzeitiger Behandlung mit AT-II / VAS2870. Abkürzungen: MMS = Methylmethansulfonat; NOX = NADPH-Oxidase.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine NOX-vermittelte Superoxidproduktion für die AT-II-induzierten DNA-Schäden verantwortlich ist.

3.5 Schutz vor AT-II-induzierten DNA-Schäden durch AT₁R-Antagonisierung

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass eine AT-II-Behandlung zu vermehrten DNA-Schäden aufgrund von erhöhten intrazellulären Superoxidkonzentrationen führt, und dass dieses Superoxid über NOX produziert wird.

In diesem Experiment wurde die Hypothese untersucht, ob die beobachtete Toxizität über eine Aktivierung des AT₁R begonnen wird.

Hierfür wurde mithilfe des Comet Assays in SH-SY5Y Zellen untersucht, wie sich eine Antagonisierung des AT₁R durch Candesartan auf die AT-II-induzierten DNA-Schäden auswirkt. Die drei zu untersuchenden Proben wurden je vier Stunden mit Candesartan (5 μ M), AT-II (200 nM) beziehungsweise gleichzeitig mit Candesartan und AT-II behandelt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 12** dargestellt.

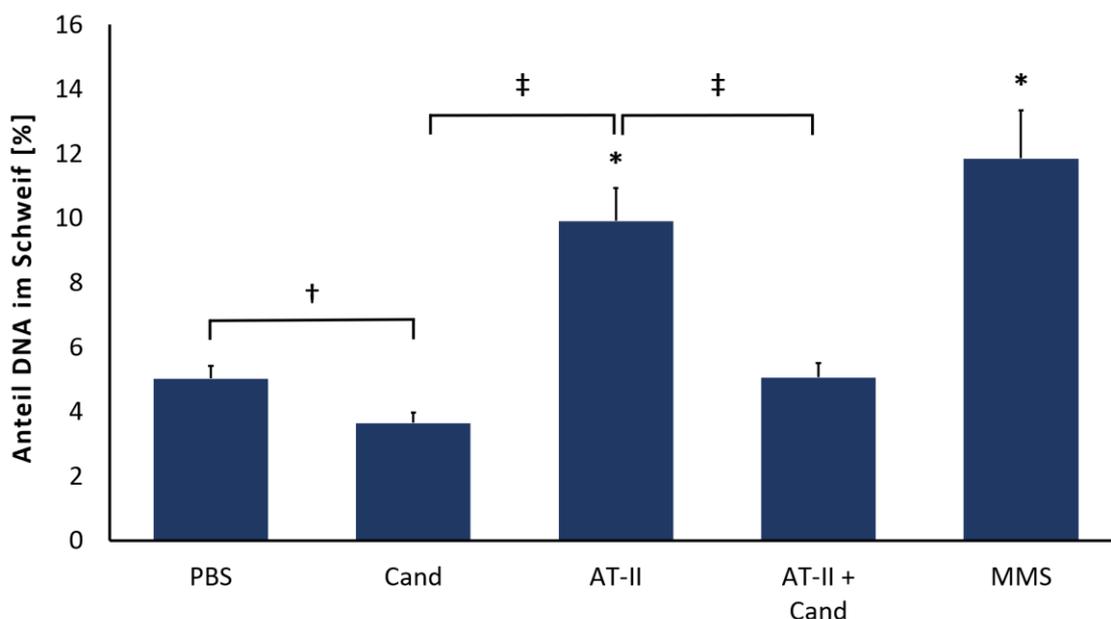


Abbildung 12: DNA-Schäden nach AT-II-Behandlung mit / ohne AT₁R-Blockade.

Die Abbildung zeigt die DNA-Schädigung in SH-SY5Y Zellen nach vierstündiger Behandlung mit 200 nM AT-II (AT-II), 5 μ M des AT₁Rezeptor Antagonisten Candesartan (Cande) sowie einer gleichzeitigen Behandlung mit 200 nM AT-II und 5 μ M Candesartan (AT-II + Cande). Dargestellt ist der prozentuale Anteil von DNA im „Kometenschweif“ gemessen mit dem Comet Assay. * $p < 0,005$ gegenüber der Negativkontrolle; † $p < 0,05$ der Candesartan-Behandlung gegenüber der Negativkontrolle; ‡ $p < 0,005$ der AT-II-behandelten Zellen gegenüber Candesartan alleine beziehungsweise gegenüber der gleichzeitigen Behandlung mit Candesartan / AT-II.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den AT-II-behandelten Zellen ($9,9 \pm 1,0$ %) und der Negativkontrolle ($5,0 \pm 0,4$ %; $p < 0,005$). Die Candesartan-behandelten Zellen zeigten signifikant weniger DNA im Schweif ($3,7 \pm 0,3$ %) als die Negativkontrolle ($p < 0,05$). Gleichzeitig mit Candesartan und AT-II behandelte Zellen zeigten signifikant weniger DNA im Schweif als nur mit AT-II behandelten Zellen ($5,1 \pm 0,4$ %; $p < 0,005$). Da durch eine AT₁R-Blockade die Genotoxizität von AT-II gestoppt werden kann, ist wahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte durch eine Bindung von AT-II an den AT₁R getriggert werden.

3.6 AT-II-induzierte Glutathion-Depletion

In diesem Experiment wurde getestet, ob eine AT-II-Behandlung zu Veränderungen im Glutathionsystem führt. Beim Vorliegen erhöhter intrazellulärer Konzentrationen an ROS müssten die antioxidativen Systeme entsprechend reagieren. Die Hypothese ist, dass die AT-II-Behandlung die antioxidative Kapazität der Zelle fordert und es zu einer Verschiebung im wichtigsten dieser Systeme zugunsten von „verbrauchtem“ Glutathion (Glutathion-Disulfid; GSSG) kommt. Es wurden HT-22-Zellen mit 200 nM AT-II behandelt und die Reaktion des Glutathionsystems über die Zeit untersucht (30 Minuten, 1 / 2 / 4 / 8 Stunden). Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil von oxidiertem Glutathion (GSSG) am Gesamt-Glutathion angegeben.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Zeit (in Minuten) nach AT-II-Behandlung und dem GSSG-Anteil ($r = 0,58$, $p < 0,005$; **Abbildung 13**). AT-II-behandelten Zellen wiesen gegenüber der Negativkontrolle ($2,6 \pm 1,2$ %) signifikant höhere GSSG-Spiegel auf (alle $p < 0,05$). Maximaler Stress im Glutathion-System konnte acht Stunden nach AT-II-Behandlung beobachtet werden ($11,5 \pm 3,9$ %; $p < 0,002$). Nach 30 Minuten konnte eine etwa dreifache Erhöhung des GSSG-Anteils nachgewiesen werden ($7,5 \pm 1,0$ %; $p < 0,001$). Nach zwei Stunden ($4,5 \pm 0,7$ %) zeigte sich ein

signifikanter Abfall des oxidierten Gluthathions gegenüber der einstündigen-Behandlung ($9,3 \pm 2,6 \%$; $p < 0,005$).

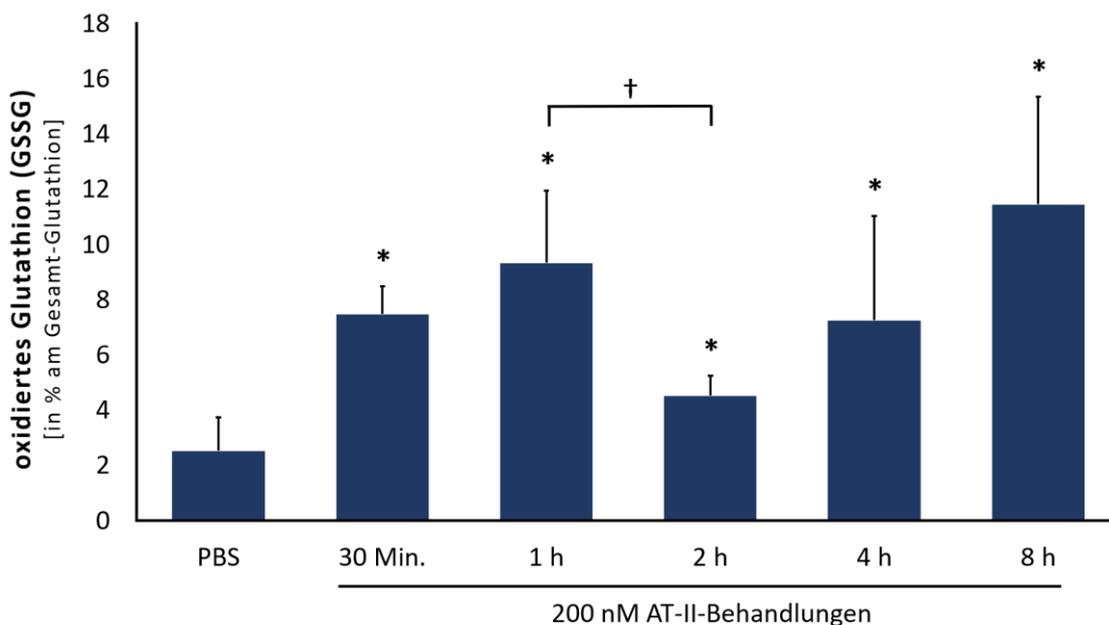


Abbildung 13: Reaktion von reduziertem / oxidiertem Glutathion auf AT-II-Behandlung.

Die Abbildung zeigt die Veränderungen im Glutathion System nach AT-II Behandlung von HT-22 Zellen über die Zeit (30 Minuten bis 8 Stunden). Dargestellt ist der prozentuale Anteil an „verbrauchtem“ Glutathion oder GSSG am Gesamt-Glutathion, gemessen mit dem Glutathion Assay. * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle; † $p < 0,005$ der 60-minütigen gegenüber der 120-minütigen AT-II Behandlung.

Die in **Abbildung 13** dargestellten Beobachtungen zeigen, dass der über AT-II-induzierte oxidative Stress signifikante Auswirkungen auf das wichtigste intrazelluläre, antioxidative System hat.

3.7 Glutathion-Status nach AT₁R-Inhibition/-Antagonisierung

In diesem Versuch sollte die Hypothese untersucht werden, dass eine AT₁R- / NOX-Inhibition beziehungsweise Gabe eines Radikalfängers gleichzeitig zur AT-II-Behandlung imstande sind, die vorher beschriebenen Verschiebungen im Gluthathionsystem aufzuheben. Hierfür wurde eine einstündige Behandlung mit AT-II (200 nM) alleine, beziehungsweise gleichzeitig mit dem AT₁R-Blocker Candesartan (5 μ M), dem Radikalfänger TEMPOL (50 μ M) sowie dem NOX-Inhibitor VAS2870 (1 μ M) durchgeführt und die Auswirkung auf das Gluthathion-

System studiert. Die Ergebnisse sind erneut als prozentualer Anteil von GSSG am Gesamt-Glutathion angegeben.

Die Behandlung mit AT-II führte zu einem nicht signifikanten Anstieg des GSSG-Anteils gegenüber der Negativkontrolle ($2,9 \pm 0,3$ % beziehungsweise $7,7 \pm 2,6$ %; $p = 0,06$). Dieser Effekt war durch gleichzeitige Gabe von Candesartan ($2,8 \pm 0,8$ %; $p = 0,07$), TEMPOL ($2,6 \pm 0,6$ %; $p = 0,06$) beziehungsweise VAS2817 ($3,8 \pm 0,9$ %; $p = 0,11$) tendenziell reversibel, wobei alle Ergebnisse knapp ohne Signifikanz blieben (am ehesten aufgrund eines Ausreißers bei einer Messung in der zweiten Versuchsreihe in der AT-II-Behandlungsgruppe).

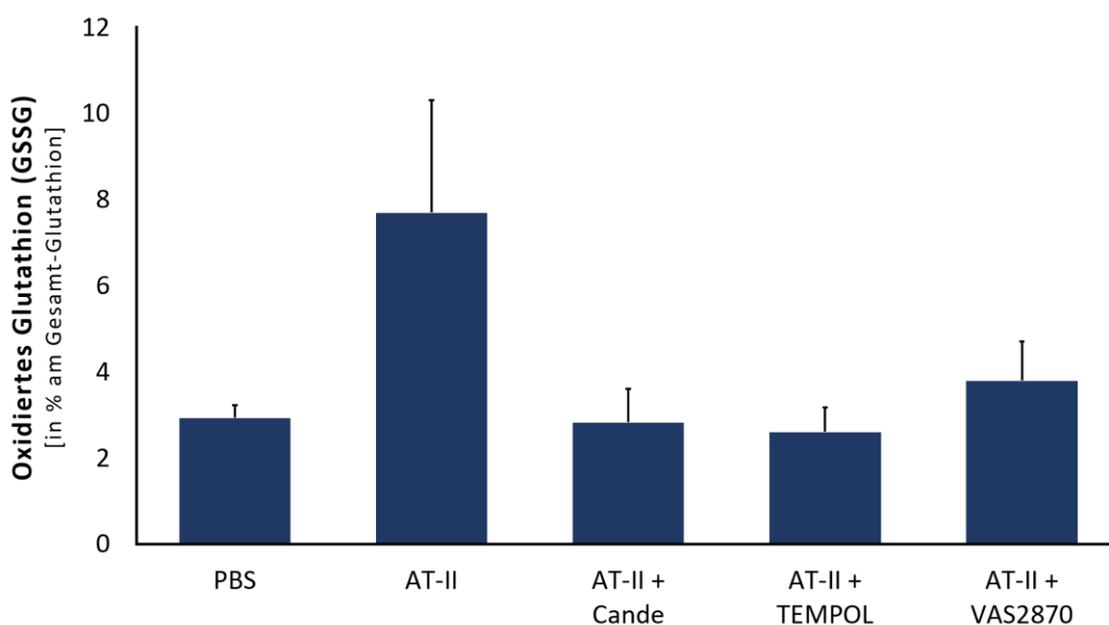


Abbildung 14: AT-II-Wirkung mit / ohne AT₁R- / NOX-Inhibitoren / Radikalfänger auf Glutathion.

Die Abbildung zeigt die Veränderungen im Glutathion System nach einstündiger Behandlung von HT-22 Zellen mit 200 nM Angiotensin II (AT-II), gleichzeitiger Behandlung mit 5 μ M des Angiotensin Rezeptor Typ1 (AT₁R)-Blockers Candesartan (AT-II + Cande), gleichzeitiger Behandlung mit 50 μ M des Radikalfängers TEMPOL (AT-II + TEMPOL) sowie gleichzeitiger Behandlung mit 1 μ M des NADPH-Oxidase (NOX)-Inhibitors VAS2870 (AT-II + VAS2870). Dargestellt ist der prozentuale Anteil an „verbrauchtem“ Glutathion oder GSSG am Gesamt-Glutathion, gemessen mit dem Glutathion Assay.

Obwohl keine Signifikanz erreicht wurde, deuten die in **Abbildung 14** dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass der oxidative Stress nach AT-II-Behandlung, indirekt gemessen über Verschiebungen im Glutathionsystem, reversibel ist mithilfe einer AT₁R- und NOX-Inhibition, beziehungsweise über eine gleichzeitige Gabe des Radikalfängers TEMPOL.

3.8 Genexpressionsanalyse nach AT-II-Behandlung

HT-22 Zellen wurden jeweils für fünfzehn Minuten, dreißig Minuten, eine Stunde, zwei Stunden beziehungsweise vier Stunden mit einer AT-II Konzentration von 200 nM behandelt. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung mit PBS.

Ziel des Experiments war es, mittels der RT-PCR herauszufinden, ob eine Behandlung der Zellen mit AT-II während des beschriebenen Behandlungszeitraumes zu einer Veränderung der Genexpression der Hämoxygenase-1 (HO-1), der Oxoguaninglykosylase 1 (Ogg1), der Glutathionperoxidase 1 (GPx1) sowie der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) führt. Ogg1 und PARP-1 sind DNA-Reparaturenzyme, während HO-1 und GPx1 für die Reduktion von oxidativem Stress beziehungsweise im Glutathion System wichtig sind. RNA wurde wie unter **2.4.9** beschrieben extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert. Per Gelelektrophorese wurden die amplifizierten Produkte sichtbar gemacht. Jeweils mit untersucht wurde das Haushaltsgen β -Actin (**Abbildung 15**).

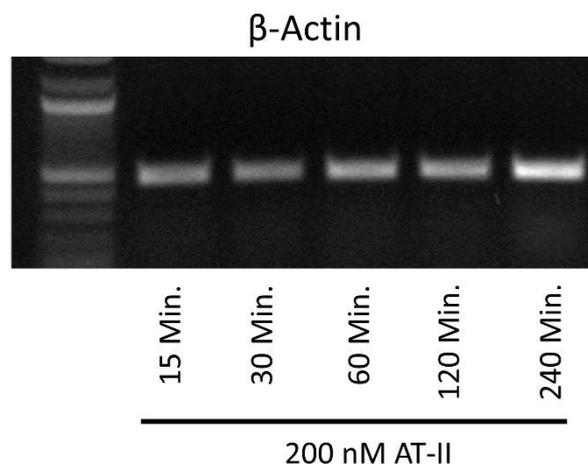


Abbildung 15: Genexpression des Haushaltsgens β -Actin nach AT-II-Behandlung.

Bei der Überprüfung der Genexpression der Oxoguaninglykosylase 1 (Ogg1) und der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) zeigte sich zwischen fünfzehn Minuten und vier Stunden Behandlungsdauer keine Veränderung der zwei oben genannten DNA-Reparaturenzyme (**Abbildung 16**).

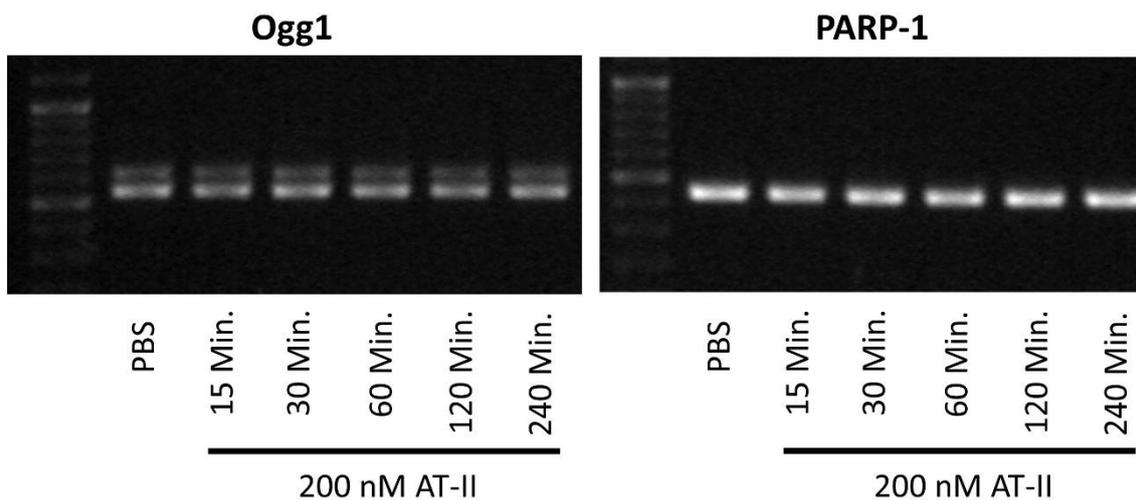


Abbildung 16: Genexpression von Oxoguaninglykosylase 1 (Ogg1), Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) nach Angiotensin II (AT-II)-Behandlung.

Die Genexpressionsanalyse der Hämoxygenase-1 (HO-1) und der Glutathionperoxidase 1 (GPx1) zeigte zwischen fünfzehn Minuten und vier Stunden ebenfalls keine Veränderungen der beiden Enzyme (**Abbildung 17**).

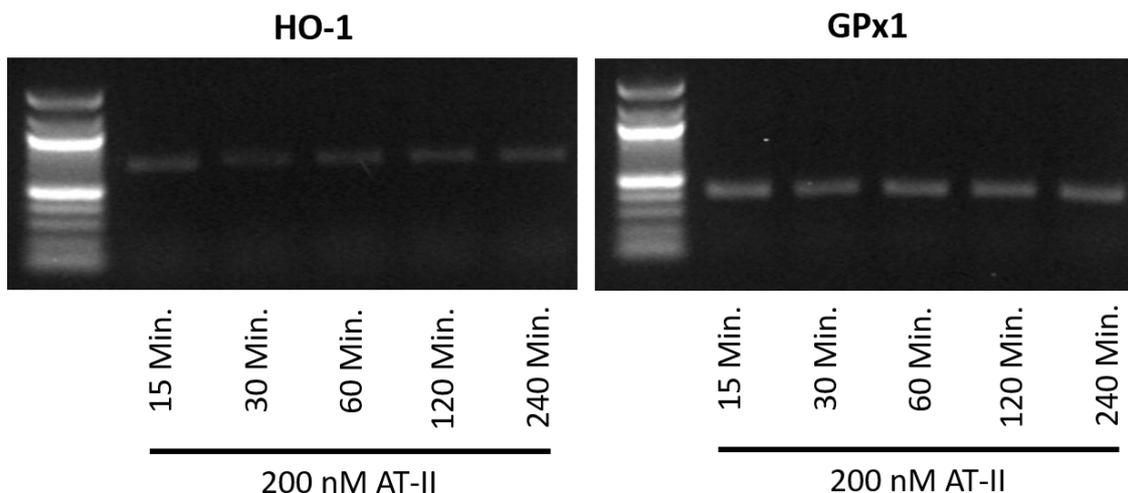


Abbildung 17: Genexpression von Hämoxygenase-1 (HO-1), Glutathionperoxidase 1 (GPx1) nach Angiotensin II (AT-II)-Behandlung.

3.9 Auswirkung von AT-II auf das murine Subfornikalorgan

Aufbauend auf die beobachteten Effekte von AT-II auf neuronale Zellen *in vitro* wollten wir im nächsten Schritt testen, ob die beschriebenen Effekte auch *in vivo* replizierbar sind. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Tierversuches (siehe **2.3.1 Versuchsaufbau**) präsentiert. Exemplarische Schnitte durch das SFO im Mäusegehirn sind in **Abbildung 18** zu sehen.

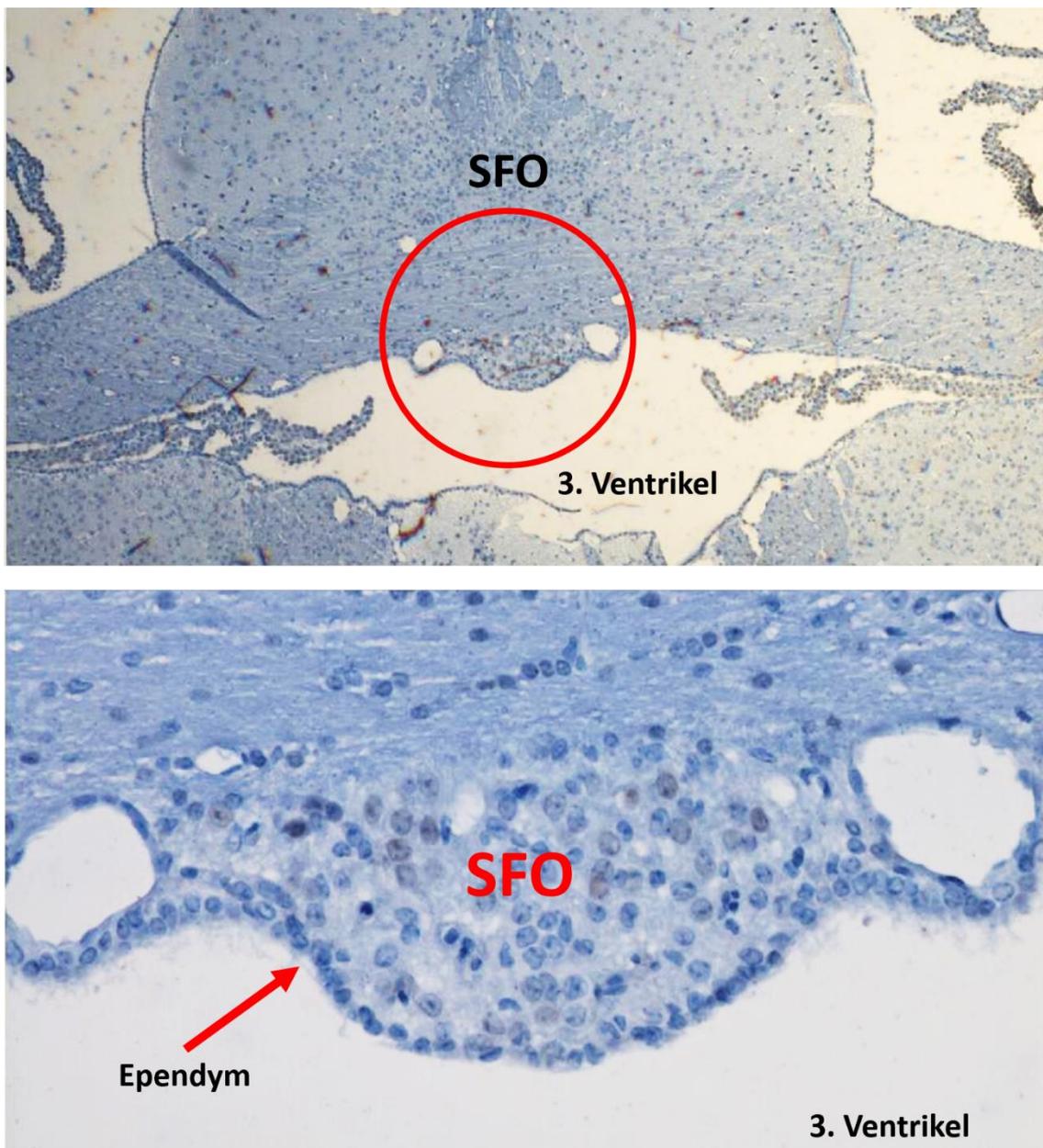


Abbildung 18: Coronarer Schnitt durch das Mäusehirn (oben); Nahaufnahme Subfornikalorgan (SFO, unten).

In **Tabelle 13** sind die verschiedenen Behandlungsgruppen sowie die Anzahl an ausgewerteten SFO-Schnitten aufgeführt.

Gruppe	Behandlung	SFO-Schnitte
WT K	PBS	$n = 4$
WT AT-II	AT-II	$n = 2$
WT AT-II + Cand	AT-II + Candesartan	$n = 3$
AT _{1a} R-KO K	PBS	$n = 1$
AT _{1a} R-KO AT-II	AT-II	$n = 4$

Tabelle 13: Auflistung Anzahl vergleichbarer SFO-Schnitte.

AT_{1a}R = Angiotensin Rezeptor Typ 1a, AT-II = Angiotensin II, K = Kontrolle, KO = Knock-Out, PBS = phosphate-buffered-saline, SFO = Subfornikalorgan, WT = Wildtyp.

Wie ersichtlich ist, wurde ein großer Anteil der Schnitte von der Analyse ausgenommen. Grund hierfür war die bewusst getroffene Entscheidung, alle Schnitte mit nur partiell erfasstem SFO (aufgrund der Größe des murinen SFO waren teils nur zwei Schnitte vorhanden, auf denen das SFO miterfasst war) von der Auswertung auszuschließen. Diese Vorgehensweise führt einerseits zu einer besseren Datenqualität und höherer Integrität der Ergebnisse, zieht andererseits jedoch einen wahrscheinlichen Verlust der statistischen Signifikanz mit sich. Die Ergebnisse sind in Prozent von γ -H2AX positiven Zellkernen angegeben.

Bei der Auswertung der Schnitte zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der WT-Kontrollgruppe ($6,6 \pm 3,2$ %), der WT AT-II-Gruppe ($7,6 \pm 1,8$ %) sowie der WT AT-II + Candesartan Gruppe ($3,4 \pm 3,7$ %). Ebenso blieb der Vergleich zwischen AT₁R-KO-Kontrollgruppe und den anderen Gruppen ohne Nachweis von Signifikanz ($3,7$ %; nur 1 Präparat!). Die AT₁R-KO AT-II-Behandlungsgruppe ($21,3 \pm 1,8$ %) zeigte trotz der geringen Anzahl an auswertbaren SFO-Schnitten signifikant höhere Raten an γ -H2AX-positiven Kernen gegenüber der WT-Kontrollgruppe ($p < 0,005$) sowie der WT-AT-II/Candesartan-Behandlungsgruppe ($p = 0,01$). Erstaunlicherweise zeigte sich im direkten Vergleich der mit AT-II-behandelten Wildtyp-, beziehungsweise Knock-Out-Mäuse ein signifikanter Unterschied mit deutlich

mehr DNA-Schäden in der AT₁R-KO AT-II-Gruppe ($p < 0,01$). Die Färbungen sowie die Ergebnisse sind in **Abbildung 19** und in **Abbildung 20** zu sehen.

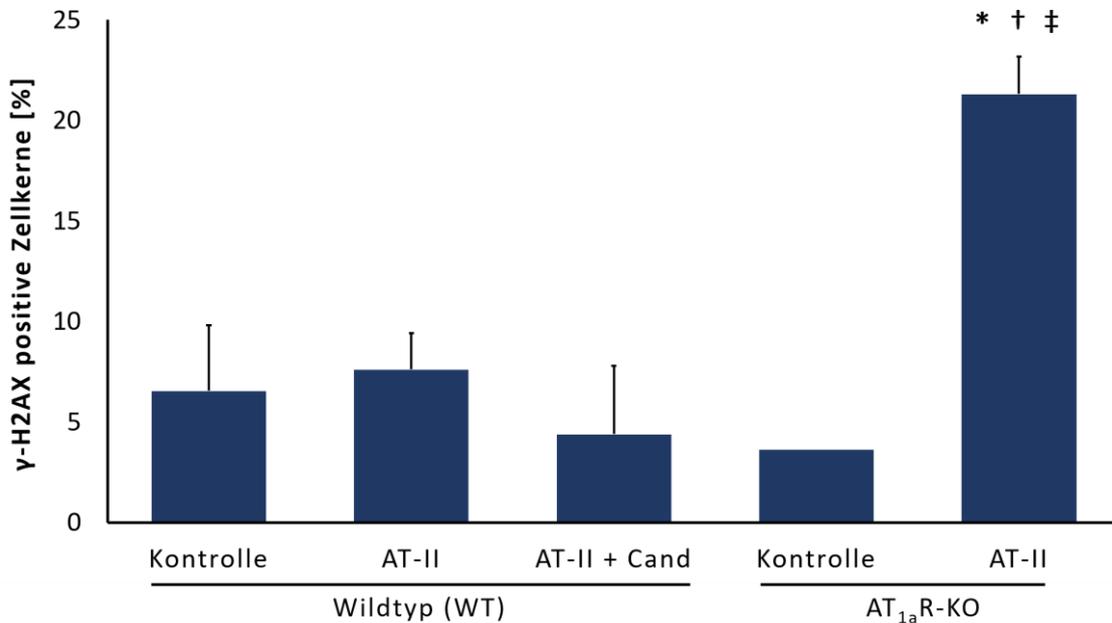


Abbildung 19: γ -H2AX Positivität muriner SFO-Zellen (Wildtyp / AT_{1a}R-KO) nach AT-II-Behandlung.

Die Abbildung zeigt Ergebnisse der γ -H2AX Färbung der SFO Schnitte aus dem Tierversuch. Die Wildtyp (WT)-Mäuse waren in drei Gruppen eingeteilt: Eine Kontrollgruppe (WT Kontrolle), eine Angiotensin II (AT-II)-Behandlungsgruppe (WT AT-II) sowie eine Gruppe mit gleichzeitiger AT-II und Candesartan (Cand) Behandlung (WT AT-II + Cand). Die Angiotensin Rezeptor Typ 1a (AT_{1a}R)-Knock-Out Mäuse waren in eine Kontrollgruppe (AT_{1a}R-KO Kontrolle) und eine AT-II-Behandlungsgruppe eingeteilt (AT_{1a}R-KO AT-II). Dargestellt ist der prozentuale Anteil von γ -H2AX positiven Zellkernen im Subfornikalorgan (SFO) der jeweiligen Gruppen. * $p < 0,005$ gegenüber WT Kontrolle; † $p < 0,001$ gegenüber WT AT-II; ‡ $p = 0,01$ gegenüber WT AT-II + Cand.

Die Versuche zeigen, dass AT-II AT_{1a}-Rezeptor-unabhängig Genomschäden in zentral gelegenen Neuronen hervorrufen kann.

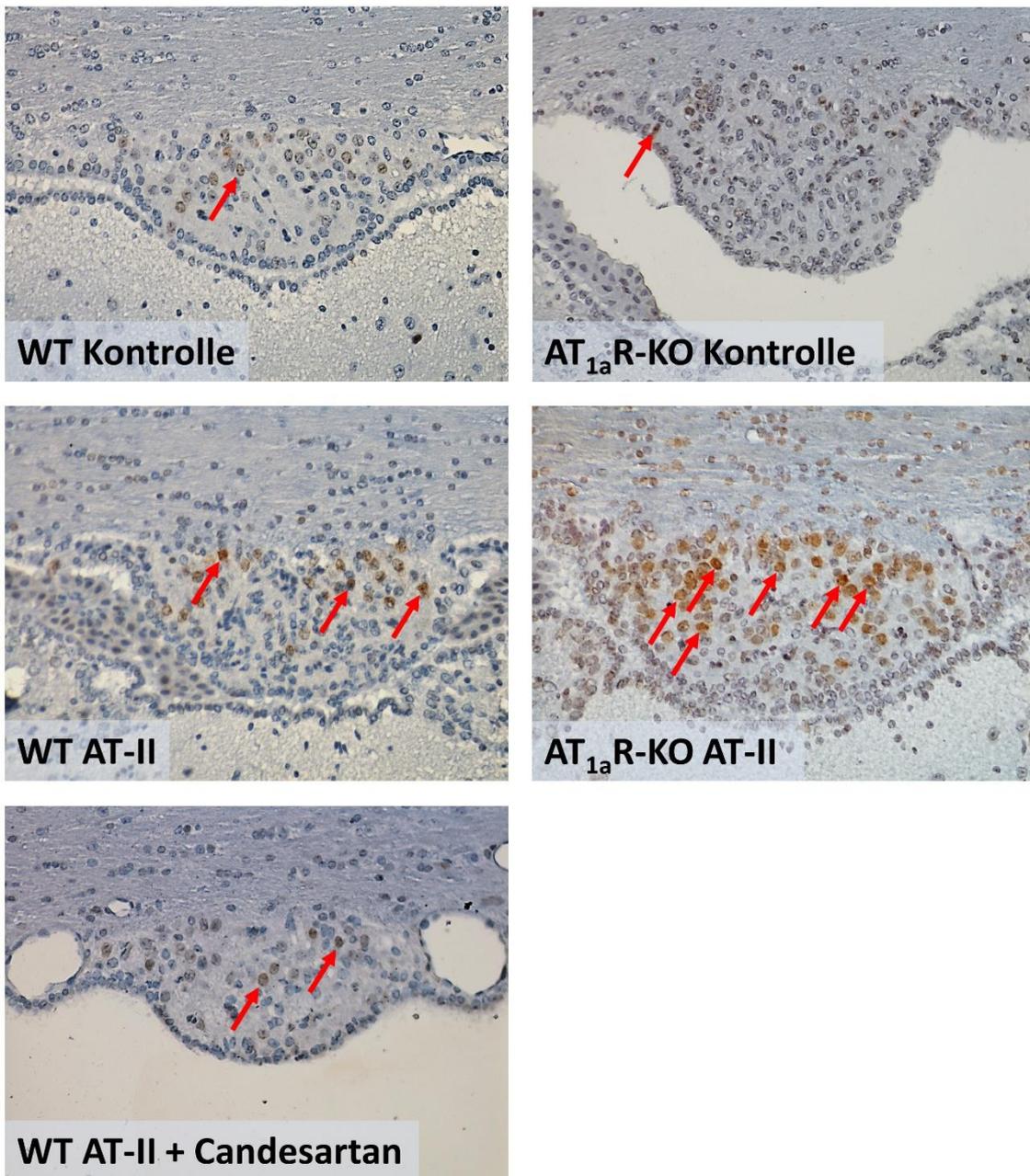


Abbildung 20: γ -H2AX Färbungen SFO-Schnitte.

Abgebildet sind exemplarische Schnitte durch das SFO von je einem Tier aus jeder Versuchsgruppe. Auf mehreren Bildern ist ein kollabierter dritter Ventrikel zu sehen, teils mit unscharf dargestellten Zellen des Plexus choroideus zwischen Ependymzellen des SFO (oben) und Ependymzellen am Boden des dritten Ventrikels (unten). Die roten Pfeile markieren exemplarisch γ -H2AX positive Zellkerne. Abkürzungen: AT_{1a}R = Angiotensin Rezeptor Typ 1a, AT-II = Angiotensin II, KO = Knock-Out, PBS = phosphate-buffered-saline, SFO = Subfornikalorgan, WT = Wildtyp.

4 Diskussion

4.1 Oxidativer Stress, Hypertonus und Demenz

Oxidativer Stress ist assoziiert mit einer Vielzahl oftmals chronischer Erkrankungen und mit malignen Neoplasien. Auch in vielen neurologischen Erkrankungen wie der Alzheimer Krankheit (AD) und dem Morbus Parkinson (PD) spielt oxidativer Stress eine entscheidende Rolle [76, 85].

Bei etwa zwanzig Prozent der Demenzkranken kann der kognitive Abbau auf eine vaskuläre Demenz (VaD) zurückgeführt werden [80], weitere zehn bis dreißig Prozent weisen eine Mischform aus AD und VaD auf [81, 82]. Es ist bekannt, dass Hypertoniker gegenüber der Normalbevölkerung ein zweifach erhöhtes Risiko haben, an VaD zu erkranken [149]. Eine medikamentöse Einstellung des Blutdrucks senkt daher das Risiko einer dementiellen Erkrankung [180].

Der Zusammenhang von arteriellem Hypertonus und oxidativem Stress ist lange etabliert. Im Zentrum des Pathomechanismus steht ein dysfunktionales RAAS mit erhöhten Konzentrationen an AT-II und Aldosteron. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte bereits eine AT-II-induzierte Genomschädigung in Nieren- und Herzzellen nachgewiesen werden [63, 64, 160, 181-183]. Darüber hinaus kann ein Beziehung zwischen dysfunktionalem RAAS, endothelialer Dysfunktion und VaD beobachtet werden [150].

Aufgrund der oben geschilderten Korrelationen zwischen Bluthochdruck, oxidativem Stress, dysfunktionalem RAAS und vaskulärer Demenz wurde die Hypothese formuliert, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten AT-II Konzentrationen im ZNS und der Demenz-Entwicklung bestehen könnte. Ziel dieser Dissertation war es, die Genotoxizität und damit Zytotoxizität von AT-II in Nervenzellen zu untersuchen, insbesondere in Hinblick auf eine potentielle Beteiligung bei der Entwicklung einer Demenz.

4.2 Dosisabhängige, NOX-vermittelte Genotoxizität von AT-II über Bindung an den AT₁-Rezeptor

Zielsetzung der ersten Experimente dieser Dissertation war es, eine neuronale Zelllinie für die Versuche zur Toxizität von AT-II zu finden. Hierfür wurden zum einen die humane SH-SY5Y- sowie die immortalisierte, murine HT-22-Zelllinie ausgewählt. Die SH-SY5Y Zellen haben den Vorteil, dass sie humanen Ursprungs sind, sich relativ einfach handhaben lassen und es eine lange Tradition dieser Zellen als erfolgreiches Modell bei der Forschung an Neurodegeneration, insbesondere beim PD, gibt [184]. HT-22 Zellen werden seit Jahrzehnten als verlässliches Modell zur Forschung von Toxizität in Nervenzellen verwendet, größtenteils bei Studien zur Glutamat-induzierten Neurotoxizität [185, 186]. Aber der Nachweis von bisher unbekanntem Eigenschaften der HT-22 Zellen, beispielsweise dass diese auch cholinerge Funktionen besitzen, hat die Zelllinie in den letzten Jahren unter anderem auch für die Alzheimer-Forschung interessant gemacht [187].

Bei der Behandlung der SH-SY5Y und HT-22 Zellen mit AT-II konnte ein statistisch signifikanter, linearer Zusammenhang zwischen AT-II Konzentration und beobachteter DNA-Schädigung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden in der Literatur der letzten Jahre wiedergespiegelt, unter anderem in Studien, die in einer dopaminergen Zelllinie zur PD-Forschung erhöhte, AT-II-induzierte Apoptoseraten zeigen [188-190].

Basierend auf Vorarbeiten unserer Gruppe zur Toxizität von AT-II in Nierenzellen via NOX-induzierter Superoxidgeneration [160] wurde, zur weiteren Untersuchung des molekularen Mechanismus der beobachteten DNA-Schädigung, zunächst die intrazelluläre Superoxidkonzentration nach AT-II-Behandlung bestimmt. Es zeigte sich eine Konzentrations-abhängige Erhöhung der intrazellulären Superoxidkonzentration. Auch wenn der Ursprung des Superoxids letztlich nicht bewiesen werden kann, ist davon auszugehen dass der überwiegende Anteil durch die NOX produziert wurde [37].

Eine AT-II-induzierte NOX-Stimulation mit hierdurch verursachter, Superoxid-abhängiger Genotoxizität müsste über eine NOX-Inhibition daher reversibel sein beziehungsweise zumindest abgeschwächt werden können. In den weiterführenden Experimenten zeigte sich unter einer gleichzeitigen Behandlung der Zellen mit AT-II und dem NOX-Inhibitor VAS2870 eine vollständige Reversibilität der vorher beobachteten DNA-Schäden, was den Verdacht auf eine NOX-vermittelte Superoxidgeneration erhärtet. Auch dies korreliert gut mit den Ergebnissen der neueren Literatur, die eine NOX-Beteiligung an der Produktion von ROS in neurodegenerativen Modellen aufzeigt [191-194].

Da die NOX-Aktivität unter anderem über Bindung von AT-II an den AT₁R reguliert wird [37], wurde in einem weiteren Versuch die Behandlung mit AT-II unter gleichzeitiger Gabe des AT₁R-Blockers Candesartan wiederholt. Es zeigte sich hierbei, dass die DNA-Schädigung durch AT-II mit einer gleichzeitigen AT₁R-Antagonisierung vollständig aufgehoben werden kann. Dieser protektive Effekt nach AT₁R-Blockade könnte möglicherweise helfen, die Ergebnisse mehrerer Nagerstudien zu erklären, die beispielsweise eine Normalisierung der Kognition durch Candesartan in einem Ratten-Stressmodell [195] oder eine positive Auswirkung einer AT₁R-Blockade in Ratten mit Amphetamin-induzierten Verhaltensauffälligkeiten [196] beobachten konnten.

4.3 Zytotoxizität von AT-II

ROS interagieren nicht nur mit DNA, sondern potentiell auch mit anderen Makromolekülen wie Proteinen oder Fetten [14-16, 18, 19]. Für die Untersuchung der Peroxidation von Fetten nach AT-II Behandlung sollte Malondialdehyd (MDA), ein Biomarker der Peroxidation von Fetten [23], gemessen werden. Da MDA eigene mutagene, in einigen Spezien sogar karzinogene Eigenschaften besitzt [23], wäre hier eine indirekte Genotoxizität von AT-II über eine Akumulation von MDA denkbar.

Die Experimente führten jedoch trotz mehrfacher Versuche zu keinen replizierbaren Ergebnissen. Bei dem verwendeten TBARS Assay müssen eine Vielzahl an verschiedenen Parametern aufeinander abgestimmt werden, was eine Standardisierung der Methode erschwert. Obgleich die Methode noch heute in vielen Laboren zur Anwendung kommt, häuft sich die Literatur, welche den TBARS Assay zur MDA-Messung als unzuverlässig, ungenau und für biologische Materialien unbrauchbar darstellt [156, 197].

Wenngleich eine breiter gefächerte Toxizitätsstudie von AT-II kein Thema dieser Dissertation war, wäre es dennoch interessant zu untersuchen, wie sich pathologisch erhöhte AT-II Konzentrationen auf andere Makromoleküle wie Zucker, Proteine oder Fette auswirkt.

4.4 AT-II-induzierte Glutathion-Veränderungen

Glutathion ist eines der wichtigsten intrazellulären Antioxidantien [48] und der Anteil von oxidiertem Glutathion am Gesamt-Glutathion ist ein guter Indikator für das intrazelluläre Level an oxidativem Stress [198, 199]. Dieser lässt sich indirekt abschätzen an der erhöhten Konzentration von GSSG (oxidiertem, „verbrauchtem“ Glutathion) im Gegensatz zu GSH (reduziertem, „unverbrauchtem“ Glutathion) [48].

Um das Ausmaß an intrazellulärem oxidativen Stress zu untersuchen wurde im nächsten Experiment die Auswirkung von AT-II auf das Glutathion-System untersucht. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen erhöhtem Glutathion-„Verbrauch“ und fortschreitender Zeit (dreißig Minuten bis acht Stunden) nach AT-II-Behandlung der Zellen. Entgegen diesem Trend war ein signifikanter Abfall der GSSG Konzentration nach zwei Stunden im Vergleich zu einer Stunde zu verzeichnen. Möglicherweise kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalwege durch AT-II, deren Effekte sich nicht-linear beziehungsweise in unterschiedlichen Zeitfenstern manifestieren und daher schwer nachzuvollziehen sind. So könnte es nach zwei Stunden zu einer Art

Regeneration des Glutathions durch einen bisher unbekanntem Mechanismus kommen. Eine Hochregulation der Glutathionperoxidase (GPx) beziehungsweise der Glutathion-Disulfid Reduktase (GSR) wäre denkbar, konnte aber zu späterem Zeitpunkt teilweise mittels RT-PCR ausgeschlossen werden (allerdings nur für die Isoform GPx1!).

Ob der durch AT-II ausgelöste Stress auf das Glutathion-System abgepuffert werden kann wurde in einem weiteren Experiment untersucht, bei dem neben der AT-II-Behandlung eine zusätzliche NOX-Inhibition (VAS2870), AT₁R-Antagonisierung (Candesartan) beziehungsweise eine Zugabe des Radikalfängers TEMPOL durchgeführt wurde. Während die AT-II Behandlung erwartungsgemäß zu einer Zunahme des oxidierten Glutathions führte, konnte dieser Anstieg durch NOX-Inhibition, AT₁R-Antagonisierung oder gleichzeitiger Gabe eines Radikalfängers unterdrückt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Art Überlastung des Glutathion-Systems hin, welche eine reaktive Induktion von Genen, die für die Enzyme des Glutathion-Systems codieren zur Folge haben könnte.

Insbesondere in Hinblick auf die unklaren Ergebnisse der Glutathion-Messungen zwei Stunden nach AT-II-Behandlung wurde im nächsten Schritt eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Im Einzelnen wurde auf eine Veränderung der Genexpression von wichtigen DNA-Reparaturenzymen beziehungsweise Antioxidantien als Reaktion auf eine AT-II-Behandlung getestet. Hierbei konnte in dem Zeitraum von fünfzehn Minuten bis vier Stunden nach AT-II-Behandlung keine gesteigerte Expression der DNA-Reparaturenzyme Ogg1 und PARP-1, des bei oxidativem Stress konsekutiv überexprimierten HO-1 sowie des antioxidativ wirksamen GPx1 nachgewiesen werden. Möglicherweise kommt es durch AT-II zu einer gesteigerten Expression anderer, nicht untersuchter, Gene. In den *in vivo* Experimenten sowie einer vorherigen Studie zeigte sich interessanterweise eine signifikant erhöhte HO-1 Expression in den Nieren von AT-II-behandelten Wildtyp Mäusen [162, 181]. Weitere Marker oxidativen Stesses (Superoxiddismutase, Thioredoxinreduktase und Glutathionreduktase) zeigten jedoch keine AT-II-induzierte Überexpression [162]. Denkbar wäre eine

Hochregulation anderer, nicht untersuchter Isoformen von GPx oder der GSR. Insbesondere eine Untersuchung der als Schaltzentrale im Redox-System agierenden Nrf2 (Nuclear Factor-E2-related factor 2) und Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) beziehungsweise dem pro-inflammatorischen NF- κ B wäre höchst interessant. In Stresssituationen induziert der Transkriptionsfaktor Nrf2 als Antioxidantien agierende Enzyme. Keap1 balanciert die Nrf2-induzierten Veränderungen durch eine Nrf2-Degradation sobald die Stressbedingungen sistieren [200]. Der pro-inflammatorisch wirkende Transkriptionsfaktor NF- κ B auf der anderen Seite wird bei Oxidation durch H₂O₂ über seine inhibitorische Untereinheit I κ B deaktiviert um eine überschießende ROS-Produktion (im Rahmen der Inflammation) zu verhindern [201, 202]. Hier sollten in Zukunft weiterführende Untersuchungen gemacht werden.

4.5 AT_{1a}R-unabhängige Genotoxizität von AT-II

Im letzten Experiment wurde eine vierwöchige *in vivo* Behandlung mit AT-II durchgeführt und die Gehirne von Wildtypmäusen sowie Mäusen mit einem Knock-Out des AT_{1a}R hinsichtlich Genotoxizität untersucht. Die Bluthirnschranke unterbindet einen Übertritt von systemisch zirkulierendem AT-II ins Gehirn, daher wurde das für AT-II zugängige Subfornikalorgan (SFO) als Zielorgan ausgewählt. Denn die Neurone im SFO haben nicht nur ein fenestriertes Endothel und damit eine unterbrochene Bluthirnschranke, sondern besitzen eine besonders hohe Dichte an AT₁-Rezeptoren, was möglicherweise zu einem potenzierten AT-II Effekt im Vergleich zu anderen Geweben führt.

In der γ -H2AX Färbung zeigte sich ein signifikanter Unterschied an positiv gefärbten Zellkernen in den AT-II behandelten AT_{1a}R-KO Mäusen gegenüber der WT Kontrollgruppe, der WT AT-II/Candesartan Behandlungsgruppe und insbesondere gegenüber der WT AT-II Behandlungsgruppe. Warum das SFO der AT_{1a}-Rezeptor defizienten Mäuse einen größeren Schaden durch AT-II erleidet als das der Wildtyp-Mäuse, ist auf den ersten Blick ein Rätsel. Möglicherweise könnte der in Menschen nicht vorhandene, murine

AT_{1b}-Rezeptor eine Rolle spielen. Die AT_{1a}- beziehungsweise AT_{1b}-Rezeptoren ähneln sich zwar in ihren Ligandenbindungs- und Signaltransduktionseigenschaften, unterscheiden sich jedoch bezüglich der Lokalisation ihrer Expression [95]. Während der murine AT_{1a}-Rezeptor weitgehend ubiquitär exprimiert wird, beschränkt sich die Expression des AT_{1b}-Rezeptors überwiegend auf die murinen Nebennieren, das Gehirn und die Hoden [203]. In den AT_{1a}R-KO Mäusen konnte eine Hochregulation des AT_{1b}-Rezeptors in den Nieren nachgewiesen werden [162], eine Beobachtung die bereits zuvor in Mäusen gemacht wurde [204]. Um die Möglichkeit einer AT-II-induzierten Toxizität über den AT_{1b}R weiter zu untersuchen wäre, falls nicht lethal, eine AT₁R-Inhibition in den AT-II-behandelten AT_{1a}R-KO Mäusen interessant, denn eine AT₁R-Blockade scheint zu einer verminderten AT_{1b}-Expression zu führen [205].

Interessanterweise wurden die beobachteten DNA-Schäden in den AT-II-behandelten AT_{1a}R-KO Mäusen auch in anderen Organen der gleichen Versuchstiere festgestellt [163]. In den Nieren und im Herzen konnte eine teils signifikant höhere Anzahl an γ -H2AX positiven Zellkernen in den AT-II-behandelten AT_{1a}R-KO Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen beziehungsweise im Vergleich zu den mit AT-II behandelten Wildtyp-Mäusen festgestellt werden [162]. Alle dieser AT-II-induzierten Veränderungen in den AT_{1a}R-KO Mäusen gingen ohne einen erhöhten Blutdruck einher, eine bereits vorbeschriebene [206], vormals jedoch nie bewiesene Beobachtung.

Die Experimente beweisen, dass AT-II unabhängig vom Blutdruck und unabhängig vom AT_{1a}R Genomschäden in Mäusen verursachen kann.

4.6 Schädigungsmechanismen von AT-II im Gehirn

ROS-induzierte Zellschädigungen im ZNS sind komplex und nicht vollständig verstanden. Die Korrelation zwischen erhöhtem oxidativem Stress und dem Auftreten einer Reihe neurologischer, oft dementieller Erkrankungen ist jedoch etabliert. AT-II ist sicherlich nicht alleine verantwortlich für die Entwicklung

einer vaskulären Demenz. Als zentrale Komponente eines dysfunktionalen RAAS im Gehirn trägt es aber zur Entwicklung beziehungsweise zum Fortschreiten verschiedener neurologischer Erkrankungen bei.

Außerhalb des ZNS konnte die Genotoxizität von erhöhten AT-II Konzentrationen auf die Bindung an den AT₁R, der konsekutiven Aktivierung von NOX und der folgenden ROS-Produktion zurückgeführt werden [160]. Einiges deutet darauf hin, dass ein ähnlicher Schädigungsmechanismus auch innerhalb des Gehirns ablaufen könnte, die Ergebnisse dieser Arbeit sowie einer rezenter Studie zur AT-II-induzierten Seneszenz mit einem Astrozytenmodell [207] bestärken diese Hypothese.

Hierfür scheint neben einer potentiellen direkten Schädigung durch AT-II vor allem eine chronische Inflammation im Gehirn verantwortlich zu sein. Diese wird von Mikroglia hervorgerufen, welche über Ausschüttung von ROS das Milieu, beziehungsweise das Ausmaß an lokaler Inflammation modulieren [133]. Eine Polarisierung der Mikroglia in einen pro-inflammatorischen M1-Phänotyp oder einen anti-inflammatorischen M2-Phänotyp scheint dieses fragile Milieu zu steuern [131]. Bei gesunden Menschen stehen M1- und M2-Phänotyp im Gleichgewicht. Über den mikroglialen AT₁R führt AT-II zu einer Induktion des pro-inflammatorischen M1-Phänotyps, was, wie beschrieben, zu einer Schädigung und im schlimmsten Fall zum Absterben der umliegenden Gehirnzellen führen kann [132].

Prinzipiell ist auch eine schädigende AT-II-Wirkung auf zentrale Neurone bei Vorliegen einer gestörten Bluthirnschranke denkbar. Die Permeabilität der für AT-II nicht durchgängigen Barriere wird durch eine Vielzahl von Medikamenten und natürlichen Substanzen moduliert [127], und ist nachweislich bei einer Reihe von Erkrankungen gestört [208]. So führt beispielsweise eine Inhibierung des P-Glykoproteins zu einer gänzlich veränderten Selektivität der Bluthirnschranke mit der Möglichkeit eines Übertretens potentiell toxischer Substanzen ins Gehirn [127]. In der Literatur finden sich jedoch auch Beispiele für positive Effekte von AT-II an der Bluthirnschranke. Über eine Modulation von endothelialen tight junctions durch von Astrozyten sezerniertes AT-II wird die Bluthirnschranke noch

selektiver und könnte sich positiv auf den Krankheitsverlauf bei Patienten mit multipler Sklerose auswirken [209]. Diese Funktionen von AT-II finden jedoch nur bei physiologischen AT-II Konzentrationen statt.

Obwohl die Wissenschaft in den letzten Jahren viele Erkenntnisse zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen gewinnen konnte, so bleiben eine ganze Reihe von Fragen weiterhin unbeantwortet. Es sind daher weitere Studien notwendig um zu untersuchen wie sich die neuronale Toxizität von AT-II im Menschen konkret verhält und auswirkt. Translationale Forschungsbemühungen mit Entwicklung von therapeutischen Ansätzen sind hierbei besonders wichtig.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten ist die Akzeptanz stetig größer geworden, dass oxidativer Stress eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von chronischen Erkrankungen, malignen Neoplasien sowie der Beschleunigung des Alterungsprozesses spielt. Als eine der häufigsten chronischen Erkrankungen ist Hypertonie oft mit einem fehlregulierten Renin-Angiotensin-Aldosteron-System assoziiert, welches chronisch oxidativen Stress verursacht. Bluthochdruck ist ein Risikofaktor für neurologische Erkrankungen wie der vaskulären Demenz (VaD) und viele neurologischen Störungen, einschließlich der VaD, haben eine ROS-assoziierte beziehungsweise inflammatorische Komponente in ihrer Entstehung.

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits eine AT-II-induzierte Genotoxizität in Nieren- und Myokardzellen bzw. -Gewebe nachweisen. Ziel dieser Dissertation war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen AT-II und Neurodegeneration zu untersuchen, welche durch eine neuronale Genotoxizität von AT-II ausgelöst wird.

Zunächst zeigten wir in zwei neuronalen Zelllinien, dass AT-II eine Dosis-abhängige Genomschädigung verursacht. Nachfolgende Experimente konnten diese Toxizität auf NOX-produziertes Superoxid zurückführen, das nach Bindung von AT-II an den AT₁R generiert wird. Zudem konnte ein AT-II-induzierter Verbrauch des wichtigsten intrazellulären Antioxidans – Glutathion – nachgewiesen werden.

In vivo konnten wir zeigen, dass AT_{1a}R-Knockout-Mäuse nach AT-II-Behandlung signifikant mehr Genomschäden im Subfornikalorgan (SFO) aufwiesen als Wildtypmäuse. Das SFO hat als eine der wenigen Strukturen im Gehirn eine unterbrochene Blut-Hirn-Schranke, was es für zirkulierendes AT-II zugänglich und besonders empfindlich macht. Diese Genomschäden wurden in der neueren Literatur auch in Nieren- und Herzgewebe beschrieben und belegen eine zusätzliche, AT_{1a}R- und damit Blutdruck-unabhängige Genotoxizität von AT-II.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass erhöhte AT-II-Konzentrationen in Nervenzellen Genomschäden durch NOX-produziertes Superoxid verursachen. Die Hoffnung ist, dass diese Ergebnisse dabei helfen, eines Tages die vollständige Entstehung der VaD zu entschlüsseln.

5.2 Summary

In recent decades, the acceptance has steadily increased that oxidative stress plays an important role in the development of chronic diseases, malignant neoplasia and the acceleration of the aging process. As one of the most common chronic diseases, hypertension is often associated with a misregulated renin-angiotensin-aldosterone system that causes chronic oxidative stress. Hypertension is a risk factor for neurological diseases such as vascular dementia (VaD) and many neurological disorders, including VaD, have an ROS-associated or inflammatory component in their etiology.

Our group has already demonstrated AT-II-induced genotoxicity in kidney and myocardial cells and tissues. The aim of this dissertation was to investigate a possible association between AT-II and neurodegeneration that is triggered by neuronal genotoxicity of AT-II.

First, we showed in two neuronal cell lines that AT-II causes dose-dependent genome damage. Subsequent experiments could attribute this toxicity to NOX-produced superoxide generated after AT-II binding to the AT₁R. In addition, AT-II-induced depletion of the most important intracellular antioxidant - glutathione - was demonstrated.

In vivo, we were able to show that AT_{1a}R knockout mice after AT-II treatment showed significantly more genome damage in the subfornic organ (SFO) than wild-type mice. The SFO is one of the few structures in the brain with an interrupted blood-brain barrier, which makes it accessible and particularly sensitive to circulating AT-II. In the recent literature, these genome damages were also observed in kidney and heart tissues and prove an additional genotoxicity of AT-II independent of AT_{1a}R and consequently independent of blood pressure.

In summary, this work shows that increased AT-II levels in neuronal cells cause genome damage due to NOX-produced superoxide. It is hoped that these results will one day help to decipher the complete development of VaD.

6 Literaturverzeichnis

1. Sies, H., *Oxidative stress: introductory remarks*. London: Academic, 1985. **1**: p. 1–8.
2. Klaunig, J.E. and Kamendulis, L.M., *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004. **44**: p. 239-67.
3. Finkel, T. and Holbrook, N.J., *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
4. Wells, P.G., McCallum, G.P., Chen, C.S., et al., *Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer*. *Toxicol Sci*, 2009. **108**(1): p. 4-18.
5. Sies, H., Berndt, C., and Jones, D.P., *Oxidative Stress*. *Annu Rev Biochem*, 2017. **86**: p. 715-748.
6. Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A.T., and Norberg, E., *The role of mitochondria in metabolism and cell death*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **482**(3): p. 426-431.
7. West, A.P., Shadel, G.S., and Ghosh, S., *Mitochondria in innate immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(6): p. 389-402.
8. Loschen, G., Flohe, L., and Chance, B., *Respiratory chain linked H(2)O(2) production in pigeon heart mitochondria*. *FEBS Lett*, 1971. **18**(2): p. 261-264.
9. Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B., *The cellular production of hydrogen peroxide*. *Biochem J*, 1972. **128**(3): p. 617-30.
10. Barber, D.A. and Harris, S.R., *Oxygen free radicals and antioxidants: a review*. *Am Pharm*, 1994. **NS34**(9): p. 26-35.
11. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Jr., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. *Swiss Med Wkly*, 2012. **142**: p. 1-14.
12. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
13. Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., et al., *A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding*. *J Mol Biol*, 2000. **304**(1): p. 55-68.
14. McCall, M.R. and Frei, B., *Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?* *Free Radic Biol Med*, 1999. **26**(7-8): p. 1034-53.
15. Stadtman, E.R., *Role of Oxidant Species in Aging*. *Curr Med Chem*, 2004. **11**: p. 1105-1112.
16. Sohal, R.S., *Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(1): p. 37-44.
17. Stadtman, E.R., *Protein oxidation and aging*. *Free Radic Res*, 2006. **40**(12): p. 1250-8.
18. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. *Chem Biol Interact*, 2006. **160**(1): p. 1-40.
19. Chiti, F. and Dobson, C.M., *Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade*. *Annu Rev Biochem*, 2017. **86**: p. 27-68.
20. Huebschmann, A.G., Regensteiner, J.G., Vlassara, H., et al., *Diabetes and advanced glycoxidation end products*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(6): p. 1420-32.
21. Ahmed, N., *Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2005. **67**(1): p. 3-21.
22. Siems, W.G., Grune, T., and Esterbauer, H., *4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine*. *Life Sci*, 1995. **57**(8): p. 785-9.
23. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(1): p. 44-84.
24. Sedelnikova, O.A., Redon, C.E., Dickey, J.S., et al., *Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis*. *Mutat Res*, 2010. **704**(1-3): p. 152-9.
25. Chen, X.J. and Butow, R.A., *The organization and inheritance of the mitochondrial genome*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(11): p. 815-25.
26. Bohgaki, T., Bohgaki, M., and Hakem, R., *DNA double-strand break signaling and human disorders*. *Genome Integr*, 2010. **1**(1): p. 15.

27. Freudenthal, B.D., Beard, W.A., Perera, L., et al., *Uncovering the polymerase-induced cytotoxicity of an oxidized nucleotide*. *Nature*, 2015. **517**(7536): p. 635-9.
28. Hussain, S.P. and Harris, C.C., *Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes*. *Cancer Res*, 1998. **58**(18): p. 4023-37.
29. Moriya, M., *Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(3): p. 1122-6.
30. Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollman, A.P., *Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG*. *Nature*, 1991. **349**(6308): p. 431-4.
31. Loft, S. and Poulsen, H.E., *Cancer risk and oxidative DNA damage in man*. *J Mol Med (Berl)*, 1996. **74**(6): p. 297-312.
32. Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., et al., *8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(1): p. 166-72.
33. Migliore, L., Petrozzi, L., Lucetti, C., et al., *Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients*. *Neurology*, 2002. **58**(12): p. 1809-15.
34. Allen, R.G. and Tresini, M., *Oxidative stress and gene regulation*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(3): p. 463-99.
35. Bonini, M.G. and Malik, A.B., *Regulating the regulator of ROS production*. *Cell Res*, 2014. **24**(8): p. 908-9.
36. Banerjee Mustafi, S., Chakraborty, P.K., Dey, R.S., et al., *Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt*. *Cell Stress Chaperones*, 2009. **14**(6): p. 579-89.
37. Bedard, K. and Krause, K.H., *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 245-313.
38. Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M., et al., *Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation*. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1978. **45**(6): p. 927-32.
39. Gutowski, M. and Kowalczyk, S., *A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance*. *Acta Biochim Pol*, 2013. **60**(1): p. 1-16.
40. Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B.K., et al., *Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015. **214**(3): p. 329-48.
41. Massaad, C.A. and Klann, E., *Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(10): p. 2013-54.
42. Culotta, V.C., Yang, M., and O'Halloran, T.V., *Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1763**(7): p. 747-58.
43. Suzuki, K.O., H.; Oh-ishi, S.; Kizaki, T.; Ookawara, T.; Fukii, J.; Radak, A.; Taniguchi, N., *Superoxide dismutases in exercise and disease*. *Handbook of Oxidants and Antioxidants and Exercise*. 2000. 243-295.
44. Powers, S.K. and Jackson, M.J., *Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(4): p. 1243-76.
45. Bjornstedt, M., Kumar, S., Bjorkhem, L., et al., *Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems*. *Biomed Environ Sci*, 1997. **10**(2-3): p. 271-9.
46. Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., et al., *The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(47): p. 29382-4.
47. Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., et al., *Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 6): p. 1375-7.
48. Meister, A. and Anderson, M.E., *Glutathione*. *Annu Rev Biochem*, 1983. **52**: p. 711-60.
49. Kirkman, H.N. and Gaetani, G.F., *Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries*. *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(1): p. 44-50.
50. Arner, E.S. and Holmgren, A., *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(20): p. 6102-9.

51. Berndt, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A., *Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1227-36.
52. Holmgren, A., *Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2275-9.
53. Kim, K., Kim, I.H., Lee, K.Y., et al., *The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system*. J Biol Chem, 1988. **263**(10): p. 4704-11.
54. Kim, K., Rhee, S.G., and Stadtman, E.R., *Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron*. J Biol Chem, 1985. **260**(29): p. 15394-7.
55. Rhee, S.G., Chae, H.Z., and Kim, K., *Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(12): p. 1543-52.
56. Whiteman, M., Ketsawatsakul, U., and Halliwell, B., *A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **962**: p. 242-59.
57. Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-6.
58. Stocker, R., Glazer, A.N., and Ames, B.N., *Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5918-22.
59. Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
60. Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., et al., *Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4533-7.
61. Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., et al., *An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans*. Carcinogenesis, 2007. **28**(3): p. 625-31.
62. Gackowski, D., Speina, E., Zielinska, M., et al., *Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(16): p. 4899-902.
63. Schmid, U., Stopper, H., Schweda, F., et al., *Angiotensin II induces DNA damage in the kidney*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9239-46.
64. Schupp, N., Schmid, U., Rutkowski, P., et al., *Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(5): p. F1427-34.
65. Vogiatzi, G., Tousoulis, D., and Stefanadis, C., *The role of oxidative stress in atherosclerosis*. Hellenic J Cardiol, 2009. **50**(5): p. 402-9.
66. Liu, V.W. and Huang, P.L., *Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(1): p. 19-29.
67. Stapleton, P.A., Goodwill, A.G., James, M.E., et al., *Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies*. J Inflamm (Lond), 2010. **7**: p. 54.
68. Dhalla, N.S., Temsah, R.M., and Netticadan, T., *Role of oxidative stress in cardiovascular diseases*. J Hypertens, 2000. **18**(6): p. 655-73.
69. Vina, J., Borras, C., and Miquel, J., *Theories of ageing*. IUBMB Life, 2007. **59**(4-5): p. 249-54.
70. Kelly, D.P., *Cell biology: Ageing theories unified*. Nature, 2011. **470**(7334): p. 342-3.
71. Hekimi, S., Lapointe, J., and Wen, Y., *Taking a "good" look at free radicals in the aging process*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(10): p. 569-76.
72. Ding, Q., Dimayuga, E., and Keller, J.N., *Oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res, 2007. **4**(1): p. 73-9.
73. Stadtman, E.R. and Berlett, B.S., *Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(5): p. 485-94.
74. Barnham, K.J., Masters, C.L., and Bush, A.I., *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(3): p. 205-14.

75. Dalle-Donne, I., *Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics*. Mass Spectrom Rev, 2003. **1**: p. 55-99.
76. Butterfield, D.A., Swomley, A.M., and Sultana, R., *Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(8): p. 823-35.
77. Williams, T.I., Lynn, B.C., Markesbery, W.R., et al., *Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(8): p. 1094-9.
78. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., et al., *Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification*. Clin Chim Acta, 2003. **333**(1): p. 19-39.
79. Ischiropoulos, H. and Beckman, J.S., *Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?* J Clin Invest, 2003. **111**(2): p. 163-9.
80. Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., et al., *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2112-7.
81. O'Brian, J., *Strategic report highlighting research priorities that will tackle the prevention and treatment of vascular dementia*, in *Alzheimer Society*. 2007. p. 1-28.
82. Anderssen, S.A., Engeland, A., Sogaard, A.J., et al., *Changes in physical activity behavior and the development of body mass index during the last 30 years in Norway*. Scand J Med Sci Sports, 2008. **18**(3): p. 309-17.
83. Barbanti, P., Fabbrini, G., Ricci, A., et al., *Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease*. Mov Disord, 1999. **14**(5): p. 764-71.
84. Jenner, P., *Oxidative stress in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **53** Suppl 3: p. S26-36; discussion S36-8.
85. Dexter, D.T. and Jenner, P., *Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms*. Free Radic Biol Med, 2013. **62**: p. 132-44.
86. Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., et al., *Glutathione, iron and Parkinson's disease*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 1037-48.
87. Yoneyama, Y., Sawa, R., Suzuki, S., et al., *Relationship between plasma malondialdehyde levels and adenosine deaminase activities in preeclampsia*. Clin Chim Acta, 2002. **322**(1-2): p. 169-73.
88. Atlas, S.A., *The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition*. J Manag Care Pharm, 2007. **13**(8 Suppl B): p. 9-20.
89. Bader, M., *Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 439-65.
90. Clauser, E., Curnow, K.M., Davies, E., et al., *Angiotensin II receptors: protein and gene structures, expression and potential pathological involvements*. Eur J Endocrinol, 1996. **134**(4): p. 403-11.
91. Yoshida, H., Kakuchi, J., Guo, D.F., et al., *Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human)*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **186**(2): p. 1042-9.
92. Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J.E., et al., *Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **185**(1): p. 253-9.
93. Iwai, N. and Inagami, T., *Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor*. FEBS Lett, 1992. **298**(2-3): p. 257-60.
94. Berry, C., Touyz, R., Dominiczak, A.F., et al., *Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(6): p. H2337-65.
95. de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 415-72.
96. Heineke, J. and Molkenstin, J.D., *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
97. Holloway, A.C., Qian, H., Pipolo, L., et al., *Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors*. Mol Pharmacol, 2002. **61**(4): p. 768-77.

98. Gaborik, Z., Jagadeesh, G., Zhang, M., et al., *The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT1 angiotensin receptor activation and signaling*. *Endocrinology*, 2003. **144**(6): p. 2220-8.
99. Lee, M.H., El-Shewy, H.M., Luttrell, D.K., et al., *Role of beta-arrestin-mediated desensitization and signaling in the control of angiotensin AT1a receptor-stimulated transcription*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(4): p. 2088-97.
100. Touyz, R.M., He, G., Wu, X.H., et al., *Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients*. *Hypertension*, 2001. **38**(1): p. 56-64.
101. Garrido, A.M. and Griendling, K.K., *NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling*. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. **302**(2): p. 148-58.
102. Sen, C.K. and Packer, L., *Antioxidant and redox regulation of gene transcription*. *FASEB J*, 1996. **10**(7): p. 709-20.
103. Chen, X.L., Dodd, G., Thomas, S., et al., *Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(5): p. H1862-70.
104. Papaiahgari, S., Zhang, Q., Kleeberger, S.R., et al., *Hyperoxia stimulates an Nrf2-ARE transcriptional response via ROS-EGFR-PI3K-Akt/ERK MAP kinase signaling in pulmonary epithelial cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(1-2): p. 43-52.
105. Kendall, R.T., Lee, M.H., Pleasant, D.L., et al., *Arrestin-dependent angiotensin AT1 receptor signaling regulates Akt and mTor-mediated protein synthesis*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(38): p. 26155-66.
106. Mehta, P.K. and Griendling, K.K., *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(1): p. C82-97.
107. Ferrario, C.M., *Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2006. **7**(1): p. 3-14.
108. Ondetti, M.A., Rubin, B., and Cushman, D.W., *Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents*. *Science*, 1977. **196**(4288): p. 441-4.
109. Kaufman, M.B., *ACE Inhibitor-Related Angioedema: Are Your Patients at Risk?* *P T*, 2013. **38**(3): p. 170-2.
110. Bhardwaj, G., *How the antihypertensive losartan was discovered*. *Expert Opin Drug Discov*, 2006. **1**(6): p. 609-18.
111. Paul, M., Poyan Mehr, A., and Kreutz, R., *Physiology of local renin-angiotensin systems*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(3): p. 747-803.
112. Bader, M. and Ganten, D., *Update on tissue renin-angiotensin systems*. *J Mol Med (Berl)*, 2008. **86**(6): p. 615-21.
113. Jöhren, O., Imboden, H., Hauser, W., et al., *Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes, and vasopressin in the mouse hypothalamus*. *Brain Res*, 1997. **757**(2): p. 218-27.
114. Saavedra, J.M., *Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities*. *Cell Mol Neurobiol*, 2005. **25**(3-4): p. 485-512.
115. Xia, H. and Lazartigues, E., *Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions*. *J Neurochem*, 2008. **107**(6): p. 1482-94.
116. Metzger, R., Bader, M., Ludwig, T., et al., *Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues*. *FEBS Lett*, 1995. **357**(1): p. 27-32.
117. Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., et al., *Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(11): p. 1417-27.
118. Klickstein, L.B., Kaempfer, C.E., and Wintroub, B.U., *The granulocyte-angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(24): p. 15042-6.
119. Lomez, E.S., Araujo, R.C., Bader, M., et al., *Tonin and kallikrein in the brain of transgenic rat line expressing human tissue kallikrein*. *Hypertension*, 2002. **39**(2): p. 229-32.

120. Saavedra, J.M., *Brain and pituitary angiotensin*. *Endocr Rev*, 1992. **13**(2): p. 329-80.
121. Aguilera, G., *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by neuropeptides*. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2011. **7**(2): p. 327-36.
122. Fink, G.D., *Long-term sympatho-excitatory effect of angiotensin II: a mechanism of spontaneous and renovascular hypertension*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1997. **24**(1): p. 91-5.
123. DiBona, G.F., *Central sympathoexcitatory actions of angiotensin II: role of type 1 angiotensin II receptors*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10 Suppl 11**: p. S90-4.
124. Lucius, R., Gallinat, S., Rosenstiel, P., et al., *The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats*. *J Exp Med*, 1998. **188**(4): p. 661-70.
125. Vervoort, V.S., Beachem, M.A., Edwards, P.S., et al., *AGTR2 mutations in X-linked mental retardation*. *Science*, 2002. **296**(5577): p. 2401-3.
126. Wright, J.W., Reichert, J.R., Davis, C.J., et al., *Neural plasticity and the brain renin-angiotensin system*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2002. **26**(5): p. 529-52.
127. Greiner, C., *P-Glykoprotein – Bedeutung für den Arzneistoffmetabolismus*, in *Serie Interaktionslexikon*. 2010.
128. Oldfield, B.J., Allen, A.M., Hards, D.K., et al., *Distribution of angiotensin II receptor binding in the spinal cord of the sheep*. *Brain Res*, 1994. **650**(1): p. 40-8.
129. Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., et al., *Physiology of microglia*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(2): p. 461-553.
130. Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J.E., et al., *Neuroinflammation in Alzheimer's disease*. *Lancet Neurol*, 2015. **14**(4): p. 388-405.
131. Tang, Y. and Le, W., *Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases*. *Mol Neurobiol*, 2016. **53**(2): p. 1181-94.
132. Kigerl, K.A., Gensel, J.C., Ankeny, D.P., et al., *Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord*. *J Neurosci*, 2009. **29**(43): p. 13435-44.
133. Labandeira-Garcia, J.L., Rodriguez-Perez, A.I., Garrido-Gil, P., et al., *Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration*. *Front Aging Neurosci*, 2017. **9**: p. 129.
134. Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., et al., *Global burden of hypertension: analysis of worldwide data*. *Lancet*, 2005. **365**(9455): p. 217-23.
135. Hajjar, I., Kotchen, J.M., and Kotchen, T.A., *Hypertension: trends in prevalence, incidence, and control*. *Annu Rev Public Health*, 2006. **27**: p. 465-90.
136. Hajjar, I.M., Keown, M., Lewis, P., et al., *Angiotensin converting enzyme inhibitors and cognitive and functional decline in patients with Alzheimer's disease: an observational study*. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 2008. **23**(1): p. 77-83.
137. Schwartz, E., Wicinski, B., Schmeidler, J., et al., *Cardiovascular Risk Factors Affect Hippocampal Microvasculature in Early Ad*. *Transl Neurosci*, 2010. **1**(4): p. 292-299.
138. Feldstein, C.A., *Effects of blood pressure changes on Alzheimer's disease*. *Neuroepidemiology*, 2010. **35**(3): p. 202-12.
139. Ge, J. and Barnes, N.M., *Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders*. *Eur J Pharmacol*, 1996. **297**(3): p. 299-306.
140. Savaskan, E., Hock, C., Olivieri, G., et al., *Cortical alterations of angiotensin converting enzyme, angiotensin II and AT1 receptor in Alzheimer's dementia*. *Neurobiol Aging*, 2001. **22**(4): p. 541-6.
141. Kawajiri, M., Mogi, M., Higaki, N., et al., *Angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis*. *Mult Scler*, 2009. **15**(2): p. 262-5.
142. Peila, R., White, L.R., Masaki, K., et al., *Reducing the risk of dementia: efficacy of long-term treatment of hypertension*. *Stroke*, 2006. **37**(5): p. 1165-70.
143. Ohrai, T., Matsui, T., Yamaya, M., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors and incidence of Alzheimer's disease in Japan*. *J Am Geriatr Soc*, 2004. **52**(4): p. 649-50.

144. Ohrui, T., Tomita, N., Sato-Nakagawa, T., et al., *Effects of brain-penetrating ACE inhibitors on Alzheimer disease progression*. *Neurology*, 2004. **63**(7): p. 1324-5.
145. Li, N.C., Lee, A., Whitmer, R.A., et al., *Use of angiotensin receptor blockers and risk of dementia in a predominantly male population: prospective cohort analysis*. *BMJ*, 2010. **340**: p. b5465.
146. Saxby, B.K., Harrington, F., Wesnes, K.A., et al., *Candesartan and cognitive decline in older patients with hypertension: a substudy of the SCOPE trial*. *Neurology*, 2008. **70**(19 Pt 2): p. 1858-66.
147. Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., et al., *Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database*. *Nat Genet*, 2007. **39**(1): p. 17-23.
148. Hajjar, I., Kritchevsky, S., Newman, A.B., et al., *Renin angiotensin system gene polymorphisms modify angiotensin-converting enzyme inhibitors' effect on cognitive function: the health, aging and body composition study*. *J Am Geriatr Soc*, 2010. **58**(6): p. 1035-42.
149. Sharp, S.I., Aarsland, D., Day, S., et al., *Hypertension is a potential risk factor for vascular dementia: systematic review*. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2011. **26**(7): p. 661-9.
150. Qiu, C., Winblad, B., and Fratiglioni, L., *The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia*. *Lancet Neurol*, 2005. **4**(8): p. 487-99.
151. Nakagawa, P. and Sigmund, C.D., *How Is the Brain Renin-Angiotensin System Regulated?* *Hypertension*, 2017. **70**(1): p. 10-18.
152. Lazartigues, E., *Brain-Selective Overexpression of Angiotensin (AT1) Receptors Causes Enhanced Cardiovascular Sensitivity in Transgenic Mice*. *Circ Res*, 2002. **90**(5): p. 617-624.
153. Wei, S.G., Yu, Y., Zhang, Z.H., et al., *Angiotensin II upregulates hypothalamic AT1 receptor expression in rats via the mitogen-activated protein kinase pathway*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(5): p. H1425-33.
154. Harris, D.M., Cohn, H.I., Pesant, S., et al., *GPCR signalling in hypertension: role of GRKs*. *Clin Sci (Lond)*, 2008. **115**(3): p. 79-89.
155. Touyz, R.M., *Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005. **14**(2): p. 125-31.
156. Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y.M., et al., *European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS)*. *Redox Biol*, 2017. **13**: p. 94-162.
157. Touyz, R.M., Briones, A.M., Sedeek, M., et al., *NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health*. *Mol Interv*, 2011. **11**(1): p. 27-35.
158. Dikalova, A.E., Gongora, M.C., Harrison, D.G., et al., *Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(3): p. H673-9.
159. Montezano, A.C. and Touyz, R.M., *Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies*. *Ann Med*, 2012. **44 Suppl 1**: p. S2-16.
160. Fazeli, G., Stopper, H., Schinzel, R., et al., *Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4*. *Mutagenesis*, 2012. **27**(6): p. 673-81.
161. Biedler, J.L., Helson, L., and Spengler, B.A., *Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture*. *Cancer Res*, 1973. **33**(11): p. 2643-52.
162. Zimnol, A., Amann, K., Mandel, P., et al., *Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice develop angiotensin II-induced oxidative stress and DNA damage without blood pressure increase*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017. **313**(6): p. F1264-F1273.
163. Zimnol, A., *Relevanz des Angiotensin II Typ 1a-Rezeptors und der NADPH-Oxidase für die Entstehung Angiotensin II-vermittelter DNA-Schäden*. *Doctoral Thesis, Universität Würzburg, Fakultät für Biologie*. 2016.
164. Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., et al., *Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain*. *Nature*, 2007. **445**(7124): p. 168-76.

165. Ostling, O. and Johanson, K.J., *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **123**(1): p. 291-8.
166. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res, 1988. **175**(1): p. 184-91.
167. Collins, A.R., *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations*. Mol Biotechnol, 2004. **26**(3): p. 249-61.
168. Fenech, M., *The in vitro micronucleus technique*. Mutat Res, 2000. **455**(1-2): p. 81-95.
169. Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., et al., *Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): p. 93-100.
170. Murgia, E., Ballardin, M., Bonassi, S., et al., *Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study*. Mutat Res, 2008. **639**(1-2): p. 27-34.
171. Eastmond, D.A. and Tucker, J.D., *Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody*. Environ Mol Mutagen, 1989. **13**(1): p. 34-43.
172. Tietze, F., *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues*. Anal Biochem, 1969. **27**: p. 502-22.
173. Baehner, R.L., Boxer, L.A., and Davis, J., *The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes*. Blood, 1976. **48**: p. 309-13.
174. Choi, H.S., Kim, J.W., Cha, Y.N., et al., *A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells*. J Immunoassay Immunochem, 2006. **27**(1): p. 31-44.
175. Rook, G.A.W., Steele, J., Umar, S., et al., *A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human J Immunol Methods*, 1985. **82**: p. 161-167.
176. Aitken, R.J., *Nitroblue tetrazolium (NBT) assay*. Reprod Biomed Online, 2018. **36**(1): p. 90-91.
177. Draper, H.H. and Hadley, M., *Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 421-31.
178. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
179. Alexandre, A. and Lehninger, A.L., *Bypasses of the antimycin a block of mitochondrial electron transport in relation to ubisemiquinone function*. Biochim Biophys Acta, 1984. **767**: p. 120-9.
180. Levi Marpillat, N., Macquin-Mavier, I., Tropeano, A.I., et al., *Antihypertensive classes, cognitive decline and incidence of dementia: a network meta-analysis*. J Hypertens, 2013. **31**(6): p. 1073-82.
181. Brand, S., Amann, K., Mandel, P., et al., *Oxidative DNA damage in kidneys and heart of hypertensive mice is prevented by blocking angiotensin II and aldosterone receptors*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115715.
182. Brand, S., Amann, K., and Schupp, N., *Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts*. J Hypertens, 2013. **31**(2): p. 333-44.
183. Schupp, N., Rutkowski, P., Sebekova, K., et al., *AT1 receptor antagonist candesartan attenuates genomic damage in peripheral blood lymphocytes of patients on maintenance hemodialysis treatment*. Kidney Blood Press Res, 2011. **34**(3): p. 167-72.
184. Xicoy, H., Wieringa, B., and Martens, G.J., *The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review*. Mol Neurodegener, 2017. **12**(1): p. 10.
185. Davis, J.B. and Maher, P., *Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line*. Brain Res, 1994. **652**(1): p. 169-73.

186. Morimoto, B.H. and Koshland, D.E., Jr., *Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line*. *Neuron*, 1990. **5**(6): p. 875-80.
187. Liu, J., Li, L., and Suo, W.Z., *HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties*. *Life Sci*, 2009. **84**(9-10): p. 267-71.
188. Ou, Z., Jiang, T., Gao, Q., et al., *Mitochondrial-dependent mechanisms are involved in angiotensin II-induced apoptosis in dopaminergic neurons*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2016. **17**(4).
189. Gao, Q., Jiang, T., Zhao, H.R., et al., *Activation of Autophagy Contributes to the Angiotensin II-Triggered Apoptosis in a Dopaminergic Neuronal Cell Line*. *Mol Neurobiol*, 2016. **53**(5): p. 2911-2919.
190. Zhao, H.R., Jiang, T., Tian, Y.Y., et al., *Angiotensin II triggers apoptosis via enhancement of NADPH oxidase-dependent oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line*. *Neurochem Res*, 2015. **40**(4): p. 854-63.
191. Costa-Besada, M.A., Valenzuela, R., Garrido-Gil, P., et al., *Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans*. *Mol Neurobiol*, 2018. **55**(7): p. 5847-5867.
192. Royea, J., Zhang, L., Tong, X.K., et al., *Angiotensin IV Receptors Mediate the Cognitive and Cerebrovascular Benefits of Losartan in a Mouse Model of Alzheimer's Disease*. *J Neurosci*, 2017. **37**(22): p. 5562-5573.
193. Valenzuela, R., Costa-Besada, M.A., Iglesias-Gonzalez, J., et al., *Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration*. *Cell Death Dis*, 2016. **7**(10): p. e2427.
194. Rodriguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J.A., et al., *Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS*. *Neurobiol Dis*, 2008. **31**(1): p. 58-73.
195. Braszko, J.J., Winiewicz, D., and Jakubow, P., *Candesartan prevents impairment of recall caused by repeated stress in rats*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013. **225**(2): p. 421-8.
196. Marchese, N.A., Artur de laVillarmois, E., Basmadjian, O.M., et al., *Brain Angiotensin II AT1 receptors are involved in the acute and long-term amphetamine-induced neurocognitive alterations*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2016. **233**(5): p. 795-807.
197. Griffiths, H.R., Moller, L., Bartosz, G., et al., *Biomarkers*. *Mol Aspects Med*, 2002. **23**: p. 101-208.
198. Jones, D.P., Carlson, J.L., Mody, V.C., et al., *Redox state of glutathione in human plasma*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(4): p. 625-35.
199. Nogueira, C.W., Zeni, G., and Rocha, J.B., *Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology*. *Chem Rev*, 2004. **104**(12): p. 6255-85.
200. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **236**(2): p. 313-22.
201. Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., et al., *Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 27891-7.
202. Toledano, M.B. and Leonard, W.J., *Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(10): p. 4328-32.
203. Burson, J.M., Aguilera, G., Gross, K.W., et al., *Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(2 Pt 1): p. E260-7.
204. Zhu, Z., Zhang, S.H., Wagner, C., et al., *Angiotensin AT1B receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT1A receptor-deficient mice*. *Hypertension*, 1998. **31**(5): p. 1171-7.
205. Kitami, Y., Okura, T., Marumoto, K., et al., *Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **188**(1): p. 446-52.

206. Oliverio, M.I., Best, C.F., Kim, H.S., et al., *Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 2): p. F515-20.
207. Liu, G., Hosomi, N., Hitomi, H., et al., *Angiotensin II induces human astrocyte senescence through reactive oxygen species production*. Hypertens Res, 2011. **34**(4): p. 479-83.
208. Liebner, S., Dijkhuizen, R.M., Reiss, Y., et al., *Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease*. Acta Neuropathol, 2018. **135**(3): p. 311-336.
209. Wosik, K., Cayrol, R., Dodelet-Devillers, A., et al., *Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis*. J Neurosci, 2007. **27**(34): p. 9032-42.

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Helga Stopper dafür bedanken, dass ich diese Dissertation am Institut für Toxikologie anfertigen durfte.

Bei Herrn Dr. Gholamreza Fazeli bedanke ich mich für die gute und freundschaftliche Betreuung sowie die kompetente und immer konstruktive Beantwortung meiner vielen Fragen.

Auch wenn die Laborarbeit an den Wochenden zuweilen etwas lang wurde, war spätestens am folgenden Montag alles vergessen, wenn das tolle Team der Toxikologie zur Arbeit kam. Die neun Monate im Labor haben mir sehr viel Spaß gemacht, insbesondere dank Katharina, Eylül, Ahmad, Johanna, Joanna, Betty, Maria und allen Mitarbeitern der AG Stopper, die ich vergessen habe zu erwähnen.

Der Tierversuch wurde von Frau Dr. Anna Zimnol betreut, der ich an dieser Stelle noch einmal besonderen Dank aussprechen möchte. Sie hat nicht nur die Versorgung der Tiere sichergestellt, sondern freundlicherweise auch die Gehirne der Versuchstiere zur Verfügung gestellt.

Prof. Dr. Reinhard Schinzel (Firma Vasopahrm, Würzburg) stellte großzügigerweise VAS2870 zur Verfügung und Prof. Dr. Tilman Grune (Universität Potsdam) übergab uns die HT-22 Zellen. Beiden danke ich recht herzlich für die Unterstützung!

Frau Dr. Eylül Bankoglu und besonders Herrn Dr. Gholamreza Fazeli möchte ich für die großartige Korrekturarbeit der ersten Fassung dieser Dissertation danken. Am meisten Dank gebührt jedoch meiner Mutter, Frau Dr. Gudrun Beckmann-Kircher, die unermüdlich und zielstrebig selbst die letzte sprachliche Unklarheit beseitigen konnte.

Zu guter Letzt möchte ich mich nochmals bei meinen Eltern bedanken, die mich über den ganzen Zeitraum unterstützt und bestärkt haben. Großer Dank gilt auch meiner Frau Morayma, die mir beim Schreiben der Dissertation zur Seite stand.

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation mit dem Titel „Neuronale Genotoxizität von Angiotensin II“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Alle Zitate oder Stellen, die dem Wortlaut nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter genauer Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Zudem versichere ich, dass diese Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Stadtbergen, den 21.10.2020

Unterschrift