

Aus dem Bereich der Inneren Medizin
Klinisch-Experimentelle Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

Regulation endothelialer Progenitorzellen unter der Wirkung des Renininhibitors Aliskiren

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2012



Vorgelegt von Dominik Philipp Johannes Lorenz
Geboren 04.09.1986 in Trier

Gewidmet
meinen Eltern, meiner Großmutter und meiner Freundin Laura

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung (Deutsch)	Seite 6
1.2 Zusammenfassung (Englisch)	Seite 8

2. Einleitung

2.1 Das kardiovaskuläre Kontinuum und Atherosklerose	Seite 10
2.2 Endotheliale Progenitorzellen	Seite 13
2.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem	Seite 14
2.4 Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems	Seite 17
2.5 Fragestellung der Arbeit	Seite 19

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere	Seite 20
3.1.1 Tiere, Behandlungsgruppen und ihre Besonderheiten	Seite 20
3.1.2 Blutdruckmessungen	Seite 21
3.2 Zellkulturexperimente	Seite 21
3.2.1 Kulturbedingungen	Seite 21
3.2.2 Kultur humaner endothelialer Progenitorzellen	Seite 22
3.2.3 Kultur endothelialer Progenitorzellen der Maus	Seite 22
3.2.4 Migrationsassay	Seite 23
3.2.5 Koloniebildende Einheiten („Colony forming units“)	Seite 24
3.2.6 Immunfärbung und DiLDL/Lectin-Färbung von Zellen	Seite 24
3.3 FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter)	Seite 24
3.3.1 Apoptose-FACS humaner endothelialer Progenitorzellen	Seite 24

3.3.2 FACS-Analyse endothelialer Progenitorzellen der Maus (Proben aus Blut und Knochenmark)	Seite 25
3.4 Quantifizierung der Atherogenese	Seite 26
3.4.1 Kryoschnitte	Seite 26
3.4.2 Öl-Rot-Färbung	Seite 27
3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	Seite 27
3.6 Proteinexpression und Western Blotting	Seite 27
3.7 Untersuchung von oxidativem Stress: der NADPH-Oxidase-Assay	Seite 29
3.8 Auswertung und Statistik	Seite 29

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Behandlung von C57Bl/6-Wildtypmäusen mit Aliskiren	Seite 30
4.1.1 Auswirkungen auf den systolischen und diastolischen Blutdruck	Seite 30
4.1.2 Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels DiLDL/Lectin-Färbung	Seite 31
4.1.3 Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels FACS-Analyse	Seite 32
4.1.4 Funktionsbestimmung endothelialer Progenitorzellen durch Migrationsassay	Seite 32
4.2 Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten mit humanen endothelialen Progenitorzellen	Seite 33
4.2.1 Funktionsbestimmung endothelialer Progenitorzellen durch Quantifizierung koloniebildender Einheiten und deren Beeinflussung durch Inhibition von eNOS und PI3-Kinase	Seite 33
4.2.2 Ergebnisse aus FACS-Analyse zur Bestimmung der Apoptoserate	Seite 35
4.2.3 Expressionsnachweis des Proreninrezeptors in endothelialen Progenitorzellen	Seite 35
4.2.4 Effekt von Aliskiren, Renin und einer Hemmung von	Seite 37

ERK auf die Migrationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen

4.3 Ergebnisse der Behandlung von ApoE ^{-/-} Mäusen mit Aliskiren	Seite 38
4.3.1 Auswirkungen auf den systolischen und diastolischen Blutdruck	Seite 38
4.3.2 Effekt von Aliskiren auf atherosklerotische Läsionen	Seite 39
4.3.3 Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels FACS-Analyse	Seite 40
4.3.4 Funktionsbestimmung endothelialer Progenitorzellen durch Migrationsassay	Seite 41
4.3.5 Einfluss von Aliskiren auf vaskulären oxidativen Stress	Seite 41
4.4 Ergebnisse der Behandlung von C57Bl/6-Mäusen mit Aliskiren in nicht blutdruckrelevanter Dosierung („low dose“)	Seite 42
4.4.1 Auswirkungen auf den systolischen und diastolischen Blutdruck	Seite 42
4.4.2 Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels DiLDL/Lectin-Färbung	Seite 43
4.4.3 Funktionsbestimmung endothelialer Progenitorzellen durch Migrationsassay	Seite 44
5. Diskussion	Seite 45
6. Literatur- und Quellenverzeichnis	Seite 50
7. Publikationen	Seite 59
8. Danksagung	Seite 60
9. Lebenslauf	Seite 61

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung (Deutsch)

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) sind wichtige Modulatoren des kardiovaskulären Systems [2]. EPC haben einen günstigen Einfluss auf die endotheliale Homöostase, die Endothelfunktion sowie die Neoangiogenese. Eine Reduktion der Anzahl dieser Zellen ist prädiktiv für schlechteres Überleben von Patienten mit vaskulären Erkrankungen [16,87]. Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), als wichtigem Regulator der vaskulären Biologie, schädigt endotheliale Progenitorzellen. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Effekte einer direkten Reninhemmung mit der Substanz Aliskiren auf Anzahl und Funktion von EPC.

Die Behandlung mit Aliskiren erhöht die Anzahl und verbessert die Funktion von EPC im Mausmodell.

In C57Bl/6-Mäusen und cholesterinreich gefütterten ApoE^{-/-} Mäusen führte die Behandlung mit Aliskiren (25 mg/kg/d s.c. über drei bis sechs Wochen) zu einer Senkung des systolischen und des diastolischen Blutdrucks um -11,5% und -13,7% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe ($p < 0,0005$). Ferner steigerte Aliskiren in C57Bl/6 Mäusen die Anzahl DiLDL/Lectin-positiver EPC ($180 \pm 21\%$, $p < 0,05$) aus der Milz sowie die Anzahl Sca-1/VEGFR-2 positiver EPC aus dem Blut ($159 \pm 14\%$, $p < 0,05$). Die Migrationskapazität, als ein Parameter für die EPC-Funktion, wurde durch die Behandlung verbessert ($165 \pm 16\%$, $p < 0,05$).

Aliskiren verbessert die Funktion und reduziert die Apoptoserate kultivierter humaner EPC.

Bei kultivierten humanen EPC führte Aliskiren zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Anzahl koloniebildender Einheiten um $152 \pm 9\%$ (1 $\mu\text{mol/l}$ Aliskiren; $p < 0,0005$ vs Kontrolle) bzw. $187 \pm 7\%$ (10 $\mu\text{mol/l}$ Aliskiren; $p < 0,0005$ vs Kontrolle und $p < 0,05$ vs Aliskiren 1 $\mu\text{mol/l}$). Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem eNOS-inhibitor NG-monomethyl-L-arginine (LNMA) verhindert werden. Die durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 500 $\mu\text{mol/l}$) induzierte

Apoptoserate in kultivierten humanen EPC wurde durch Aliskirenbehandlung (10 $\mu\text{mol/l}$) um $77 \pm 23\%$ ($p < 0,005$) reduziert.

Expression des (Pro)Renin-Rezeptors und zelluläre Effekte von Renin und Aliskiren.

Renin übt direkte zelluläre Effekte über den (Pro)Renin-Rezeptor (PRR) aus. Dieser PRR konnte in adulten Endothelzellen identifiziert werden, über die Expression in EPC hingegen war bislang nichts bekannt. Unsere Experimente mittels PCR-Analyse, Western-Blot und einer Immunfärbung zeigten sowohl die Expression in humanen kultivierten EPC, wie auch im murinen Knochenmark. Aliskiren erhöht signifikant die Migrationskapazität von kultivierten humanen EPC um $180 \pm 17\%$ ($p < 0,0005$). Auch die Behandlung mit Renin (10 nmol/l) erhöht die Migrationsfähigkeit (um $157 \pm 16\%$, $p < 0,0005$). Die Aktivierung der extrazellulär-signal-regulierten Kinase (ERK) ist ein Schlüssel-Signalweg, der dem PRR nachgeschaltet ist. Der Anstieg der Migrationsfähigkeit, verursacht, sowohl durch Aliskiren, wie auch durch Renin, hebt sich bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit dem ERK-Inhibitor PD98059 auf ($p = \text{ns}$ vs Kontrolle).

In ApoE^{-/-} Mäusen ist die Aliskirenbehandlung mit einer Reduktion der Atherogenese sowie des oxidativen Stresses assoziiert.

In ApoE^{-/-} Mäusen führte die Aliskirenbehandlung zu einer Hochregulation der Anzahl zirkulierender Sca-1/VEGFR-2 positiver EPC um $180 \pm 25\%$ ($p < 0,05$) und einem Anstieg der Migrationskapazität um $127 \pm 7\%$ ($p < 0,05$). Ferner wurde die Fläche atherosklerotischer Plaques um $58 \pm 4\%$ reduziert ($p < 0,005$). Die Behandlung mit dem direkten Vasodilatator Hydralazin (25 mg/kg/d über Trinkwasser) hatte hingegen trotz einer vergleichbaren Senkung des Blutdrucks keinen signifikanten Einfluss auf die Atherogenese. Ferner reduzierte Aliskiren in ApoE^{-/-} Mäusen die NADPH-Oxidase-Aktivität im Aortengewebe um $42 \pm 7\%$ ($p < 0,05$). Die NADPH-Oxidase-Aktivität gilt als Marker für vaskulären oxidativen Stress.

Die Effekte von Aliskiren sind auch in einer nicht-blutdruckrelevanten Dosierung zu beobachten.

Die Behandlung von C57Bl/6-Mäusen mit Aliskiren in niedrigerer Dosierung (15 mg/kg/d s.c.) hatte keine signifikanten blutdrucksenkenden Effekte. Dennoch führte

diese Aliskirendosis zu einer Steigerung der Anzahl kultivierter DiLDL/Lectin positiver EPC aus der Milz um $229\pm 30\%$ ($p < 0,05$) und einer Steigerung der Migrationsfähigkeit um $214\pm 24\%$ ($p < 0,005$).

Zusammengefasst steigert der direkte Renininhibitor Aliskiren die Anzahl und verbesserte die Funktion endothelialer Progenitorzellen im Mausmodell und verringert die Bildung atherosklerotischer Läsionen. Die Effekte wurden auch unabhängig von einer Blutdrucksenkung beobachtet.

1.2 Zusammenfassung (Englisch)

Endothelial progenitor cells (EPC) are important modulators of the cardio vascular system [2]. EPC have a beneficial influence of endothelial homeostasis, endothelial function and neoangiogenesis. A reduction of the number of these cells predict a negative outcome of patients with vascular diseases [16,87]. Activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) as an important regulator of the vascular biology impairs EPC function. Ambition of these assignment was the characterization of the effects on EPC numbers and function by direct renin inhibiton with aliskiren.

Treatment with aliskiren increases number and function of EPC in mice.

Treatment of C57Bl/6 mice and Apo E^{-/-} mice on high-cholesterol diet with aliskiren, 25 mg/kg/d s.c. for 3 to 6 weeks, reduced systolic and diastolic blood pressure by -11.5% and -13.7% compared to vehicle ($p < 0.0005$). Aliskiren increased spleen-derived DiLDL/lectin positive EPC ($180\pm 21\%$, $p < 0.05$) and Sca-1/VEGFR-2 positive EPC in the blood ($159\pm 14\%$, $p < 0.05$) and. Migratory capacity as an important functional property of EPC was increased to $165\pm 16\%$ ($p < 0.05$).

Alisikiren improves function and reduces apoptosis of cultured human EPC.

In cultured human EPC, aliskiren dose-dependently increased the number of colony forming units to $152\pm 9\%$ (1 $\mu\text{mol/l}$ aliskiren, $p < 0.0005$ vs vehicle) and $187\pm 7\%$ (10 $\mu\text{mol/l}$ aliskiren, $p < 0.0005$) which was prevented by the eNOS inhibitor NG-

monomethyl-L-arginine (LNMA). H₂O₂-induced apoptosis of cultured human EPC was reduced to 77±23% (p<0.005) by aliskiren treatment.

Expression of (pro)renin receptor (PRR) and cellular effects of renin and aliskiren.

Renin exerts direct cellular effects via the (pro)renin receptor (PRR). The PRR could be identified in adult endothelial cells but the expression in EPC was unknown. Our investigation using PCR, immunoblotting and immunochemistry shows the expression of PRR in cultured EPC and in the murine bone marrow. Aliskiren increases migratory capacity in cultured EPC to 180 ± 17% (p<0.0005). Also the treatment with renin (10 nmol/l) increases migratory capacity to 157 ± 16% (p<0.0005). Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) is a key signal transduction pathway downstream of PRR. The increase of the migratory potential of EPC induced by both aliskiren and renin could be reversed by concomitant treatment of the cells with ERK-inhibitor PD98059 (p=ns vs. vehicle).

Treatment with Aliskiren is associated with reduction of atherogenesis and oxidative stress in ApoE -/- mice

In Apo E^{-/-} mice, aliskiren increases circulating Sca-1/VEGFR-2 positive EPC to 180±25% (p<0.05) and migratory capacity to 127±7% (p<0.05). Also atherosclerotic plaque area was reduced 58±4% (p<0.005). Despite similar blood pressure lowering, treatment with hydralazine (25mg/kg/d) did not significantly influence atherogenesis. Further aliskiren is able to reduce NADPH oxidase activity in aortic tissue to 41.6 ± 6.7% (p<0.05). NADPH oxidase activity is known as an important marker of vascular oxidative stress.

Effects of aliskiren also could be observed in low dose treatment

Treatment of C57Bl/6 mice with a lower dose of aliskiren (15mg/kg/d) did not affect blood pressure but increased cultured DiLDL/lectin positive EPC to 229±30% and increased their migratory capacity to 214±24%.

In summary the direct renin inhibitor aliskiren increased number and function of endothelial progenitor cells in mice and reduced atherosclerotic lesion formation. The effects were observed independently of blood pressure lowering.

2. Einleitung

2.1 Kardiovaskuläres Kontinuum und Atherosklerose

Herz-Kreislauf-Krankheiten sind die häufigsten Todesursachen bei Frauen und Männern in Deutschland. Sie führen nicht selten durch einen vorzeitigen Tod zu einem Verlust von Lebensjahren. Im Jahr 2003 starben in Deutschland laut amtlicher Todesursachenstatistik 29.550 Frauen und 34.679 Männer an einem akuten Herzinfarkt. Das sind bei Frauen 6,5 Prozent und bei Männern 8,7 Prozent aller Todesfälle [58,59]. Darüber hinaus verursachen Herz-Kreislauf-Leiden, insbesondere die koronare Herzkrankheit, die höchsten Behandlungskosten.

Die kardiovaskuläre Sterblichkeit zeigt regionale Unterschiede und variiert auch in Deutschland zwischen den einzelnen Bundesländern deutlich [58,59]. Das Saarland bezieht im Rahmen der Todesursachenstatistik vor allem bei kardiovaskulären Erkrankungen die vorderen Ränge. Das Ausmaß der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität und deren ökonomische Bedeutung regen zum Denken über die Genese und die Konsequenz kardiovaskulärer Erkrankungen an.

Das kardiovaskuläre Kontinuum

Die Entstehung und das Voranschreiten von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems kann als Kontinuum verstanden werden [25]. Verschiedene Risikofaktoren wie Rauchen, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie [51,52] und Diabetes mellitus [28] schädigen das Endothel und führen zur sogenannten endothelialen Dysfunktion [57]. Das Fortschreiten der Atherosklerose [8,69] bedingt Schäden an den einzelnen Endorganen. So führt die Atherosklerose im Gehirn zu ischämischen Insulten, in der Niere über das Stadium der Mikro- und Makroalbuminurie zur terminalen Niereninsuffizienz sowie in den Extremitäten zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Am Herzen manifestieren sich die pathologischen Gefäßveränderungen im klinischen Korrelat der koronaren Herzkrankheit oder mit

akuten Myokardischämien im Sinne eines akuten Koronarsyndroms [25,57]. Diese führen letztlich über eine Einschränkung der myokardialen Kontraktilität zu einer chronischen Herzinsuffizienz, die pathomorphologisch mit einer linksventrikulären Dilatation und myokardialem Remodeling einhergeht [25,57].

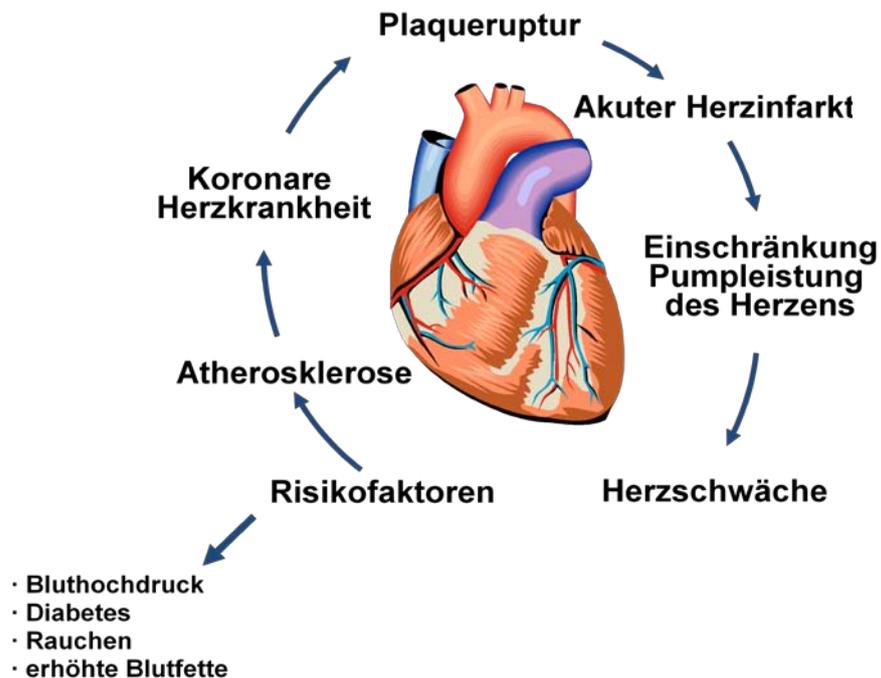


Abbildung: Das kardiovaskuläre Kontinuum [25]

Synopsis der Atherogenese

Der Prozess der Atherogenese

Die Atherogenese ist ein voranschreitender, in Stadien ablaufender Prozess [39]. Ausgehend von Risikofaktoren entwickelt sich eine endotheliale Dysfunktion [8,69]. Über diese kommt es zur Ausbildung früher Läsionen (sogenannten „fatty streaks“), welche die Basis für die Entwicklung manifester atherosklerotischer Plaques darstellen. Schlussendlich können diese Plaques instabil werden und rupturieren.

Dies stellt dann die Grundlage ischämischer Infarkte des nachfolgenden Stromgebietes dar [66].

Risikofaktoren

Verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren begünstigen den Prozess der Atherogenese. Hierzu gehören vor allem Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie im Sinne einer LDL-Cholesterinerhöhung oder HDL-Cholesterin-Erniedrigung, Nikotinkonsum, Lebensalter (Männer ≥ 45 Jahre, Frauen ≥ 55 Jahre) und positive Familienanamnese (Auftreten akuter Myokardinfarkte bei erstgradigen Familienangehörigen vor dem 55. Lebensjahr (Männer) bzw. vor dem 65. Lebensjahr (Frauen) [22,66].

Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Gefäßtonus, der Plättchenaggregation und -adhäsion, Inflammation und Zellproliferation. Die kardiovaskulären Risikofaktoren schädigen das Endothel und begünstigen die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion. Dies ist der erste und entscheidende Schritt bei der Entstehung der Arteriosklerose. Es besteht eine direkte Assoziation zwischen der endothelialen Dysfunktion und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse. Mechanismen, die von einem intakten Endothel kompensatorisch aufgebracht werden, um dem Verletzungsstimulus zu begegnen, sind die Veränderung der Adhäsions- und Permeabilitätseigenschaften für Plasmabestandteile, Leukozyten und Thrombozyten, sowie die veränderte lokale Produktion vasoaktiver Substanzen, wie z.B. Cytokine und Wachstumsfaktoren. All diese Regulationsmechanismen sind im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion gestört. Hierbei weist das Endothel der verschiedenen Gefäßregionen spezifische Eigenarten auf, was wiederum erklärt, warum die genannten Risikofaktoren in den verschiedenen Gebieten unterschiedlich stark ins Gewicht fallen und andere Pathologien verursachen [22,57,66].

Atherosklerotische Plaques

Durch den Jahre bis Jahrzehnte voranschreitenden Prozess mit immer fortwährender Produktion inflammatorischer Mediatoren, dem Einwandern von Zellen und der reaktiven Fibrose bilden sich aus den frühen Läsionen letztlich atherosklerotische Plaques, welche zu einer zunehmenden Stenosierung des betreffenden Gefäßabschnittes führen. Unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren bildet sich auf dem Plaque eine fibröse Kappe aus, die das das sogenannte Atherom aus Entzündungszellen, Lipiden, Zelldetritus und eingewanderten glatten Muskelzellen gegenüber dem Gefäßlumen abdichtet [3]. Atheromatöse Plaques unterscheiden sich dabei hinsichtlich Volumen, Ausdehnung, Stenosierungsgrad sowie hinsichtlich ihrer biochemischen Zusammensetzung und der daraus resultierenden Stabilität. Neben kalzifizierten, stabilen Plaques existieren vulnerable Plaques, welche im Vergleich zu stabilen Plaques eine höhere Rupturgefahr aufweisen [57,75].

Eine adäquate Risikostratifizierung und Prävention sind essentiell. Hierdurch könnte die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion verzögert werden. Ein gesundes Endothel hemmt den Prozess der Atherogenese und schützt vor den kardiovaskulären Endpunkten wie akuter Myokardinfarkt, Apoplex oder plötzlicher Herztod. Neue therapeutische Ansätze sollten sich somit auf den Anfang der Pathologie fokussieren, den Schutz des Endothels durch die Kontrolle von Risikofaktoren.

2.2 Endotheliale Progenitorzellen

Endotheliale Progenitorzellen stellen ein wichtiges regeneratives Element vaskulärer Biologie dar. Es wird vermutet, dass sie u.a. für den Erhalt der Integrität des Gefäßendothels eine wichtige Rolle spielen [87].

Es ist bekannt, dass die vaskuläre Funktion nicht alleine von reifen, ortsfesten Endothelzellen abhängig ist, sondern auch maßgeblich durch zirkulierende endotheliale Progenitorzellen beeinflusst wird [35,84]. Diese Vorläuferzellen

stammen aus dem Knochenmark und werden von dort, auf spezifische Reize hin, freigesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Anzahl als auch die Funktionsfähigkeit von EPC invers mit dem Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren korreliert [87]. Für eine spezifische Subpopulation dieser Stammzellen ist eine Verbesserung der Angiogenese, von Reperaturprozessen innerhalb des Gefäßsystems, eine Stärkung der endothelialen Funktion, Reendothelialisierung, Hemmung der Atherogenese, Reduktion von Plaquelast und Verbesserung der ventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt gezeigt worden [15,26,27,30-33,35,60,61,64,81]. In Übereinstimmung mit vorausgehenden Untersuchungen wurden EPC in der vorliegenden Arbeit durch die Expression der Marker Sca-1 und VEGFR-2 charakterisiert [63,70], da diese Zellpopulation einen nachgewiesenen Prädiktor für das Outcome von Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen darstellt [87].

2.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (kurz RAAS) ist ein wichtiges humorales Regulationssystem unseres Körpers und spielt in allen Stadien des kardiovaskulären Kontinuums eine zentrale pathophysiologische Rolle [85].

Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

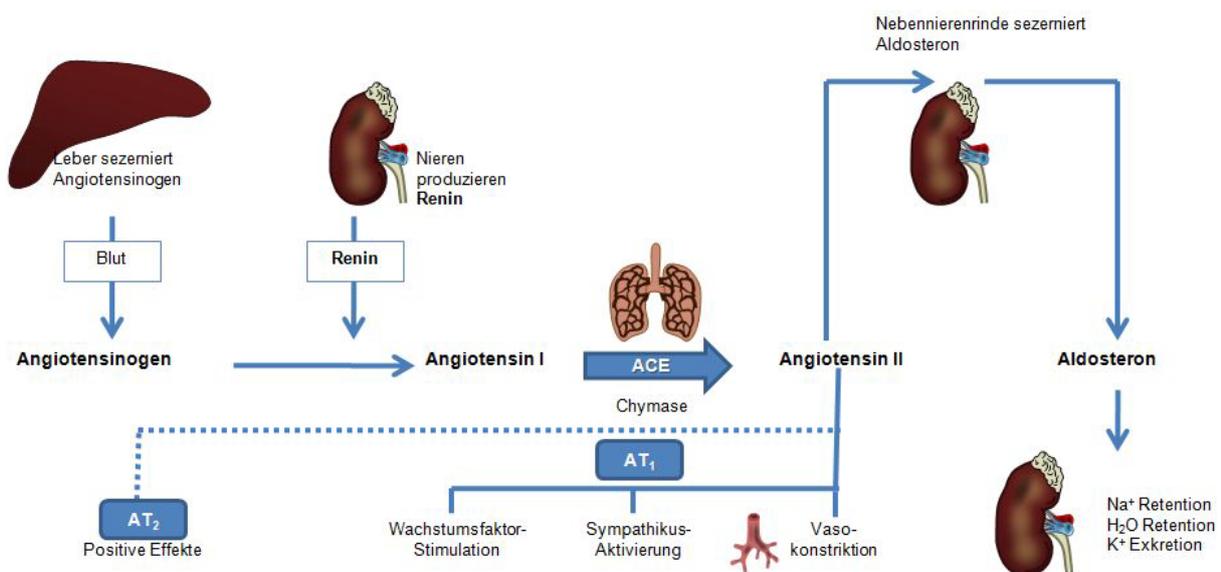


Abbildung: Schematische Darstellung des RAAS und seiner Effektoren [modifiziert nach 85]

Renin ist eine Aspartylprotease mit einer Molekülmasse von 37 kDa. Es wird als enzymatisch inaktive Vorstufe (Prorenin) von den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparats synthetisiert [36] und in Vesikeln gespeichert. In diesen Granula wird Prorenin proteolytisch zu Renin aktiviert, welches nachfolgend durch regulierte Exozytose aus den Zellen ausgeschleust wird. Renin setzt im Blut aus dem in der Leber synthetisierten Glykoprotein Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I frei [36,62]. Klassische Stimuli der Reninsekretion sind Verminderung des arteriellen Blutdrucks, Verringerung der renalen Perfusion, verminderte Natriumkonzentration im Blut sowie β -adrenerge Stimulation. Neben dieser klassisch enzymatischen Funktion, verübt Renin auch direkte, zelluläre, hormonähnliche Effekte. Dies geschieht durch Stimulation des (Pro)Reninrezeptors (PRR). Hierbei handelt es sich um ein aus 350 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer Transmembrandomäne [13,45]. Der PRR bindet sowohl Renin als auch Prorenin, wobei die Bindungsaffinität für Prorenin deutlich höher ist als für Renin [5,6,14]. Der C-terminale Teil des PRR ist mit einer H^+ -vakuolären ATPase verbunden, die eng mit der dem Rezeptor nachgeschalteten ERK (extrazellulär regulierte Kinase) 1/2 Signalkaskade assoziiert ist. Die Aktivierung von ERK führt zu einer Hochregulation profibrotischer Gene (z.B. Fibronectin und Kollagen). Ebenfalls mit dem Rezeptor assoziiert ist die p38-MAP (mitogen - aktivierte Protein) - Kinase, welche Zytoskelettproteine und damit Zellstrukturänderungen reguliert. [13,29] Welche biologische Rolle die Aktivierung des PRR spielt, ist bislang unzureichend geklärt. Dies könnte jedoch insbesondere im Kontext einer direkten Renininhibition von Relevanz sein, da diese im Vergleich zu ACE-Hemmern sowie AT_1 -Antagonisten zu einer deutlichen Steigerung der Renin- und Prorenin-Plasmakonzentrationen führt. Dies könnte wiederum zu einer Verstärkung der PRR-vermittelten Effekte führen [6,13].

Angiotensin II wird aus Angiotensin I mittels des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) gebildet. Dieses Enzym stellt das Target für die ACE-Hemmer Therapie dar. Angiotensin II spielt als multifunktionelles Peptid nicht nur eine Rolle bei der Regulation des Blutdrucks und des Wasser- und Elektrolythaushalts, sondern auch bei der Beeinflussung neuronaler und neurohumoraler Systeme. Neben seiner zentralen Rolle bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie ist Angiotensin II auch direkt essentiell am Voranschreiten des kardiovaskulären Kontinuums

(Arteriosklerose, akuter Myokardinfarkt, vaskuläres und myokardiales Remodeling, chronische Herzinsuffizienz) beteiligt [24,25,62,78].

Angiotensinrezeptoren: Angiotensin II vermittelt seine Wirkungen über zwei verschiedene Rezeptorsubtypen, den AT₁- und den AT₂-Rezeptor, welche sich hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften sowie ihrer biologischen Funktion deutlich unterscheiden. Über den AT₁-Rezeptor vermittelt Angiotensin II zentrale pathologische Effekte wie beispielsweise vaskuläre und myokardiale Hypertrophie, Proliferation, Fibrose, Apoptose und oxidativen Stress. Die Rolle des AT₂-Rezeptors in adulten Geweben wird zum Teil kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zur Aktivierung von AT₁-Rezeptoren führt die Aktivierung von AT₂-Rezeptoren zu Vasodilatation und zu antifibrotischen und antiinflammatorischen Effekten. [24,44,71,90,91].

Aldosteron ist ein Mineralokortikoid, welches nach Stimulation durch Angiotensin-II von der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde produziert und ausgeschüttet wird. Aldosteron führt durch Aktivierung der distal-tubulären Na⁺-Kanäle zu einer gesteigerten renalen Natrium-Reabsorption. Hierbei wirkt Aldosteron über intrazelluläre Mineralokortikoidrezeptoren, deren Aktivierung eine gesteigerte Translokation von Na⁺-, und K⁺-Kanälen sowie Na⁺/K⁺-Austauschern in die luminale bzw. basolaterale Zellmembran bewirkt. Dies führt zu einer gesteigerten Natrium- und Wasserretention bei gleichzeitig vermehrter Kalium- sowie Protonen-Exkretion [24,36,62].

Pathophysiologische Rolle des RAAS bei der arteriellen Hypertonie und der Atherogenese

Arterielle Hypertonie: Der arterielle Blutdruck ist eine Größe, die sich nach dem Ohm'schen Gesetz aus dem totalen peripheren (Gefäß-) Widerstand und dem Herzzeitvolumen bestimmen lässt. Das RAAS beeinflusst sowohl den Wasser- und Elektrolythaushalt als auch den Gefäßtonus und reguliert somit beide Stellgrößen des arteriellen Blutdrucks. Hierbei wird die RAAS-vermittelte Erhöhung des Gefäßwiderstands durch verschiedene Mechanismen erreicht. Einerseits führt Angiotensin II, via AT₁-Rezeptor, zu einer direkten Vasokonstriktion. Andererseits steigert Angiotensin II den Sympthotonus und verstärkt so die vasokonstriktiven

Eigenschaften von Noradrenalin. Darüber hinaus führt die RAAS-Aktivierung zu einer gesteigerten Flüssigkeits- und Elektrolytretention, welche eine Zunahme des Herzzeitvolumens bedingt. Eine Aktivierung des RAAS spielt somit pathophysiologisch eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Progression der arteriellen Hypertonie, welche wiederum einen Hauptrisikofaktor für das Fortschreiten des kardiovaskulären Kontinuums darstellt [24,25].

Atherogenese: Angiotensin II spielt eine zentrale Rolle bei der Arterioskleroseentstehung, indem es alle Stadien dieses Prozesses fördert [24,46]. Über diverse Mechanismen wirkt Angiotensin II proinflammatorisch, drosselt die Produktion des benefitreichen Stickstoffmonoxids und treibt somit die Plaqueentstehung voran. Im Rahmen der Atherogenese kommt es auch zu einer verstärkten Expression verschiedener Komponenten eines lokalen RAAS [24,73], wie beispielsweise dem AT₁-Rezeptor oder dem ACE. Die Regulation dieses gewebständigen RAAS scheint vollständig unabhängig von dem zirkulierenden RAAS zu sein. Eine gesteigerte Produktion von Angiotensin II scheint somit gemeinsam mit der Hochregulation des AT₁-Rezeptors zu einer potenzierten Wirkungssteigerung des lokalen RAAS zu führen. Dieses Zusammenspiel verschiedener RAAS-Komponenten fördert die Atherogenese, mit den Endpunkten Plaqueruptur und Gefäßokklusion. Dies imponiert klinisch als akutes Koronarsyndrom, Apoplex oder einem akuten arteriellen Extremitätenverschluss [24].

2.4 Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems

Eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAAS) spielt eine zentrale pathophysiologische Rolle bei der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion sowie der Atherosklerose [24]. Daher sind Strategien zur Hemmung der RAAS-Aktivität wichtige Ansatzpunkte zur Verhinderung, beziehungsweise Eindämmung kardiovaskulärer Pathologien.

ACE-Hemmer

ACE-Hemmer haben das Angiotensin-Conversions-Enzym (ACE) als Target [12]. Durch die Inhibition des ACE unterbleibt die Umwandlung des wenig blutdruckwirksamen Angiotensin I zum hochpotenten Hypertensivum und Vasokonstriktor Angiotensin II. Dadurch kann der arterielle Blutdruck effektiv gesenkt. Mehrere große klinische Endpunktstudien konnten ferner nachweisen, dass eine Therapie mit ACE-Hemmern bei Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz und nach stattgehabtem Herzinfarkt zu einer signifikanten Reduktion der kardiovaskulären Mortalität führt [11,24,67]. Die für ACE-Hemmer nachgewiesene, positive Beeinflussung von EPC könnte hier pathophysiologisch eine Rolle spielen [9,42].

Angiotensinrezeptorblocker (ARB)

Mit der Entwicklung der ARB steht eine weitere potente Substanzklasse für das gleiche Indikationsgebiet zur Verfügung. Es sollte versucht werden, durch selektive Blockade des AT₁-Rezeptors die potentiell protektiven Eigenschaften des AT₂-Rezeptors zu erhalten oder sogar zu verstärken [24,56,74]. Es werden die AT₁-Rezeptor-vermittelten Effekte, wie beispielsweise Vasokonstriktion, Natrium- u. Wasserretention, Sympathikusmodulation und Proliferationsstimulation aufgehoben. Auch für AT₁-Antagonisten liegen zahlreiche kontrollierte und randomisierte Studien vor, welche positive Effekte auf die Reduktion von Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen [7,20,24,43,49].

Renininhibitoren

Seit kurzem steht eine weitere Substanz zur Hemmung des RAAS zur Verfügung. Der direkte Renininhibitor Aliskiren greift am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der RAAS-Kaskade an, indem Aliskiren direkt an Renin bindet und es dadurch inaktiviert. Das Prinzip der Reninhemmung unterscheidet sich mechanistisch von der ACE-Inhibition bzw. der Angiotensin-Rezeptorblockade. Sowohl ACE-Hemmer als auch ARB führen, durch Verlust des negativen Feedbacks, zu einem Anstieg der Plasmareninkonzentration sowie der Plasmareninaktivität, Durch die direkte Renininhibition wird, im Vergleich zu den beiden anderen Substanzgruppen, die

Plasmareninaktivität jedoch direkt gehemmt. Allerdings kommt es unter Aliskiren zu einer deutlicher stärkeren Erhöhung der Plasmareninkonzentration [24,48]. Die klinische Bedeutung dieser mechanistischen Unterschiede ist unklar. Randomisierte klinische Endpunktstudien sowie direkt vergleichende Studien mit den bisherigen RAAS-hemmenden Substanzen stehen noch aus. Daher ist die genaue Charakterisierung der zellulären Effekte von Renin, sowie einer direkten Reninhemmung auf Anzahl und Funktion von EPC, sowie auf die Atherogenese relevant.

2.5 Fragestellung der Arbeit

Ein aktiviertes Renin-Angiotensin-System ist maßgeblich an der Genese sowie der Aufrechterhaltung krankhafter Prozesse des Herz-Kreislaufsystems beteiligt. Eine RAAS-Aktivierung hat negative Auswirkungen auf endotheliale Progenitorzellen. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte von Renin, sowie einer RAAS-Blockade durch direkte Renininhibition, auf Anzahl und Funktion von EPC untersucht.

Hierbei soll zunächst die Frage beantwortet werden, ob der Renininhibitor Aliskiren im Mausmodell zu einer relevanten Blutdrucksenkung führt. Ferner soll gezeigt werden, welche Auswirkungen eine Reninhemmung auf die Anzahl und die Funktionsfähigkeit von EPC hat. Neben C57Bl/6 Mäusen sollen hier auch ApoE^{-/-} Mäuse, die ein Modell für vaskulären Schaden darstellen, untersucht werden. In einem nächsten Schritt bleibt dann zu klären, ob die Effekte rein durch die beobachtete Blutdrucksenkung zur erklären sind, oder ob Aliskiren in der Lage ist auch Blutdruck-unabhängig auf EPC einzuwirken.

Schließlich sollen die Effekte von Renin, sowie die Effekte einer direkten Renininhibition auf die Anzahl und die Funktion von EPC an kultivierten humanen EPC untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Tiere, Behandlungsgruppen und ihre Besonderheiten

Die Tierexperimente entsprachen in ihrer Durchführung den institutseigenen Richtlinien und dem deutschen Tierschutzgesetz. Für unsere Experimente wurden 10-12 Wochen alte männliche C57Bl/6-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) genutzt und 10-12 Wochen alte ApoE^{-/-} Mäuse (C57Bl/6 als genetischer Hintergrund, aufgezogen in eigener Zucht) eingesetzt. Die Tiere wurden artgerecht einzeln oder in Gruppen bis zu maximal sechs Versuchstieren bei Raumtemperatur (22 °C) in einer Käfigatmosphäre gehalten. Auf einen zirkadianen Tag-Nachtrhythmus von je 12 Stunden hell und dunkel wurde geachtet. Ferner hatten die Tiere ständig Zugang zu ausreichend Trinkwasser und Futter. Im Käfig stand ihnen ausreichend Platz zur Verfügung.

C57Bl/6-Mäuse wurden mit regulärem Trockenfutter für Mäuse gefüttert. ApoE^{-/-} Mäuse und eine weitere C57Bl/6-Gruppe wurden für 6 Wochen mit einer Diät gefüttert, die einen hohen Fett- und Cholesterin-Anteil aufwies (sogenannte western-type diet; 21% Fett, 19,5% Casein und 1,25% Cholesterin; Ssniff, Soest, Deutschland). Ein Teil der C57Bl/6 und ApoE^{-/-} Mäuse wurde über einen Zeitraum von drei bis sechs Wochen, über subkutan implantierte osmotische Minipumpen (Alzet, Cupertino, Kalifornien), mit dem direkten Renininhibitor Aliskiren behandelt (Novartis, Schweiz). Je nach Fragestellung wurde Aliskiren in einer Dosierung von 15 oder 25 mg/kg Körpergewicht pro Tag verabreicht. Eine zusätzliche Gruppe von ApoE^{-/-} Mäusen wurde mit dem Vasodilatator Hydralazin behandelt (Sigma Aldrich, Deutschland). Hydralazin wurde oral über Zumischung ins Trinkwasser (25 mg/kg/Tag) verabreicht.

3.1.2 Blutdruckmessungen

Die Messung von Herzfrequenz und Blutdruck wurden an wachen Tieren mittels einer auf 37 °C vorgewärmten, computerbasierten Einheit durchgeführt (BP2000, Visitech Systems, USA). Die einzelnen Messungen erfolgten mittels einer aufblasbaren Manschette, welche an den Schwanz der Tiere angelegt wurde. Um die Tiere mit der Methode vertraut zu machen, erfolgten zunächst Probemessungen, an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Nach diesen drei Tagen des Eingewöhnens wurden die Tiere wöchentlich ein- bis zweimal der Messprozedur unterzogen. Während jeder Prozedur wurden 15 bis 20 Einzelmessungen durchgeführt und nachfolgend die Werte für jedes einzelne Tier gemittelt. Die Mittelwerte aller Prozeduren wurden schließlich für den Vergleich der Tiergruppen untereinander genutzt.

3.2 Zellkulturexperimente

Die Isolation und Anreicherung endothelialer Progenitorzellen in der Zellkultur erfolgte in einem Mehrstufenprozess. Dazu wurden sie aus der Gesamtpopulation mononukleärer Zellen (MNC) selektiert. Die MNC wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus peripheren Blut gesunder Probanden oder aus Milzgewebe von Versuchstieren isoliert. Anschließend ließen sich die Zellen, durch ihre Fähigkeit zur Adhäsion auf Fibronectin, sowie die Fähigkeit zum Wachstum in einem endothelspezifischen Kulturmedium, weiter differenzieren.

3.2.1 Kulturbedingungen

Die mononukleären Zellen wurden in einer Atmosphäre von 5%igem CO₂ bei 37 °C in Zellkulturschalen verschiedener Größe kultiviert. Das Medium, in dem sich die Zellen befanden, das sogenannte endotheliale Basalmedium (EBM, Lonza) wurde mit Zusatzstoffen (1 µg/ml Hydrocortison, 3 µg/ml „Bovine Brain Extract“, 30 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml Amphotericin B, 10 µg/ml hEGF und 20% fetalem Kälberserum) versehen und stets unter den sterilen Bedingungen einer Zellkulturbank gewechselt.

3.2.2 Kultur humaner endothelialer Progenitorzellen

Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut junger, gesunder Probanden gewonnen. Das Blut wurde hierzu in Natrium-Citrat-Röhrchen entnommen und mittels einer Biocoll (Ficoll)-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Hierzu wurden 15 ml Biocoll (Firma Biochrom AG) in 50 ml Falcons vorgelegt und mit einem Blut-PBS (phosphate buffered saline, phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)-Gemisch überschichtet. Anschließend wurden die Falcons 20 min bei Raumtemperatur mit 2400 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die während der Zentrifugation in einer Interphase angereicherten MNC wurden nachfolgend vorsichtig in neue 50 ml Falcons überführt, mit PBS-Lösung auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10 min bei Raumtemperatur 2400 rpm mit Bremse). Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 30 ml PBS-Lösung resuspendiert und nochmalig für 10 min bei Raumtemperatur 2400 rpm mit Bremse zentrifugiert. Hiernach und nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml EBM, dem Zusatzstoffe beigelegt wurden, resuspendiert. Anschließend wurden 4×10^6 mononukleäre Zellen in fibronectinbeschichteten Zellkulturschalen in EBM (mit Zusatzstoffen) kultiviert [35,72,86,88,89]. Nach vier Tagen wurden nicht adhärenente Zellen durch Auswaschung mit PBS entfernt. Adhärenente Zellen wurden in frischem Medium inkubiert und auf diese Weise selektiert. Die Identifikation endothelialer Progenitorzellen erfolgte durch ihre Fähigkeit, DiLDL (1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyaninelabeled acetylated low-density lipoprotein, 2,4 µg/ml; CellSystems) zu phagozytieren und sich mit FITC- (Fluoresceinisothiocyanat-) markiertem *Ulex europaeus* Agglutinin I (Lectin, 10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) anfärben zu lassen. Doppelt positive Zellen wurden im Rahmen einer verblindeten Untersuchung jeweils in drei Gesichtsfeldern manuell ausgezählt (Mikroskop Nikon Eclipse E600; Vergrößerung x 100).

3.2.3 Kultur endothelialer Progenitorzellen der Maus

Bei Mäusen fungiert die Milz als hämatopoietisches Organ. Nach Entnahme der Milzen wurde mithilfe eines speziellen Puffers, im Sinne einer physiologische Lösung, aus den Milzen eine Zellsuspension gewonnen. Aus dieser wurden die MNC mithilfe der oben beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anstelle des Blut-PBS-Gemisches wurde hier die Milzzellsuspension (35 ml PBS-verdünnte EDTA-

Milzzelllösung) vorsichtig auf die vorgelegte Biocoll-Lösung aufgeschichtet und dann analog dem Ablauf bei der Zentrifugation und Resuspendierung humaner MNC bearbeitet. Schließlich wurde das Zellpellet in 5 ml EBM mit Zusatzstoffen resuspendiert und auf fibronectinbeschichteten (Sigma-Aldrich) Zellkulturplatten kultiviert [72,86,88]. Nach vier Tagen konnten auch hier adhärente Zellen durch ihre Fähigkeit, DiLDL aufzunehmen und sich mit FITC-markiertem Lectin anfärben zulassen, als endotheliale Progenitorzellen identifiziert werden. Doppelt positive Zellen wurden jeweils im Rahmen einer verblindeten Untersuchung in drei Gesichtsfeldern manuell ausgezählt (Mikroskop Nikon „Eclipse E600“; Vergrößerung x 100).

3.2.4 Migrationsassay

Die Migrationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen wurde in modifizierten Boydenkammern [31,80] bestimmt. Hierzu wurden 4×10^6 , nach oben beschriebener Isolation aus den Milzen der Mäuse oder dem humanen peripheren Blut gewonnene, MNC auf fibronectinbeschichtete Zellkulturplatten aufgebracht und über vier Tage kultiviert. Nach vier Tagen wurden die Zellen für 24 Stunden mit Aliskiren (10 $\mu\text{mol/l}$), Renin (10 nmol/l) oder dem ERK (Extrazellulär-signal-regulierte Kinase)-Inhibitor PD 98059 (10 $\mu\text{mol/l}$) behandelt. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen mithilfe von Trypsin abgelöst und durch Zentrifugation aufgereinigt. Nachfolgend wurden die Zellen in EBM resuspendiert und gezählt. 1×10^5 Zellen wurden jeweils in 500 μl EBM ohne Zusätze aufgenommen und in Migrationskammern eingebracht, welche an ihrer Unterseite einen mit Poren versehenen Filter aufweisen (HTS Fluoroblock, 8 μm Porengröße, BD Biosciences). Die Kammern wurden dann in eine 24-Well-Platte eingesetzt. In den einzelnen Vertiefungen befand sich EBM ohne Zusätze, dem 100 ng/ml SDF-1 (R&D Systems) als chemischer Lockstoff zugesetzt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C wurde der Filter einer jeweiligen Kammer sorgfältig gewaschen, fixiert und wie oben beschrieben mit DiLDL inkubiert. Die SDF-1 stimulierte Migrationsfähigkeit konnte dann durch Zählen der migrierten EPC, auf der Unterseite eines jeden Filters bestimmt werden. Die Auszählung erfolgte als verblindete Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung x 400).

3.2.5 Koloniebildende Einheiten („colony forming units“)

Nach der Isolation wurden 5×10^6 MNC auf fibronectinbeschichteten 6-Well-Platten in EBM (mit Zusätzen) inkubiert und kultiviert. Dies erfolgte entweder unter Zugabe der oder ohne die Zugabe von Aliskiren, des Stickstoff-Monooxid-Synthase(eNOS)-Inhibitors Monomethyl-L-Arginin (LNMA) oder des Inhibitors der Phosphoinosit-3-Kinase (PI3K) LY-294002. Nach 48 Stunden wurden die nicht-adhärenenten Zellen des Überstandes mittels einer Pipette aufgenommen und durch Zentrifugation aufgereinigt. Nach Resuspension des Pellets wurden 1×10^6 Zellen auf fibronectinbeschichtete 24-Well-Platten ausgebracht und in EBM (mit Zusätzen) kultiviert; wiederum mit oder ohne Zugabe von Aliskiren, LNMA oder LY 294002. Nach 5 weiteren Tagen in Kultur wurden die EPC-Kolonien unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt. EPC-Kolonien wurden dabei definiert, als Zellcluster von mehr als 15 Zellen. Die ermittelten Werte werden angegeben als absolute Zahl der Kolonien pro Well [23].

3.2.6 Immunfärbung

Für die immuncytometrische Untersuchung wurden 2×10^6 Zellen in einer 24-Well-Platte ausgesät und kultiviert. Danach wurden die Zellen mit 2%igem Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Anti-(Pro)Renin-Rezeptor-Antikörper (Primärantikörper) inkubiert und im Folgenden mithilfe eines FITC-markierten Sekundärantikörpers (Dianova) detektiert.

3.3 FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter)

3.3.1 Apoptose-FACS humaner endothelialer Progenitorzellen

Nach der Isolation wurden 4×10^6 MNC auf eine fibronectinbeschichtete 6-Well-Platte ausgesät. Nach vier Tagen in Kultur wurden nicht adhärenente Zellen durch Waschung mit PBS abgelöst und adhärenente Zellen durch Zugabe von frischem EBM mit Zusätzen weiter inkubiert. Hinzugegeben wurde entweder Aliskiren, H_2O_2 oder kein

Behandlungsagens. 24 Stunden nach Zugabe des Behandlungsmediums wurden die adhärenen Zellen in PBS gewaschen, mithilfe von Trypsin abgelöst und mit FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumiodid versehen. [18,89] IgG 2a FITC (PharMingen) diente als Negativkontrolle. Die FACS-Analyse wurde mit dem Gerät „FACS Calibur“ (Becton Dickinson) und der Software „Cell Quest Pro“ (BD Biosciences) durchgeführt.

3.3.2 FACS-Analyse endothelialer Progenitorzellen der Maus (Proben aus Blut und Knochenmark)

Die Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen der Maus mittels FACS-Analyse erfolgte aus dem Vollblut oder dem Knochenmark der Versuchstiere. Zur Untersuchung des Bluts wurde den Versuchstieren 50 - 100 µl EDTA-Vollblut aus der Vena cava inferior entnommen. Die Mausblutproben wurden im Folgenden zur Zelllyse mit Pharmlyse (Firma BD Biosciences) inkubiert (1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser, je 3 ml pro Probe für 5 min bei Raumtemperatur), anschließend bei 1750 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in mit bovinem Serumalbumin (BSA) versehenem FACS-Puffer resuspendiert. Die anschließende Behandlung mit 10 µl Fc-Block (Becton Dickinson) und Inkubation über 10 min bei 4 °C diente der Blockung unspezifischer Bindungen von Antikörpern auf der Oberfläche der Zellen.

Die Knochenmarksproben wurden nach entsprechender Präparation aus dem Femur und der Tibia gewonnen. Unter Zuhilfenahme eines spezifischen Filtersystems (100 µm Filter-Mesh auf Nylonbasis) wurde das Knochenmark mit FACS-Puffer aus dem Knochen ausgespült und so als Markfraktion aus dem Knochenskelett herausgetrennt. Zur Aufreinigung wurde die Knochenmarksuspension zentrifugiert (in 50er Falcons mit 1000 rpm bei 4°C über 10 min). Anschließend wurde auch das Knochenmark mit Pharmlyse versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurde die Suspension mit 2 ml FACS-Puffer BSA aufgefüllt und wiederum bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach vorsichtigem Absaugen des Mediums mit 1 ml FACS-Puffer BSA versetzt und resuspendiert. 1×10^6 Zellen wurden dann in 50 µl Suspension in FACS-Röhrchen übertragen und analog der Blutproben zum Schutz vor unspezifischen Bindungen nach Zugabe von 10 µl Fc-Block über 10 min bei 4 °C inkubiert.

Nach einer derartigen Aufbereitung beider Proben wurde die zu untersuchende Zellpopulation durch Markierung mit je 10 µl Sca-1-fluorescein isothiocyanate (FITC; E13–161.7, BD PharMingen) und VEGFR-2 (Flk-1) (Avas12α1, BD PharMingen) versetzt. Dabei dienten Isotypen-Antikörper (FITC rat IgG2a, PE rat IgG2a, Becton Dickinson) als Kontrolle für jedes Experiment, ebenfalls jeweils 10 µl/Probe. Beide Antikörperkonjugate wurden bei 4 °C über eine halbe Stunde inkubiert und zweimalig mit je 2 ml FACS-Puffer BSA gewaschen und zentrifugiert (1000 rpm für Knochenmarksproben, 1750 rpm für Vollblutproben, beide in 4 °C-Atmosphäre). Anschließend wurde das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und konnte gemessen werden. Der Analyse diene das Gerät „FACS Calibur“ (Becton Dickinson) mit der Software „Cell Quest Pro“ (BD Biosciences).

3.4 Quantifizierung der Atherogenese

3.4.1 Kryoschnitte

Die Herzen der Versuchstiere wurden entnommen und am Entnahmetag in einem speziellen Einbettmedium für Kryoschnitte weggefroren. Diese Proben konnten dann später mithilfe eines Kryostats der Firma Leica (Deutschland) in 10µm dicke Kryoschnitte verarbeitet werden. Beginnend an der Herzspitze wurde insbesondere das Aortenklappenareal in Höhe des Sinus dargestellt und die Schnittfolge bis in die ascendierende Aorta fortgesetzt. Schließlich wurden 25 hintereinandergeschaltete Kryoschnitte pro Tier unter Zuhilfenahme von Ölrot angefärbt. Ein Nikon E600 Mikroskop mit der nachgeschalteten Lucia Measurement Software (Version 4.6/ beides Nikon Düsseldorf, Deutschland) wurden genutzt zur Messung des lipidtragenden Areals sowie der Gesamtfläche der Aorta im histologischen Schnitt. Im Rahmen einer verblindeten mikroskopischen Untersuchung wurde schließlich der prozentuale Anteil des lipidtragenden Areals an der Gesamtaortenfläche bestimmt.

3.4.2 Ölrotfärbung

Die Ölrotfärbung dient der Darstellung von Lipiden [83], insbesondere auch lipidhaltiger atherosklerotischer Plaques. Hierzu wurden die Kryoschnitte, wie unter 3.4.1 beschrieben, zunächst bei Raumtemperatur getrocknet, dann in 4% Formalin für 30 min fixiert. Nach einem Waschschrift in destilliertem Wasser wurden die Schnitte kurz in Isopropanol getaucht und anschließend für zwei Stunden in ein Ölrotbad gegeben. Nach einem erneuten kurzen Waschschrift konnten die Schnitte dann nass eingedeckt werden und standen anschließend für die Mikroskopie zur Verfügung.

3.5 Polymerase-Kettenreaktion

2×10^7 Zellen wurden auf fibronectinbeschichteten Zellkulturplatten in Kultur gebracht. Nach vier Tagen in Kultur wurden die Zellen lysiert und die RNA der Zellen isoliert. Auch aus Knochenmark von C57Bl/6 Mäusen wurde RNA isoliert. Hierzu wurde Knochenmark wie oben beschrieben gewonnen. Das Zellpellet, das sich nach Zentrifugation am Falconboden gesammelt hatte, wurde unter Nutzung von peqGOLD RNAPure (Peqlab) lysiert; anschließend wurde die RNA isoliert. Nach cDNA-Synthese (Sensiscript RT Kit, Qiagen), wurde die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Hierzu wurden folgende Primer benutzt: (Pro)renin receptor for: 5'-ATTGTCCATGGGCTTCTCTG-3' und (Pro)renin receptor rev: 5'-GAGCCAACTGCAAAACAACA-3'.

3.6 Proteinexpression und Westernblottig

Die Western-Blot-Analyse ist eine probate Methode zur molekularbiologisch fundierten Quantifizierung der Proteinexpression. Am Anfang steht die Proteinbestimmung aus dem jeweiligen Ausgangsgewebe, beziehungsweise dem Zellkulturmaterial.

Proteinisolation und -bestimmung nach der LOWRY-Methode

Damit die zelleigenen Proteine besser bestimmbar sind, wurden die Zellen lysiert. Hierzu wurde ein Lysepuffer verwendet, dem Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden (0,1 M Tris, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerol, Leupeptin 1 µg/ml, Aprotinin 1 µg/ml). Dieser Lysepuffer wurde auf das durch mechanische Zerkleinerung hergestellte Gewebelysate, beziehungsweise auf die Zellkulturschale gegeben. Hierzu wurden 1×10^7 MNC nach Biocoll (Ficoll)-Dichtegradientenzentrifugation auf fibronectinbeschichteten Zellkulturschalen in Kultur gebracht, in EBM differenziert und nach vier Tagen mit Lysepuffer behandelt. Danach wurde das Gesamtlisat bei 95 °C im Heizblock über vier Minuten erhitzt, um die Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Die nachfolgende Proteinbestimmung erfolgte nach der LOWRY-Methode [37]. Diese Methode ist ähnlich der Biuret-Methode und funktioniert ebenfalls nach dem kolorimetrischen Prinzip. In einem ersten Schritt entsteht durch Zugabe des Reagenz A (Biorad®, DC Protein Assay) in alkalischer Lösung ein Protein-Kupfer-Komplex. Dieser Komplex ist dann in der Lage, ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens; Biorad®, Dc Protein Assay Reagent B) zu reduzieren. Dabei färbt sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau. Die Absorption der Lösung kann dann photometrisch detektiert werden (bei 540 nm).

Gelelektrophorese, Proteintransfer und Antikörperinkubation

Nach der Proteinisolation und Proteinbestimmung wurden, um die Konzentration des zu untersuchenden Proteins bei verschiedenen Versuchsbedingungen vergleichbar zu gestalten, jeweils 30 µg des Gesamtlisates auf ein Gel aufgetragen. Als Elektrophorese-Gel diente ein zehnpromzentiges SDS-Polyacrylamid-Gel. Anschließend fand die elektrophoretische Auftrennung in Gegenwart eines β-Mercaptoethanolpuffers statt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dies erfolgte unter Zuhilfenahme eines Transferpuffers und der Nutzung der Semi-Dry-Transfer-Cell der Firma Biorad®. Anschließend wurde die Membran mit 5% Trockenmilch geblockt und dann mit dem Anti-(Pro)Renin-Rezeptor-Antikörper (Abcam) inkubiert. Die Antikörperfragmente, die nicht spezifisch gebunden waren, wurden mit PBS-Tween-Puffer (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24 g/l KH₂PO₄, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 1 ml/l Tween) abgewaschen. Die Immunodetektion erfolgte mithilfe eines Rabbit-Anti-Goat-IgG-

Antikörpers (Sigma) als Sekundärantikörper und der Nutzung eines etablierten ECL-Kits (enhanced chemiluminescence) der Firma Amersham Biosciences. Optisch wurde die Detektion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht und konnte so densitometrisch quantifiziert werden.

3.7 Untersuchung von oxidativem Stress: der NADPH-Oxidase-Assay

Oxidativer Stress kann mechanistisch mithilfe des NADPH-Oxidase-Assays näher untersucht werden. Die Aktivität der NADPH-Oxidase kann mittels eines Lucigenin-abhängigen Chemilumineszenz-Assays gemessen werden. Hierzu wird ein sogenannter B-Puffer verwendet. Dieser B-Puffer enthält 50 mmol/l Phosphat (pH 7,0), 1 mmol/l EGTA, Protease-Inhibitoren (Complete;Roche), 150 mmol/l Sucrose, 0,005 mmol/l Lucigenin und 0,1 mmol/l NADPH [34,40]. Das zu untersuchende Gewebe der Aorten von Versuchstieren wurde mithilfe eines Glas/Teflon-Potters mechanisch in eiskaltem B-Puffer lysiert, dem Lucigenin und Substrat fehlten. Die absolute Proteinkonzentration wurde auf 1 mg/ml eingestellt. 100 µl Aliquots der Proteinprobe wurden über 10 min in Quadruplikaten gemessen. Hierbei wurde NADPH als Substrat zugeführt und die Messung in einem Scintillations-Zähler (Berthold Lumat LB 9501, Deutschland) in 1 min-Intervallen durchgeführt. .

3.8 Auswertung und Statistik

Die Ergebnisse wurden vorgelegt als Mittelwert \pm Standard Fehler des Mittelwertes (SEM) Die statistischen Analysen wurden mithilfe der „GraphPad Prism“-Software (Version 5) erstellt. Vergleiche zweier oder mehrerer Bedingungen erfolgte mittels t-Test oder ANOVA. Auch diese Ergebnisse wurden dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Post-hoc-Vergleiche wurden mithilfe des Neuman-Keuls-Test durchgeführt. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Behandlung von C57Bl/6-Wildtypmäusen mit Aliskiren

4.1.1 Auswirkungen auf den systolischen und diastolischen Blutdruck

Zahlreiche Studien haben die blutdrucksenkende Wirkung von Aliskiren bei Menschen belegt [19,48,50,68]. Ob eine Reninhemmung auch im Mausmodell zu einer relevanten Blutdrucksenkung führt, wurde bisher kontrovers diskutiert. Daher wurden C57Bl/6-Mäuse für 21 Tage mit Aliskiren, mittels subkutan implantierter osmotischer Minipumpen, in einer Dosierung von 25 mg/kg/d behandelt. Die Behandlung mit Aliskiren führte zu einer signifikanten Reduktion des systolischen Blutdruckes um $11,5\% \pm 1,6\%$ ($-13,1 \pm 1,9$ mmHg, $p < 0,0005$) und des diastolischen Blutdruckes um $13,7\% \pm 2,6\%$ ($-11 \pm 2,1$ mmHg, $p < 0,0005$) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe un behandelter C57Bl/6-Mäuse (Abbildung 1).

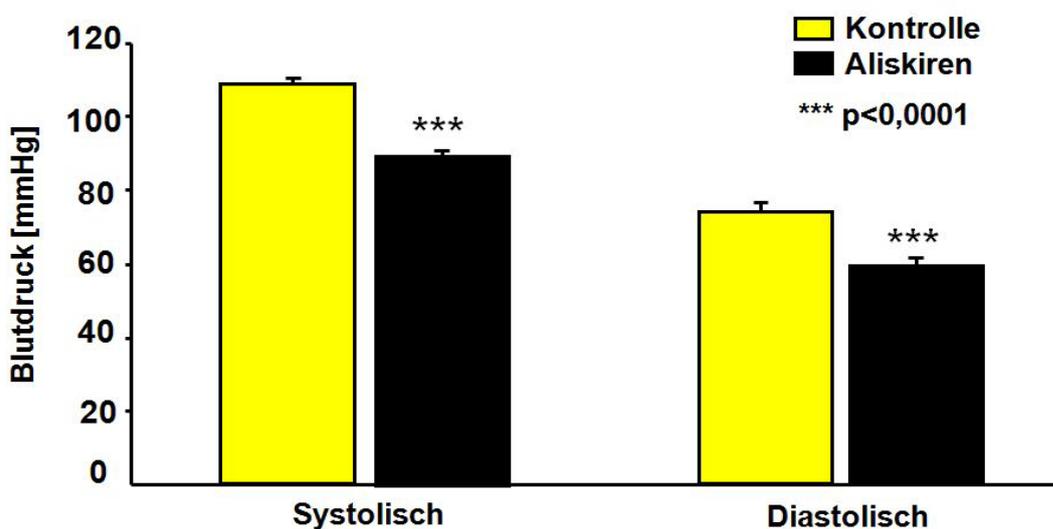


Abbildung 1: Effekt von Aliskiren auf den systolischen und den diastolischen Blutdruck von C57Bl/6 Mäusen (Aliskiren s.c. via Mini-Pumpe 25 mg/kg/Tag, 3 - 8 Wochen)

4.1.2 Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels DiLDL/Lectin-Färbung

Eine etablierte Methode für die Quantifizierung von EPC stellt die DiLDL/Lectin-Färbung dar. Hierzu konnten EPC mit Hilfe einer in-vitro Kultur aus dem Pool mononukleärer Zellen selektiert werden. EPC zeichnen sich einerseits dadurch aus, dass sie DiLDL aufnehmen können, andererseits durch ihre Fähigkeit sich an der Oberfläche mit Lectin anfärben zu lassen. In Mäusen, die mit Aliskiren behandelt wurden, kam es zu einem Anstieg von DiLDL/Lectin doppelt positiven EPC auf $180 \pm 21\%$ von der Kontrolle (n=6 pro Gruppe, $p < 0,05$, Abbildung 2 A+B).

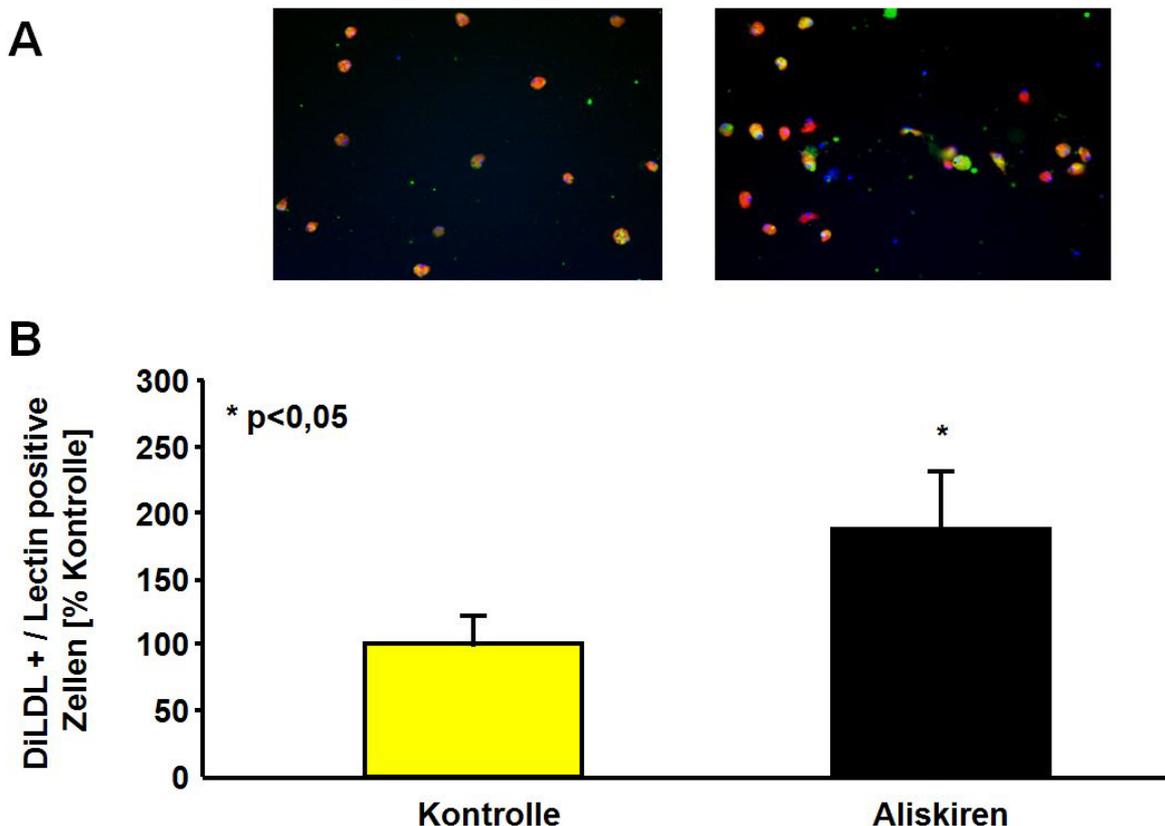


Abbildung 2

Bildteil A: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Abbildungen DiLDL+/Lectin+ endothelialer Progenitorzellen (EPC) aus der Milz unbehandelter und mit Aliskiren (25 mg/kg/Tag) behandelter C57Bl/6 Mäuse (Vergrößerung: 100x). Grün: FITC-Lectin, Rot: DiLDL, Blau: DAPI (Nuclei). Es wurden jeweils drei Gesichtsfelder von jedem Deckglas gezählt.

Bildteil B: Quantifizierung DiLDL+/Lectin+ EPC aus der Milz unbehandelter (Kontrolle) und mit Aliskiren behandelter C57Bl/6 Mäuse. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

4.1.3 Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels FACS-Analyse

Neben der DiLDL/Lectin-Färbung stellt die FACS-Analyse eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung von EPC dar. Dabei wurde die Population der Sca1/VEGFR-2 positiven endothelialen Progenitorzellen untersucht. Die Behandlung mit Aliskiren führte zu einem Anstieg der Anzahl der im Blut zirkulierenden, Sca1/VEGFR-2 positiven EPC auf $159 \pm 14\%$ im Vergleich zu den Kontrolltieren ($n=10$ pro Gruppe, $p<0,005$, Abbildung 3).

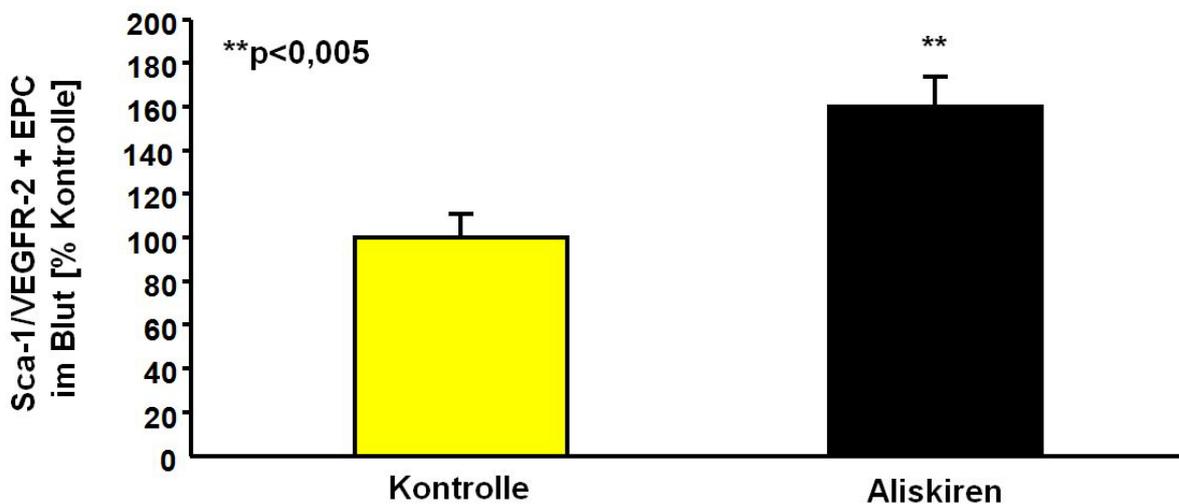


Abbildung 3: Quantifizierung Sca1/VEGFR-2 positiver endothelialer Progenitorzellen (EPC) mittels FACS-Analysen in Proben aus dem peripheren Blut von C57Bl/6 Mäusen, die mit Aliskiren (25 mg/kg/Tag s.c.) behandelt wurden. Im Vergleich dazu Proben aus dem peripheren Blut un behandelter C57Bl/6-Kontrolltiere (Kontrolle). Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

4.1.4 Funktionsbestimmung endothelialer Progenitorzellen durch Migrationsassay

Die Migrationsfähigkeit ist eine wichtige funktionelle Eigenschaft der EPC, die unabhängig von der EPC-Anzahl reguliert sein kann. Durch das Chemokin SDF-1 lässt sich Migrationsfähigkeit induzieren. Diese wurde bei EPC, die aus behandelten Mäusen stammten, unter Zuhilfenahme einer modifizierten Boydenkammer

untersucht. Die Behandlung mit Aliskiren erhöhte die Migrationsfähigkeit von EPC auf $165 \pm 16\%$ ($n=6$ pro Gruppe, $p<0,05$, Abbildung 4).

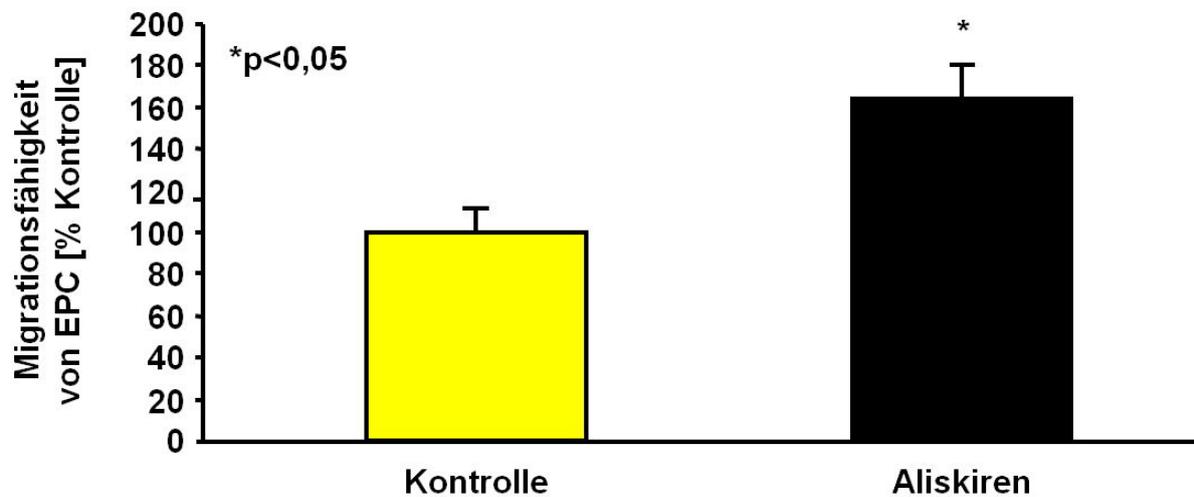


Abbildung 4: Effekt von Aliskiren auf die Migrationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen von C57Bl/6 Mäusen in modifizierten Boyden-Kammern. Dabei wurde SDF-1 (100 ng/ml) als Chemokin benutzt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

4.2 Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten mit humanen endothelialen Progenitorzellen

4.2.1 Funktionsbestimmung endothelialer Progenitorzellen durch Quantifizierung koloniebildender Einheiten und deren Beeinflussung durch Inhibition von eNOS und PI3-Kinase

Die klonale Expansionsfähigkeit in einem endothelspezifischen Medium unter Zellkulturbedingungen, ist ein fundamentales funktionelles Charakteristikum von EPC [23]. In der Kultur humaner EPC führte die Behandlung mit Aliskiren zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Anzahl von koloniebildender Einheiten. Diese koloniebildenden Einheiten stellen das morphologische Korrelat der klonogenen Potenz dar. Der Anstieg erreichte $152 \pm 9\%$ ($1 \mu\text{mol/l}$) beziehungsweise $187 \pm 7\%$ ($10 \mu\text{mol/l}$) von der Kontrolle ($n=6$ pro Gruppe, $p<0,0005$ vs. Kontrolle; Abbildung 5).

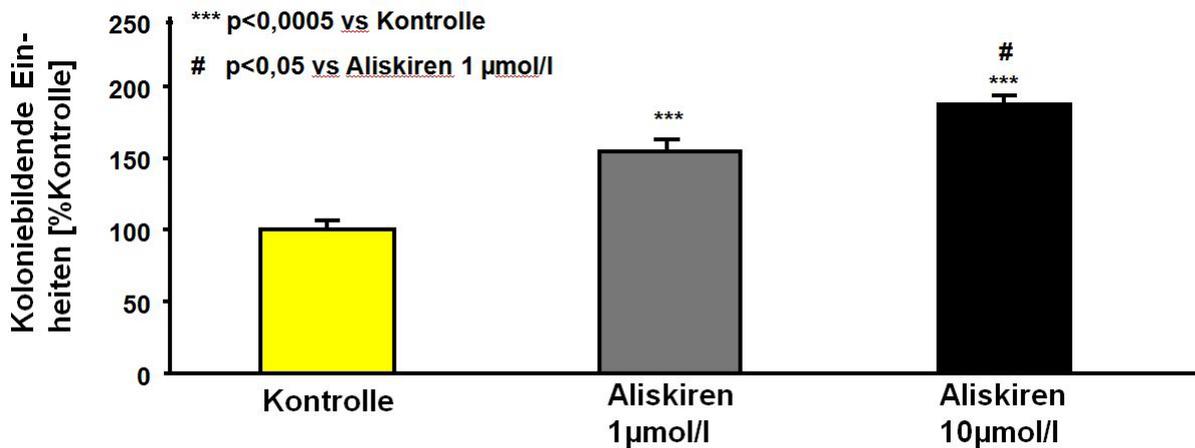


Abbildung 5: Konzentrationsabhängiger Effekt von Aliskiren (1 bzw. 10 µmol/l) auf die Anzahl koloniebildender Einheiten kultivierter humaner EPC, jeweils dargestellt als Mittelwert ± SEM.

Stickstoffmonoxid aus dem Endothel (eNO) ist möglicherweise der prominenteste Regulator der EPC-Funktion [1]. Die beobachtete Hochregulation der Anzahl koloniebildenden Einheiten unter Aliskirenbehandlung war durch Vorbehandlung der Zellen mit dem eNOS-Inhibitor LNMA ($119 \pm 10\%$, $n=8$, $p=ns$ vs. Kontrolle) aufgehoben, wohingegen die Vorbehandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY-294002 den Effekt von Aliskiren auf die Anzahl koloniebildender Einheiten nicht beeinflusste. (Abbildung 6)

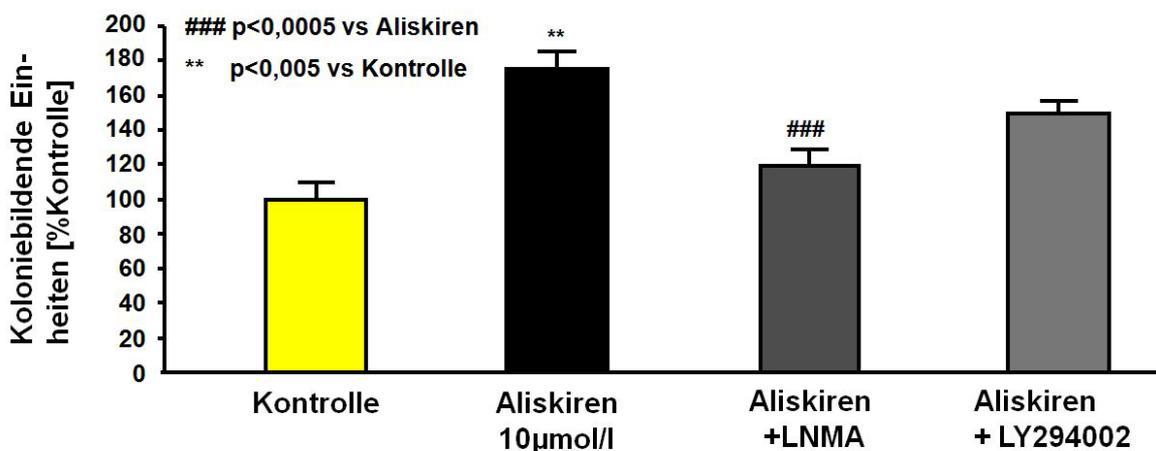


Abbildung 6: Effekt von Aliskiren (10 µmol/l) alleine und in der Anwesenheit des eNOS-Inhibitors LNMA (1 mmol/l) und des PI3kinase-Inhibitors LY294002 (10 µmol/l) auf die Anzahl koloniebildender Einheiten kultivierter humaner EPC, dargestellt als Mittelwert ± SEM.

4.2.2 Ergebnisse aus FACS-Analyse zur Bestimmung der Apoptoserate

In vorhergehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl zirkulierender EPC unter anderem durch deren Apoptoserate bestimmt wird [18,34,86,89]. Daher wurden die Effekte einer Aliskirenbehandlung (10 $\mu\text{mol/l}$, 24 h) auf die Apoptoserate kultivierter humaner EPC in Ab- und Anwesenheit von H_2O_2 (500 $\mu\text{mol/l}$) untersucht. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte mittels Durchführung eines AnnexinV/Propidiumiodid-FACS. Hierbei wurde durch die Behandlung mit Aliskiren eine signifikante Reduktion der durch H_2O_2 induzierten Apoptoserate auf $77 \pm 23\%$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen beobachtet ($n=6$, $p<0,005$, Abbildung 7). Die basale Apoptoserate in Abwesenheit von H_2O_2 hingegen wurde durch Aliskiren nicht beeinflusst.

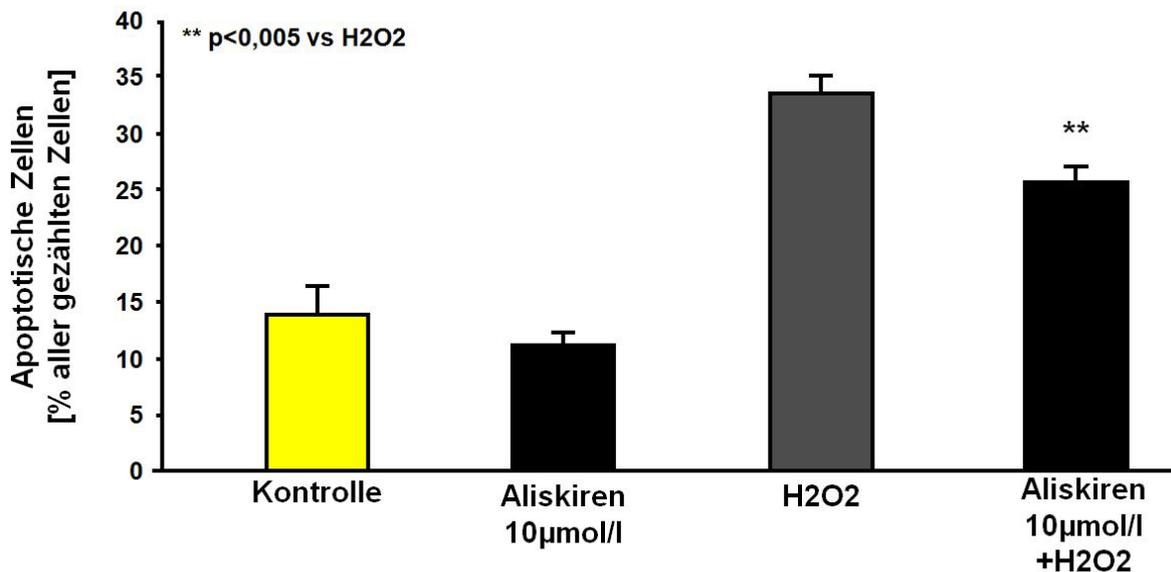


Abbildung 7: Effekt von Aliskiren 10 $\mu\text{mol/l}$ auf die basale und durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2 500 $\mu\text{mol/l}$, 24 h) induzierte Apoptoserate humaner kultivierter EPC, gemessen mittels FACS-Analyse nach Färbung mit Annexin V / Propidiumiodid. Ergebnisse dargestellt als prozentualer Anteil aller gezählten Zellen \pm SEM.

4.2.3 Expressionsnachweis des Proreninrezeptors in proangiogenetischen Zellen

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Aliskiren die Plasmeninkonzentration steigert [38]. Renin ist nicht nur ein Enzym, sondern kann

auch über den (Pro)Reninrezeptor (PRR) direkte zelluläre Effekte vermitteln. Der PRR konnte in endothelialen Zellen identifiziert werden, wohingegen über seine Expression in EPC bislang nichts bekannt war. Mittels Polymerasekettenreaktionen (PCR) sowie Westernblotanalysen konnten wir zeigen, dass humane EPC den PRR exprimieren (Abbildung 8A+B). Die ergänzend durchgeführte immunzytochemische Färbung zeigt die PRR-Expression sowohl auf der Plasmamembran, als auch im zytosolischen Kompartiment (Abbildung 8C). Überdies wird der PRR im murinen Knochenmark exprimiert (Abbildung 8A).

A

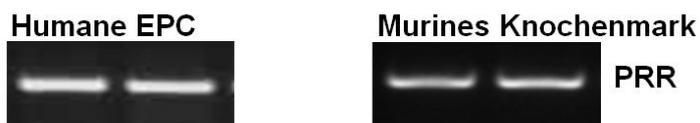


Abbildung 8A: mRNA-Expression des (Pro)Renin-Rezeptors (PRR) - PCR-Analyse des (Pro)Renin-Rezeptors in kultivierten humanen EPC und im Knochenmark von C57Bl/6 Mäusen.

B



Abbildung 8B: Proteinexpression des (Pro)Renin-Rezeptors (PRR) in kultivierten humanen EPC (Western-Blot-Analyse)

C

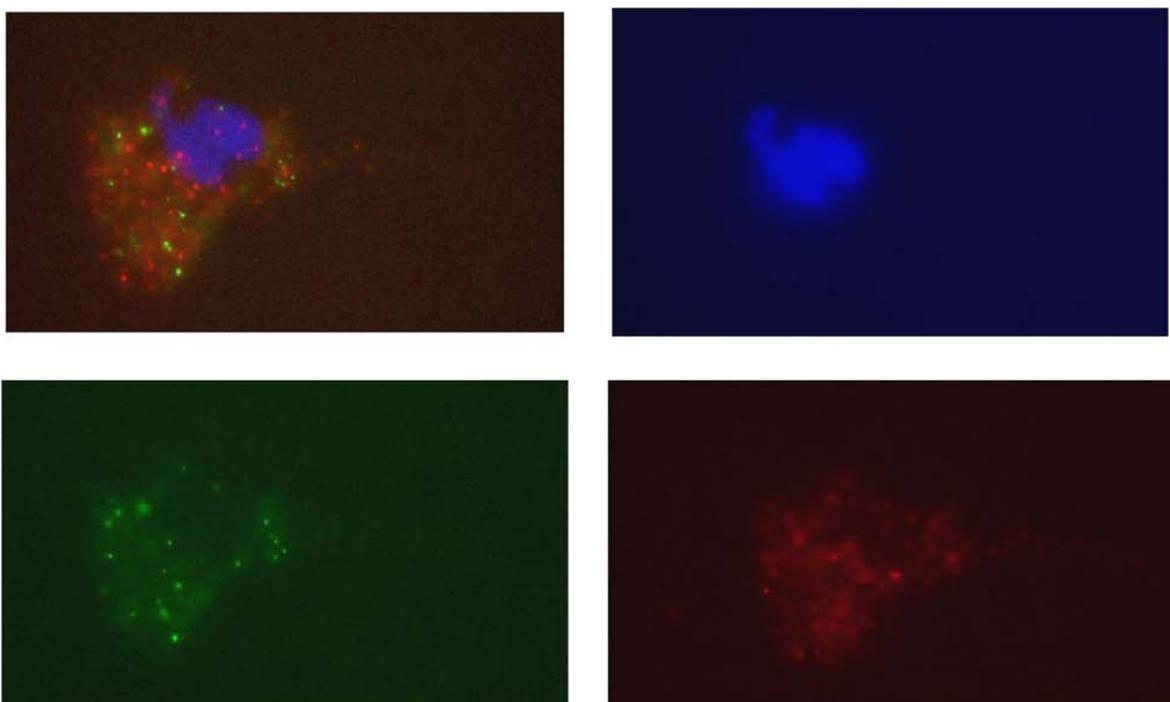


Abbildung 8C: Expression des (Pro)Renin-Rezeptors (PRR) – immunzytochemische Analysen des (Pro)Renin-Rezeptors in kultivierten humanen EPC; blau (DAPI): Nuclei, grün (FITC): (Pro)Renin-Rezeptor; rot (DiLDL)

4.2.4 Effekt von Aliskiren, Renin und einer Hemmung von ERK auf die Migrationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen

Aliskiren steigerte die Migrationsfähigkeit von kultivierten EPC auf $180 \pm 17\%$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ($n=8$, $p<0,0005$). Die Behandlung von EPC mit Renin (10 nmol/l) führte ebenso zu einem Anstieg der EPC-Migration (auf $157 \pm 16\%$, $n=8$, $p<0,0005$). Die Aktivierung der extrazellulär-signal-regulierten Kinase (ERK) ist ein Schlüsselsignaltransduktionsweg downstream des PRR [79]. Der Anstieg des migratorischen Potentials von EPC, der sowohl durch die Behandlung mit Aliskiren als auch mit Renin beobachtet wurde, wurde durch Zugabe des ERK-Inhibitors PD 98059 vollständig aufgehoben ($n=6$, $p=ns$ vs. Kontrolle, Abbildung 9).

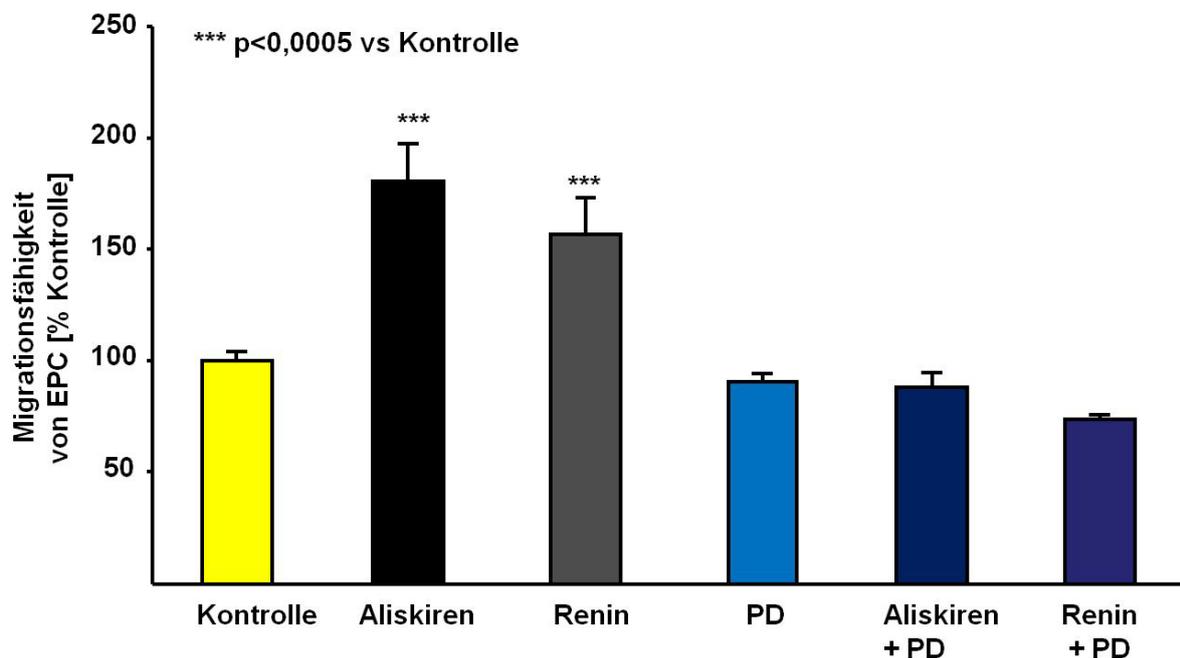


Abbildung 9: Effekt von Aliskiren, Renin und dem ERK-Inhibitor PD98059 auf die Migrationsfähigkeit kultivierter humaner EPC. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

4.3 Ergebnisse der Behandlung von ApoE^{-/-} Mäusen mit Aliskiren

4.3.1 Auswirkungen auf den systolischen und diastolischen Blutdruck

Eine verbesserte Funktion und erhöhte Anzahl von EPC ist mit positiven Effekten auf die Atherogenese assoziiert [54,65]. Um die Effekte der Renininhibition auf die Atherogenese zu untersuchen, wurden ApoE^{-/-} Mäuse mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert und zusätzlich für sechs Wochen mit Aliskiren (25 mg/kg/d) oder Plazebo behandelt. Analog zu der Behandlung von C57Bl/6-Mäusen führte die Aliskirenbehandlung auch in diesem Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion des systolischen Blutdrucks um $14,2 \pm 2,2$ % (-14 ± 2 mmHg, $p < 0,0005$ vs. ApoE^{-/-} Kontrollmäuse, Abbildung 10).

In einer Kontrollgruppe wurden ApoE^{-/-} Mäuse mit dem Vasodilatator Hydralazin (25 mg/kg/d) behandelt. Die Behandlung mit Hydralazin führte zu einer vergleichbaren Blutdrucksenkung wie die Behandlung mit dem direkten Reninhemmer ($-15,6 \pm 1,5$ %; $p < 0,0005$ vs. ApoE^{-/-} Kontrollmäuse, $p = 0,7$ vs. Aliskiren, Abbildung 10).

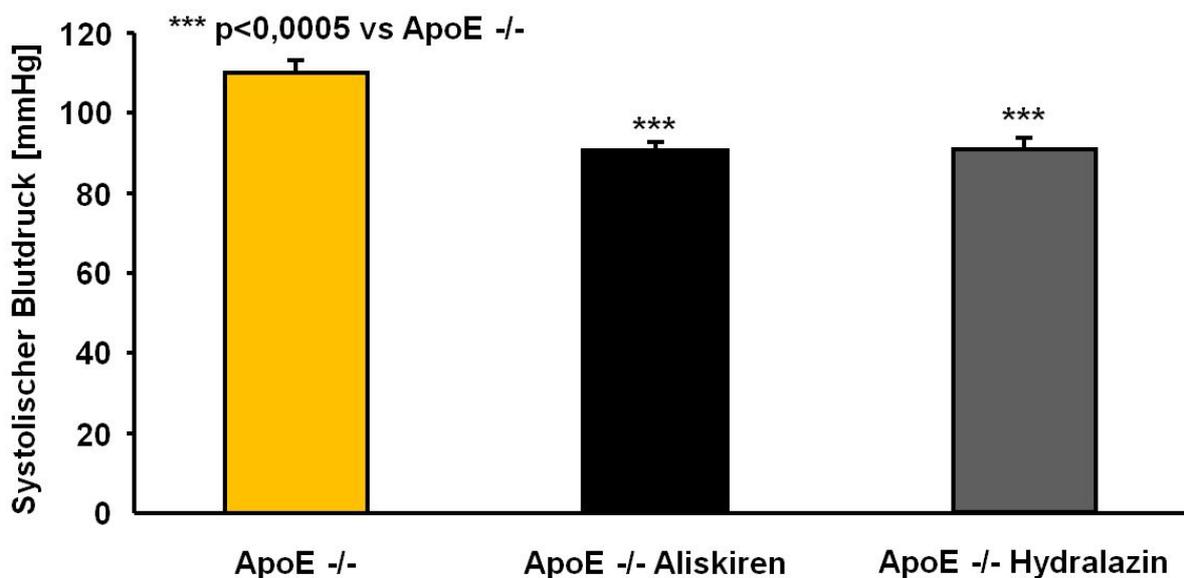


Abbildung 10: Effekt von Aliskiren (25 mg/kg/d s.c.) oder Hydralazin (25 mg/kg/Tag) auf den systolischen Blutdruck in ApoE^{-/-} Mäusen.

4.3.2 Effekt von Aliskiren auf atherosklerotische Läsionen

Die Atherogenese wurde quantifiziert durch histomorphometrische Analysen von atherosklerotischen Läsionen, die in Höhe des aortalen Sinus betrachtet wurden. Erwartungsgemäß induzierte die cholesterinreiche Diät bei den ApoE^{-/-} Mäusen eine deutliche Atherosklerose. Die Aliskirenbehandlung reduzierte die atherosklerotische Plaquefläche um $58 \pm 4\%$ (verglichen zu ApoE^{-/-}-Kontrollmäusen n=4 oder 7 pro Gruppe, $p < 0,005$, Abbildung 11). Trotz eines vergleichbar blutdrucksenkenden Effekts führt die Behandlung mit Hydralazin nicht zu einer signifikanten Reduktion atherosklerotischer Läsionen.

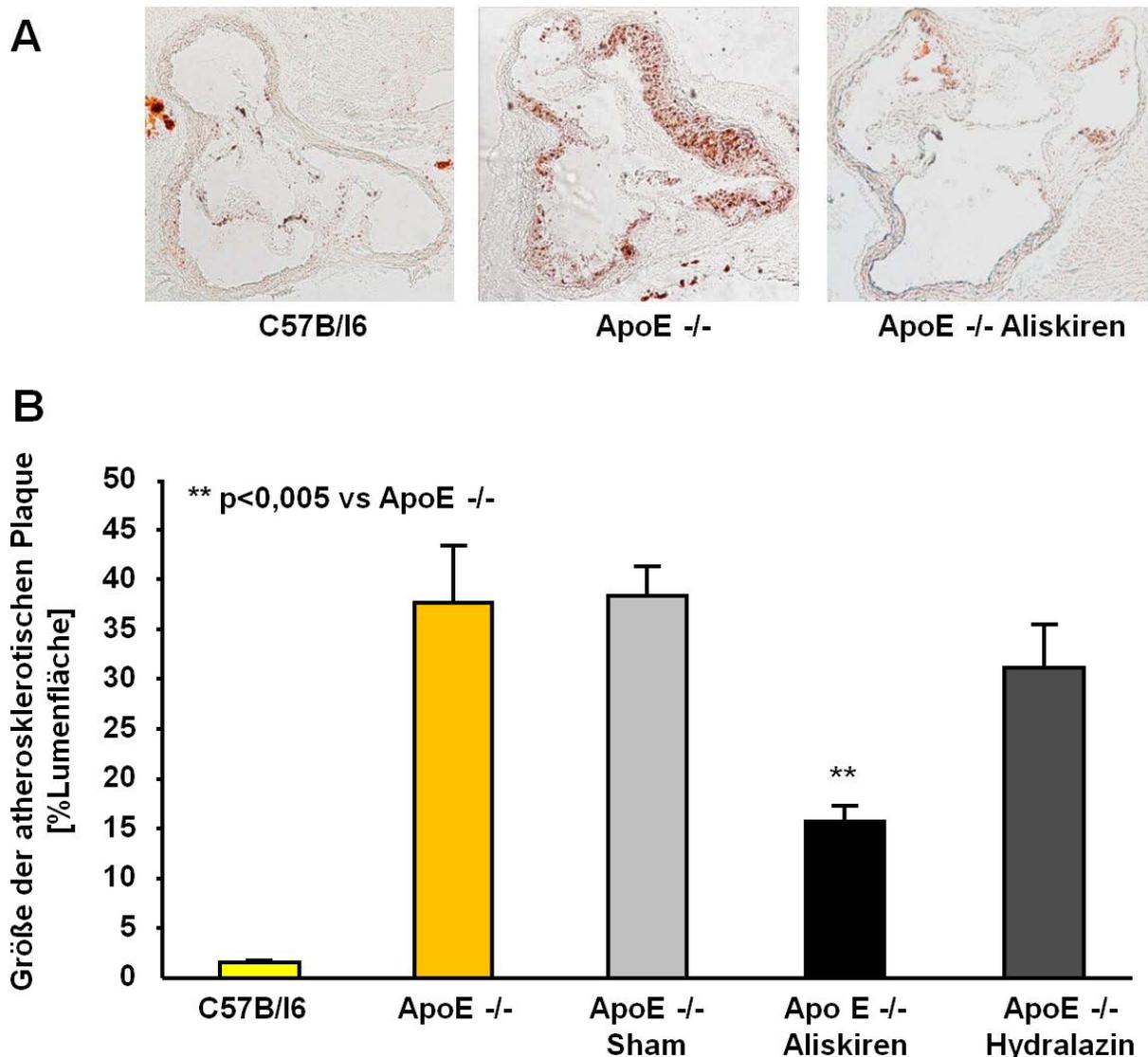


Abbildung 11: Effekt von Aliskiren und Hydralazin auf atherosklerotische Läsionen.

Bildteil A: Repräsentative Schnitte in Höhe des Aortensinus, atherosklerotische Plaques gefärbt mittels Ölrot O-Färbung

Bildteil B: Histomorphometrische Analysen der Plaque-Areale im Bereich des Aortensinus von C57Bl/6-Mäusen, ApoE^{-/-} Mäusen und ApoE^{-/-} Mäusen, die mit Aliskiren oder Hydralazin behandelt wurden. (Plaquesflächen dargestellt als prozentualer Anteil von der Fläche des Gesamtlumens)

4.3.3 Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels FACS-Analyse

Die beobachtete Reduktion der Atherosklerose war in den untersuchten ApoE^{-/-} Mäusen mit einem Anstieg der Anzahl zirkulierender Sca-1/VEGFR-2 positiver EPC verbunden, was mittels FACS Analyse ermittelt wurde. Hierbei kam es zu einem Anstieg auf $180 \pm 25\%$ im Vergleich zur Placebogruppe (Kontrollgruppe, Behandlung mit Lösungsmittel) ($n=6$ pro Gruppe, $p<0,05$, Abbildung 12). Die Behandlung mit Hydralazin hingegen führte zu keiner Beeinflussung der Anzahl Sca-1/VEGFR-2 positiver EPC ($n=3$).

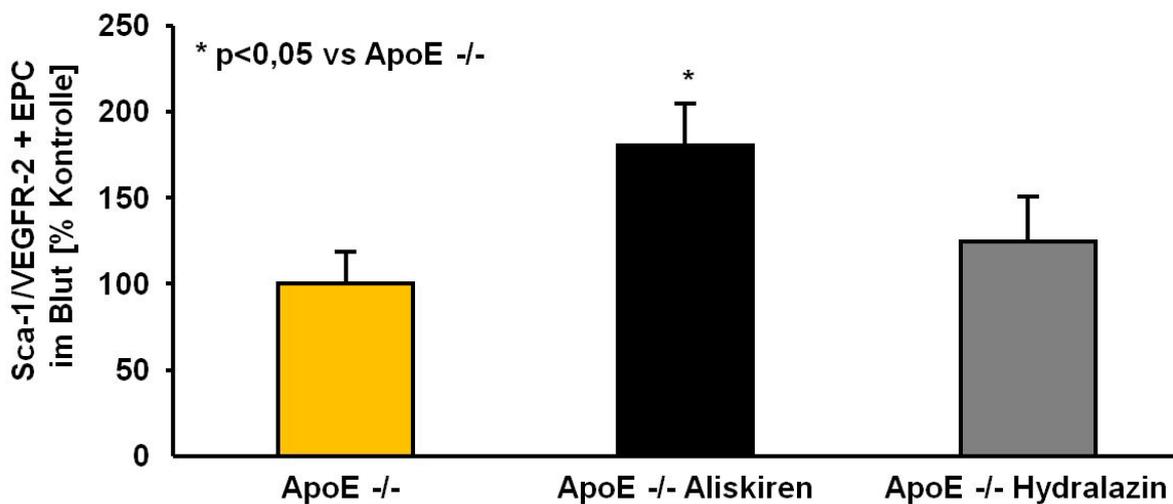


Abbildung 12: Quantifizierung Sca-1/VEGFR-2 positiver EPC mittels FACS-Analysen aus dem peripheren Blut von unbehandelten ApoE^{-/-} Mäusen und von ApoE^{-/-} Mäusen, die mit Aliskiren (25 mg/kg/Tag s.c.) oder Hydralazin (25 mg/kg/Tag) behandelt wurden. Die Anzahl ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

4.3.4 Funktionsbestimmung endothelialer Progenitorzellen durch Migrationsassay

In der mit Aliskiren behandelten Gruppe kam es zu einem Anstieg der SDF-1 induzierten Migrationskapazität von EPC auf $127 \pm 7\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=6 pro Gruppe, $p < 0,05$, Abbildung 13).

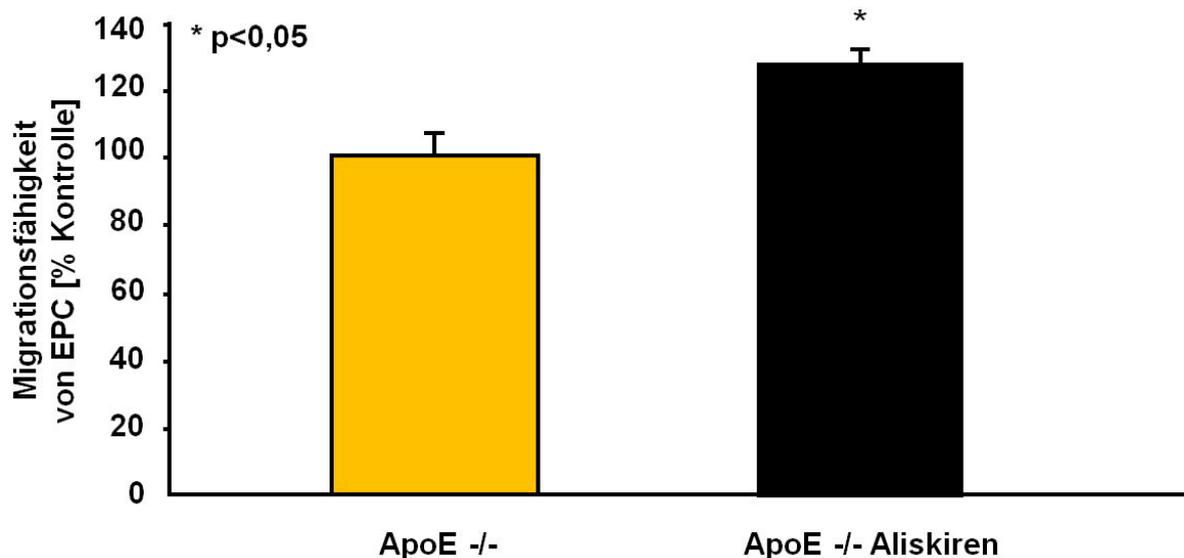


Abbildung 13: Effekt von Aliskiren auf die Migrationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen von ApoE-/- Mäusen. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

4.3.5 Einfluss von Aliskiren auf vaskulären oxidativen Stress

Die NADPH-Oxidase ist eine der Hauptquellen für vaskulären oxidativen Stress [55]. Dieses Enzym katalysiert biochemische Reaktionen, die zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen. Diese ROS wiederum schädigen die Funktion sowohl von reifen, wie auch von unreifen Endothelzellen [1,26,77]. Die Behandlung mit Aliskiren reduzierte die basale NADPH-Oxidase-Aktivität im Aortengewebe auf $41,6 \pm 6,7\%$ der Kontrolle ($p < 0,05$, Abbildung 14).

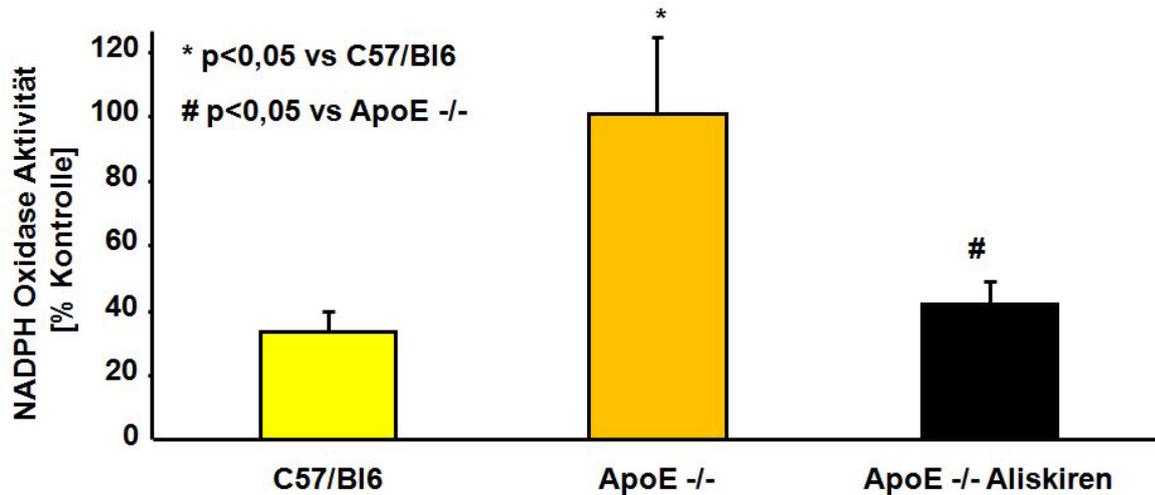


Abbildung 14: NADPH-Oxidase-Aktivität gemessen mittels eines Lucigenin-gestützten Chemilumineszenz-Assays in C57BI/6 Wildtyp-Mäusen, ApoE-/- Mäusen und ApoE-/- Mäusen nach Behandlung mit Aliskiren.

4.4 Ergebnisse der Behandlung von C57BI/6-Mäusen mit Aliskiren in nicht blutdruckrelevanter Dosierung („low dose“)

4.4.1 Auswirkungen auf den systolischen und diastolischen Blutdruck

Um die Bedeutung der Blutdrucksenkung für die Effekte von Aliskiren auf EPC-Anzahl und -funktion zu ermitteln, wurden C57BI/6-Mäuse mit Aliskiren in einer niedrigeren Dosis behandelt (15 mg/kg/d). Dies führte zu keiner signifikanten Beeinflussung des Blutdruckes, weder systolischen noch diastolisch (systolischer / diastolischer Blutdruck 108 ± 2 / $81,7 \pm 2$ mmHg in der Kontrollgruppe vs. $103,2 \pm 2$ / 76 ± 2 mmHg in der Behandlungsgruppe; Abbildung 15).

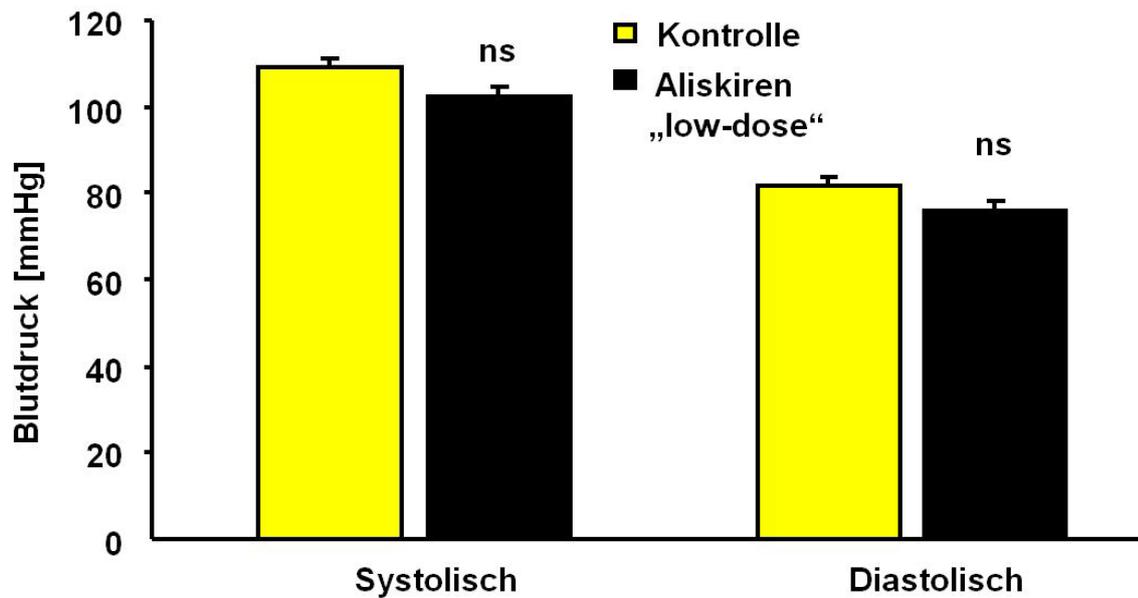


Abbildung 15: Blutdruckwerte von C57Bl/6 Kontroll-Mäusen und C57Bl/6 Mäusen, die mit Aliskiren in einer nicht Blutdruck-relevanten Dosierung (15 mg/kg/d s.c.) behandelt wurden.

4.4.2 Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels DiLDL/Lectin-Färbung

In Tieren, die mit Aliskiren in niedriger Dosierung behandelt wurden, kam es zu einem Anstieg der DiLDL/Lectin doppelt positiven EPC auf $229 \pm 30\%$ ($n=6$ pro Gruppe, $p<0,05$; Abbildung 16).

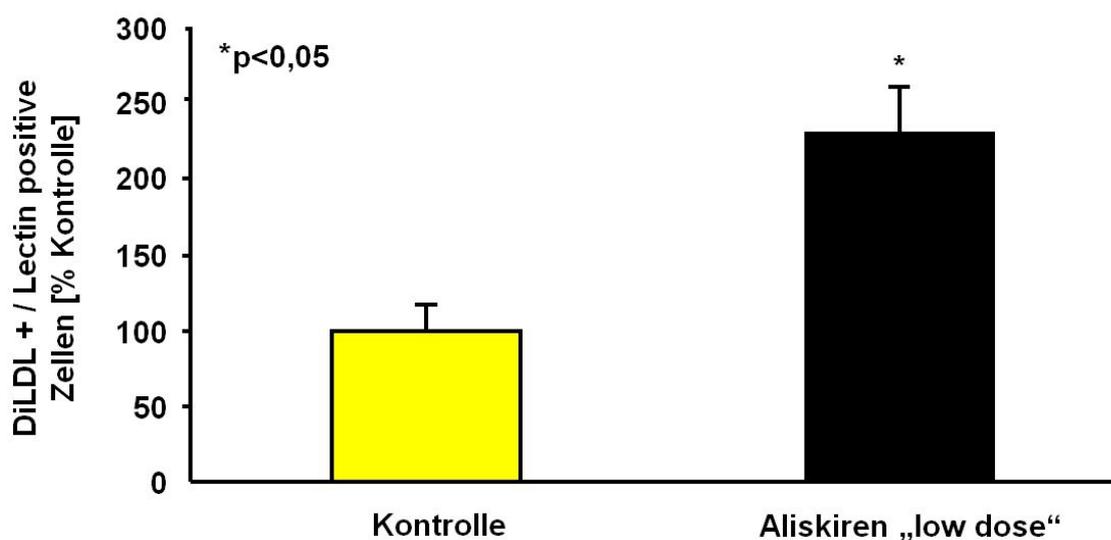


Abbildung 16: DiLDL+/Lectin+ EPC aus der Milz von unbehandelten C57Bl/6 Mäusen und C57Bl/6 Mäusen, die mit Aliskiren in nicht Blutdruckrelevanter Dosierung (15 mg/kg/d s.c.) behandelt wurden; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

4.4.3 Funktionsbestimmung endothelialer Progenitorzellen durch Migrationsassay

Auch die Migrationsfähigkeit kultivierter EPC wurde durch die „low-dose“-Aliskiren-Behandlung gesteigert auf $214 \pm 24\%$ von der Kontrolle (n=6 pro Gruppe, $p < 0,005$, Abbildung 17).

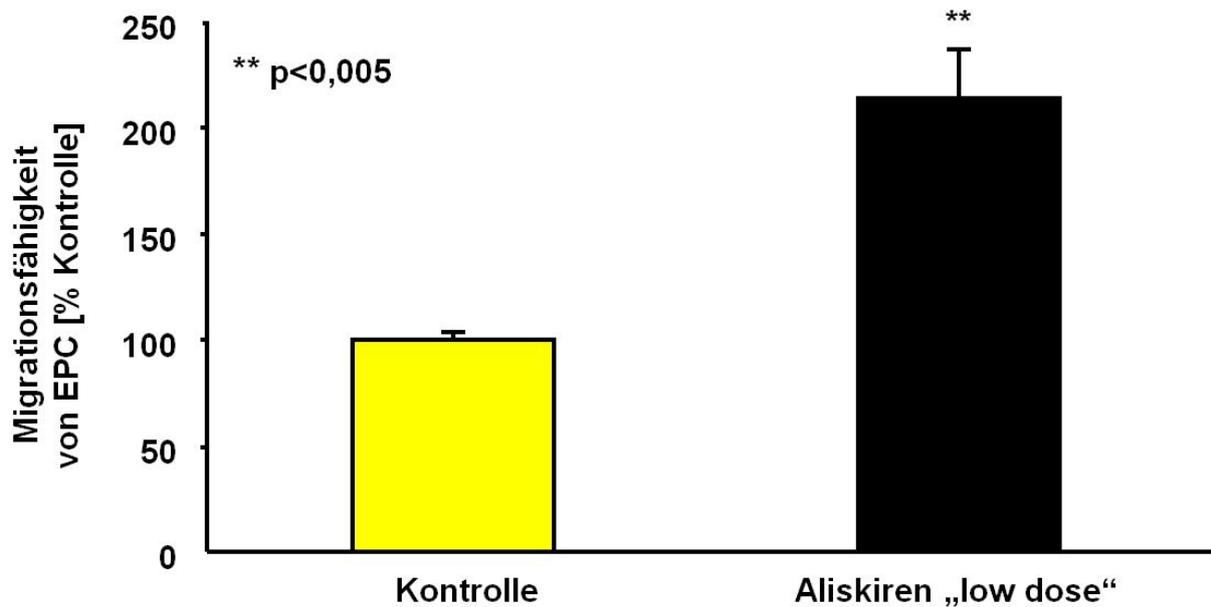


Abbildung 17: Migrationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen von C57Bl/6 Mäusen, die mit Aliskiren in nicht Blutdruck-relevanter Dosierung behandelt wurden. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

5. Diskussion

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) stellen einen Prädiktor für das Outcome von Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen dar. Eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems (RAAS) schädigt EPC. Bislang ist bekannt, dass eine Hemmung dieses Systems mittels Hemmern des Angiotensin-Converting-Enzymes (ACE-Hemmer) und Angiotensin-Rezeptor-Blockern (ARB) zu einer Verbesserung der Anzahl und Funktion von EPC führt [42,53,76,82,92,94]. Bislang wurde jedoch nicht untersucht, welche Auswirkung eine Hemmung von Renin auf EPC hat. Um diese Frage zu klären, steht seit einiger Zeit nun der direkte Renininhibitor Aliskiren zur Verfügung.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Behandlung mit dem direkten Renininhibitor Aliskiren sowohl in C57Bl/6 als auch in ApoE^{-/-} Mäusen zu einer Erhöhung der Anzahl und zu einer Verbesserung der Funktion endothelialer Progenitorzellen führt. In ApoE^{-/-} Mäusen war dies außerdem mit einer Verringerung der atherosklerotischen Plaquelast, sowie einer Reduktion von oxidativem Stress assoziiert. Die Effekte auf EPC und die Atherogenese wurden in Mäusen, die mit dem direkten Vasodilatator Hydralazin behandelt wurden, nicht beobachtet. Interessanter Weise konnten die Effekte auf EPC auch nach Applikation einer niedrigeren Aliskirendosis induziert werden, welche keine signifikante blutdrucksenkende Wirkung zeigte.

Wie auch in vorausgehenden Untersuchungen wurden EPC durch die Expression der Marker Sca-1 und VEGFR-2 charakterisiert [63,70]. Vermutlich fasst diese Zellpopulation verschiedene Untergruppen funktionell unterschiedlicher Zellen zusammen. Dennoch haben wir uns dazu entschieden, Sca-1/VEGFR-2 doppelpositive Zellen zu untersuchen, weil genau für diese Zellpopulation klar gezeigt worden ist, dass sie prädiktiv für das Outcome von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen sind [87], wohingegen die prognostische Bedeutung anderer EPC-Populationen nicht bekannt ist. Eine weitere, unabhängige Methode zur Charakterisierung von EPC ist die DiLDL/Lectin-Färbung. Hierzu werden

mononukleäre Zellen aus der Milz kultiviert. EPC lassen sich dabei durch die Fähigkeit zur Adhäsion auf Fibronectin charakterisieren, sowie dadurch, dass sie in der Lage sind, diacetyliertes LDL aufzunehmen und sich mit Lectin anfärben zu lassen [2,23]. Mittels beider Methoden wurde bei C57Bl/6 Mäusen durch die Behandlung mit dem direkten Reninhemmer Aliskiren ein deutlicher Anstieg der EPC nachgewiesen. Ein starker Anstieg der EPC-Anzahl wurde ebenso in ApoE^{-/-}-Mäusen beobachtet, welche mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert wurden, was ein gut charakterisiertes vaskuläres Schadensmodell darstellt. Zusätzlich zur Anzahl von EPC beeinflussen auch deren funktionelle Eigenschaften die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen [23,87]. Besonders gut untersuchte funktionelle Eigenschaften von EPC sind deren Fähigkeit zur Migration und ihre klonogene Potenz. Diese beiden Charakteristika spielen eine wichtige Rolle bei der Verbesserung der endothelialen Funktion, der Neoangiogenese und der Hemmung der Atherogenese [15,26,27,30-33,35,60,61,64,81]. In den durchgeführten Experimenten steigerte die Behandlung mit Aliskiren die migratorische Fähigkeit von EPC in C57Bl/6- sowie auch in ApoE^{-/-} Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl koloniebildender Einheiten, einem Parameter für die klonogene Potenz der EPC, mit dem kumulativen kardiovaskulären Risiko korrelieren [23]. Die ex-vivo-Behandlung mit Aliskiren erhöhte dosisabhängig die Fähigkeit kultivierter humaner EPC zur Ausbildung koloniebildender Einheiten. Die Behandlung mit dem eNOS-Inhibitor LNMA konnte die Hochregulation der Anzahl koloniebildenden Einheiten zumindest teilweise aufheben. Dies unterstützt die Bedeutung der eNOS für die Effekte von Aliskiren auf EPC. In kultivierten humanen EPC reduzierte Aliskiren den H₂O₂-induzierten apoptotischen Zelltod. Die Reduktion der Apoptoserate stellt möglicherweise einen potentiellen Mechanismus zur Hochregulation zirkulierender EPC dar. Zusammenfassend legen die Daten den Schluss nahe, dass der vorteilhafte Effekt von Aliskiren auf EPC möglicherweise größer ausfällt, als nur durch den reinen Anstieg der Anzahl der EPC zu vermuten wäre.

Für ACE-Hemmer und ARB wurde bereits gezeigt, dass diese zu einer Hochregulation der Anzahl und zu einer Verbesserung der Funktionsfähigkeit von EPC in Tiermodellen führen können [42,53,76,82,92,94]. ACE-Hemmer und ARB reduzieren oxidativen Stress in Zellen aus dem Knochenmark [2,92,93] und führen ferner zu einer Verbesserung der Funktion von EPC bei Patienten mit

kardiovaskulären Erkrankungen [4,41]. Vergleichende Studien von ACE-Hemmern und ARB hinsichtlich der Effekte auf die Anzahl und die Funktionsfähigkeit von EPC liegen jedoch nicht vor. Die vorliegende Arbeit ist die erste Untersuchung, welche die Effekte einer direkten Renininhibition mittels Aliskiren auf EPC analysiert. Die Behandlung mit Aliskiren erhöhte die Anzahl von EPC, verbesserte deren Proliferations- und Migrationsfähigkeit in zwei verschiedenen Mausmodellen. Überdies verbesserte sie auch die Funktion kultivierter humaner EPC. Aliskiren unterscheidet sich deutlich hinsichtlich des Mechanismus von ACE-Hemmern und ARB, denn die RAAS-Hemmung setzt weiter proximal ein, nämlich beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des RAAS. Außerdem steigt die Plasmaninkonzentration unter Aliskiren-Behandlung stärker an als unter Behandlung mit ACE-Hemmern und ARB [10]. Renin wiederum kann über den (Pro)Reninrezeptor (PRR) direkte zelluläre Effekte ausüben [45]. Unsere Daten zeigen, dass der PRR von EPC und im Knochenmark exprimiert wird. Die biologische Bedeutung einer potenziell gesteigerten PRR-Stimulation, unter der aliskireninduzierten Steigerung der Plasmaninkonzentration, ist jedoch noch unklar. Auch zur vollständigen Charakterisierung der qualitativen und mechanistischen Unterschiede der drei RAAS-hemmenden Substanzen hinsichtlich deren Wirkung auf EPC sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die beschriebenen Ergebnisse der Experimente an kultivierten humanen EPC deuten auf das Vorhandensein eines zellulären RAAS hin, welchem auch eine funktionelle Bedeutung zukommt. Dieses zelleigene RAAS kann durch Aliskiren gehemmt werden. Für die Aliskirenbehandlung ist ein deutlicher Anstieg der Plasmaninkonzentration bekannt [10,38]. Dies kann relevant sein, da Renin möglicherweise über den Proreninrezeptor direkte zelluläre Effekte vermittelt. Dies wird unterstützt durch den Nachweis des PRR in EPC. In kultivierten humanen EPC wurde die Migrationsfähigkeit sowohl durch Aliskiren als auch durch Renin verbessert. Beide Effekte konnten durch die Hemmung der extrazellulär-signal-regulierten Kinase (ERK) aufgehoben werden. ERK ist bekannt als ein wichtiges downstreamtarget der PRR-Signalkaskade. Diese Experimente legen den Schluss nahe, dass die Effekte von Aliskiren auf kultivierte humane EPC teilweise über eine Hochregulation von Renin und konsekutiver Stimulation des PRR erklärbar sein könnten. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen,

die gezeigt haben, dass Prorenin zu einer signifikanten Hochregulation der Migrationsfähigkeit endothelialer Zellen führt und dass diese Effekte durch Inhibition der MAPK/ERK aufgehoben werden können [79].

Die vermehrte Bildung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie zum Beispiel Superoxidradikalen, stellt eines der Schlüsselereignisse in der Pathogenese der Atherosklerose dar [21]. Untersuchungen intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies haben gezeigt, dass es zu einer Schädigung der Funktionsfähigkeit sowohl reifer als auch unreifer Endothelzellen kommt. Dies geschieht unter anderem durch Stimulation proapoptotischer Mechanismen [1,26,77]. Die vaskuläre NADPH-Oxidase ist eine bedeutende Quelle für endothelialen oxidativen Stress [55]. Die Behandlung mit Aliskiren führte in den beschriebenen Experimenten zu einer starken Hemmung der vaskulären NADPH-Oxidase-Aktivität. Dieser könnte ein Mechanismus sein, der zu den beobachteten vorteilhaften Effekten von Aliskiren auf die Atherogenese sowie die EPC beiträgt.

In ApoE^{-/-} Mäusen, die mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert wurden, war die Hochregulation von EPC mit einer deutlichen Reduktion der atherosklerotischen Plaquelast assoziiert. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit vorausgehenden Untersuchungen [27,38,47]. In einer Kontrollgruppe wurden ApoE^{-/-} Mäuse mit Hydralazin behandelt. Trotz einer mit der Aliskirenbehandlung vergleichbaren Senkung des systolischen sowie des diastolischen Blutdruckes hatte Hydralazin keinen Einfluss auf die Anzahl und Funktion der EPC sowie auf das Ausmaß atherosklerotischer Läsionen. Interessanterweise konnte der Anstieg der Anzahl und die Verbesserung der Funktion von EPC auch in C57Bl/6-Mäusen beobachtet werden, die mit einer Aliskirendosis behandelt wurden, welche keine signifikante Blutdrucksenkung zu verursachte. In Zusammenschau legen diese Daten den Schluss nahe, dass die Effekte von Aliskiren auf EPC möglicherweise teilweise unabhängig von einer Blutdrucksenkung auftreten. Diese Hypothese wird unterstützt durch die in-vitro-Experimente, welche einen direkten Effekt von Aliskiren auf die Expansionsfähigkeit und die Apoptose kultivierter EPC gezeigt haben. Vorausgehende Studien zeigen einen direkten Effekt von Angiotensin II und Angiotensin (1-7) auf isolierte EPC, was diese Hypothese ebenfalls unterstützt

[26,33]. Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um die zugrundeliegenden Mechanismen vollständig aufzudecken.

Schlussfolgerung: Bluthochdruck ist ein bedeutender kardiovaskulärer Risikofaktor. EPC sind unabhängige Prädiktoren kardiovaskulärer Mortalität [17,47,77]. Die Anzahl und die Funktionsfähigkeit von EPC zeigen eine inverse Korrelation mit dem Auftreten klassischer kardiovaskulärer Riskofaktoren [80]. Unsere Daten deuten an, dass eine direkte Renininhibition bei hypertensiven Patienten neben einer Blutdrucksenkung durch Hochregulation der EPC einen ergänzenden klinischen Benefit erzielen könnte. Die Effekte von Aliskiren auf EPC, die in Abwesenheit einer Blutdrucksenkung beobachtet wurden, führen zu der interessanten Hypothese, dass Aliskiren bei kardiovaskulären Risikopatienten möglicherweise positive Effekte zeigen könnte, welche eventuell sogar unabhängig von einer Blutdrucksenkung auftreten könnten. Selbstverständlich ist eine solche Hypothese mit prospektiven klinischen Studienergebnissen zu untermauern.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9:1370-1376
2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967
3. Badimon L, Vilahur G., LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Apr;1254(1):18-32.
4. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D (2005) Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 45:526-529
5. Batenburg WW, Danser AJ. Prorenin and the (pro)renin receptor: binding kinetics, signalling and interaction with aliskiren. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2008 Sep;9(3):181-4.
6. Batenburg WW, Jan Danser AH., The (pro)renin receptor: a new addition to the renin-angiotensin system?, *Eur J Pharmacol.* 2008 May 13;585(2-3):320-4.
7. Brown L, Serania C. Angiotensin receptors in cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1994;21:811-8
8. Böcker W., Denk H., Heitz P.U., Moch H., Pathologie, 4. Auflage 2008, Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, München
9. Cacciatore F, Bruzzese G, Vitale DF, Liguori A, de Nigris F, Fiorito C, Infante T, Donatelli F, Minucci PB, Ignarro LJ, Napoli C. Effects of ACE inhibition on circulating endothelial progenitor cells, vascular damage, and oxidative stress in hypertensive patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011 Sep;67(9):877-83.
10. Campbell DJ (2008) Interpretation of plasma renin concentration in patients receiving aliskiren therapy. *Hypertension* 51:15-18
11. Consensus-Trial-Study-Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med.* 1987;316:1429-35

12. Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*. 1977;16:5484-91
13. Danser AH., (Pro)renin receptor and vacuolar H⁺-ATPase., *Hypertension*. 2009 Aug;54(2):219-21.
14. Danser AH. The increase in renin during renin inhibition: does it result in harmful effects by the (pro)renin receptor? *Hypertens Res*. 2010 Jan;33(1):4-10.
15. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM (2001) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 108:391-397
16. Endtmann C, Ebrahimian T, Czech T, Arfa O, Laufs U, Fritz M, Wassmann K, Werner N, Petoumenos V, Nickenig G, Wassmann S. ,2011 Aug 8., Angiotensin II impairs endothelial progenitor cell number and function in vitro and in vivo: implications for vascular regeneration. *Hypertension*. 2011 Sep;58(3):394-403.
17. Friedrich EB, Werner C, Walenta K, Bohm M, Scheller B (2009) Role of extracellular signal-regulated kinase for endothelial progenitor cell dysfunction in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 104:613-620
18. Gensch C, Clever YP, Werner C, Hanhoun M, Bohm M, Laufs U (2007) The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 192:67-74 in Gensch C, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, 2007
19. Grandman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation*. 2005;111,1012-1018
20. Granger CB, Mc Murray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Pfeffer MA, Swedberg K. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet*. 2003;362:772-6
21. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91:7A-11A
22. Herold G. et al., *Innere Medizin* 2012, 2012, Verlag: Gerd Herold, Köln
23. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600

24. Hoppe et al., Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem – von der Pathophysiologie zu Therapiemöglichkeiten, 1.Auflage 2010, UNI-MED Verlag AG, Bremen
25. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC Jr, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American College of Chest Physicians; International Society for Heart and Lung Transplantation; Heart Rhythm Society. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005 Sep 20;112(12):e154-235.
26. Imanishi T, Hano T, Nishio I (2005) Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens* 23:97-104
27. Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Kitabata H, Tanimoto T, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T (2008) Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertension* 52:563-572
28. Jakus V, Rietbrock N (2004) Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol Res* 53:131–142
29. Jiqian Huang and Helmy M. Siragy, Regulation of (Pro)Renin Receptor Expression by Glucose-Induced, Mitogen-Activated Protein Kinase, Nuclear Factor- κ B, and Activator Protein-1 Signaling Pathways, *Endocrinology* 2010 151:3317-3325
30. Kaur S, Kumar TR, Uruno A, Sugawara A, Jayakumar K, Kartha CC (2009) Genetic engineering with endothelial nitric oxide synthase improves functional properties of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease: an in vitro study. *Basic Res Cardiol* 104:739-749
31. Keymel S, Kalka C, Rassaf T, Yeghiazarians Y, Kelm M, Heiss C (2008) Impaired endothelial progenitor cell function predicts age-dependent carotid intimal thickening. *Basic Res Cardiol* 103:582-586

32. Kleinbongard P, Weber AA (2008) Impaired interaction between platelets and endothelial progenitor cells in diabetic patients. *Basic Res Cardiol* 103:569-571
33. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Bohm M, Kindermann W, Nickenig G (2005) Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12:407-414
34. Laufs U, Wassmann S, Czech T, Munzel T, Eisenhauer M, Bohm M, Nickenig G (2005) Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:809-814
35. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004 Jan 20;109(2):220-6
36. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, *Biochemie und Pathobiochemie*, 8.Auflage 2007, Springer Medizin Verlag Heidelberg
37. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75
38. Lu H, Rateri DL, Feldman DL, Jr RJ, Fukamizu A, Ishida J, Oesterling EG, Cassis LA, Daugherty A (2008) Renin inhibition reduces hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 118:984-993
39. Lusis AJ, Atherosclerosis. *Nature* 407 [2000] 234
40. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Bohm M, Laufs U (2003) Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 108:1567-1574
41. Min TQ, Zhu CJ, Xiang WX, Hui ZJ, Peng SY (2004) Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 18:203-209
42. Müller P, Kazakov A, Jagoda P, Semenov A, Böhm M, Laufs U. ACE inhibition promotes upregulation of endothelial progenitor cells and neoangiogenesis in cardiac pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2009 Jul 1;83(1):106-14.
43. Müller P, Kazakov A, Semenov A, Jagoda P, Friedrich EB, Böhm M, Laufs U. Ramipril and Telmisartan Exhibit Differential Effects in Cardiac Pressure Overload-Induced Hypertrophy Without an Additional Benefit of the Combination of Both Drugs. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2012 Feb 24
44. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau Vj. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor

- antagonizes the growth effects of the AT1-receptor: gain of function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(23):10663-10667
45. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 109:1417-1427
 46. Nickenig G, Harrison DG. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation.* 2002;105(3):393-396
 47. Nussberger J, Aubert JF, Bouzourene K, Pellegrin M, Hayoz D, Mazzolai L (2008) Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine. *Hypertension* 51:1306-1311
 48. Oh BH, Mitchel J, Herron JR, Chung J, Khan M, Keefe DL. Aliskiren, an oral rennin inhibitor, provides dose dependent efficacy and sustained 24-hour blood pressure control in patients with hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49:1157-1163
 49. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klingler GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial – the Losartan Heart Failure Survival Study (ELITE II). *Lancet.* 2000;355:1582-7
 50. Pool JL, Schmieder RE, Azizi M, Aldigier JC, Januszewicz A, Zidek W, Chiang Y, Satlin A. Aliskiren, an orally effective renin inhibitor, provides antihypertensive efficacy alone and in combination with valsartan. *Am j Hypertens.* 2007;20:11-20.
 51. Pöss, J; Böhm, M; Laufs, U, HDL im Rahmen der Atherogenese und HDL-Steigerung durch CETP-Inhibition, *Deutsche medizinische Wochenschrift* 2010; 135: 188-192
 52. Pöss J, Custodis F, Werner C, Weingärtner O, Böhm M, Laufs U., Cardiovascular disease and dyslipidemia: beyond LDL. *Curr Pharm Des.* 2011;17(9):861-70.
 53. Qian C, Schoemaker RG, van Gilst WH, Roks AJ (2009) The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular progenitor cell function. *Clin Sci (Lond)* 116:301-314
 54. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Pippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA (2003) Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 108:457-463
 55. Ray R, Shah AM (2005) NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)* 109:217-226

56. Regoli D, Park WK, Rioux F. Pharmacology of Angiotensin, *Pharmacol Rev.*1974;26:69-123)
57. Renz-Polster H, Krautzig S. *Basislehrbuch Innere Medizin*, 4. Auflage 2008, Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, München
58. Robert Koch-Institut (Hrsg) 2006. *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Robert Koch-Institut, Berlin
59. Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt, *Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Krankheitskosten*, Heft 48, Dezember 2008, Robert Koch-Institut, Berlin
60. Schachinger V, Assmus B, Honold J, Lehmann R, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM (2006) Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin Res Cardiol* 95:13-22
61. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM (2005) Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111:2981-2987
62. Schmidt R.F., Lang F., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 30.Auflage 2007, Springer Medizin Verlag Heidelberg
63. Schroder K, Kohnen A, Aicher A, Liehn EA, Buchse T, Stein S, Weber C, Dimmeler S, Brandes RP (2009) NADPH oxidase Nox2 is required for hypoxia-induced mobilization of endothelial progenitor cells. *Circ Res* 105:537-544
64. Schuh A, Liehn EA, Sasse A, Hristov M, Sobota R, Kelm M, Merx MW, Weber C (2008) Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model. *Basic Res Cardiol* 103:69-77
65. Seeger FH, Sedding D, Langheinrich AC, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S (2010) Inhibition of the p38 MAP kinase in vivo improves number and functional activity of vasculogenic cells and reduces atherosclerotic disease progression. *Basic Res Cardiol* 105:389-397
66. Siegenthaler W., Blum H.E., *Klinische Pathophysiologie*, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart – New York
67. SOLVD-Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1991;325:293-302.

68. Stanton A, Jensen C, Nussberger J, O'Brien E. Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral rennin inhibitor, aliskiren. *Hypertension*. 2003;42:1137-1143
69. Stary H.C.et. al., A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation* 92 (1995) 1355.
70. Steinmetz M, Brouwers C, Nickenig G, Wassmann S (2009) Synergistic effects of telmisartan and simvastatin on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 14:1645-1656
71. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T., The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest*. 1995 Feb;95(2):651-7.
72. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G (2003) Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 107:3059-3065
73. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hsieh FY, Takeda R, Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension*. 1995; 25(2):170-173
74. Timmermanns PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD, Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*. 1993;45:205-51
75. Toutouzas K, Synetos A, Nikolaou C, Tsiamis E, Tousoulis D, Stefanadis C., Matrix metalloproteinases and vulnerable atheromatous plaque, *Curr Top Med Chem*. 2012 May 1;12(10):1166-80.
76. Thum T, Fraccarollo D, Galuppo P, Tsikas D, Frantz S, Ertl G, Bauersachs J (2006) Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: Impact on endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 70:50-60
77. Thum T, Fraccarollo D, Thum S, Schultheiss M, Daiber A, Wenzel P, Munzel T, Ertl G, Bauersachs J (2007) Differential effects of organic nitrates on endothelial progenitor cells are determined by oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:748-754
78. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A, Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart., *J Biol Chem*. 1990;265:22348-57
79. Uraoka M, Ikeda K, Nakagawa Y, Koide M, Akakabe Y, Nakano-Kurimoto R, Takahashi T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M, Matsubara H (2009) Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization

- independently of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1202-1207
80. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89:E1-7
 81. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM (2002) Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105:3017-3024
 82. Wang CH, Verma S, Hsieh IC, Chen YJ, Kuo LT, Yang NI, Wang SY, Wu MY, Hsu CM, Cheng CW, Cherng WJ (2006) Enalapril increases ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization through manipulation of the CD26 system. *J Mol Cell Cardiol* 41:34-43
 83. Welsch U., *Lehrbuch Histologie*, 2. Auflage, 2006, Urban und Fischer Verlag, München und Jena
 84. Werner C, Kamani CH, Gensch C, Böhm M, Laufs U. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. *Diabetes*. 2007 Oct;56(10):2609-15.
 85. Werner C, Pöss J, Böhm M., Optimal antagonism of the Renin-Angiotensin-aldosterone system: do we need dual or triple therapy?, *Drugs*. 2010 Jul 9;70(10):1215-30.
 86. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G (2003) Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 93:e17-24
 87. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes., *N Engl J Med*. 2005 Sep 8;353(10):999-1007.
 88. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Bohm M, Dirnagl U, Nickenig G (2002) Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1567-1572
 89. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G (2006) Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:112-116

90. Widdop RE, Jones ES, Hannan RE, Gaspari TA. Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol.* 2003; 140(5): 809-824
91. Wong WT, Tian XY, Xu A, Ng CF, Lee HK, Chen ZY, Au CL, Yao X, Huang Y., Angiotensin II type 1 receptor-dependent oxidative stress mediates endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice. *Antioxid Redox Signal.* 2010 Sep 15;13(6):757-68.
92. Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Kobayashi N, Katakawa M, Yamamoto C, Tsunemi A, Suzuki R, Ueno T, Matsumoto K (2007) Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens Res* 30:1119-1128
93. You D, Cochain C, Loinard C, Vilar J, Mees B, Duriez M, Levy BI, Silvestre JS (2008) Hypertension impairs postnatal vasculogenesis: role of antihypertensive agents. *Hypertension* 51:1537-1544
94. Yu Y, Fukuda N, Yao EH, Matsumoto T, Kobayashi N, Suzuki R, Tahira Y, Ueno T, Matsumoto K (2008) Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am J Hypertens* 21:72-77

7. Publikationen

Originalarbeit

Pöss J, Werner C, Lorenz D, Gensch C, Böhm M, Laufs U. The renin inhibitor aliskiren upregulates pro-angiogenic cells and reduces atherogenesis in mice. *Basic Res Cardiol.* 2010 Nov;105(6):725-35.

Abstracts

J. Pöss, C. Werner, D. Lorenz, C. Gensch, M. Böhm, U. Laufs. Die extracellular-related kinase (ERK) steuert die Verbesserung der Migrationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen durch den direkten Renininhibitor Aliskiren, P1734, 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim 2011

J. Pöss, C. Werner, D. Lorenz, C. Gensch, M. Böhm, U. Laufs. Der direkte Renininhibitor Aliskiren erhöht die Anzahl und verbessert die Funktion endothelialer Progenitorzellen in C57Bl/6 und in ApoE^{-/-} Mäusen, V616, 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim 2010

J. Poess, C. Werner, D. Lorenz, C. Gensch, M. Boehm, U. Laufs. The renin inhibitor aliskiren increases number and function of endothelial progenitor cells and prevents atherogenesis in mice, *European Heart Journal* (2010) 31 (Abstract Supplement), 830-831; Kongress der European Heart Association, Stockholm 2010

J. Pöss, C. Werner, D. Lorenz, C. Gensch, M. Böhm, U. Laufs. Der direkte Renininhibitor Aliskiren erhöht die Anzahl und verbessert die Funktion endothelialer Progenitorzellen in C57Bl/6 und in ApoE^{-/-} Mäusen, Vortrag anlässlich der Jahrestagung Deutsche Hochdruckliga, Lübeck 2009

Projektbezogene Preise

- Preis des Freundeskreises des UKS 2010 an Dr. Janine Pöss
- Young investigator award, Lübeck, 2009 an Dr. Janine Pöss

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Universitäts-Professor Dr. med. Ulrich Laufs bedanken, einerseits für die freundliche Überlassung des Themas und für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Engagements in seiner Arbeitsgruppe. Darüber hinaus möchte ich mich bedanken für die Unterstützung bei der Planung des Projektes, der Durchführung der Experimente und der Hilfestellung bei der Erstellung der Arbeit. Ferner für die kollegialen Ratschläge und die anregenden Ideen.

Mein Dank gilt auch Herrn Universitäts-Professor Dr. med. Michael Böhm für die Möglichkeit, dass ich die, für die Dissertation notwendigen Experimente und Untersuchungen im kardiologischen Labor der Klinik für Innere Medizin III durchführen konnte.

Ein ganz, ganz besonderer Dank gilt ferner Frau Dr. med. Janine Pöss für die exzellente Betreuung des Projektes, der ubiquitären Hilfe bei Experimenten, Auswertungen, Planungen und komplizierten Fragestellungen. Außerdem gilt es das freundschaftliche und kollegiale Verhältnis zu loben und die ständige Bereitschaft zur Unterstützung. Danke auch für den unentwegten Support bei der Erstellung des Manuskriptes und das beständige Mit-Rat-und-Tat-zur-Seite-Stehen.

Ein letztes Dankeschön an das medizinisch-technische und wissenschaftliche Personal des Forschungslabors für die Einarbeitung in die einzelnen Methoden, wie auch die ständige Bereitschaft zur Unterstützung und die angenehme, kollegiale Atmosphäre.

9. Lebenslauf

Dominik Philipp Johannes Lorenz

Geboren 04. September 1986 in Trier als zweiter Sohn von Dr. med. Bernhard Lorenz und Dr. med. Margarete Schmitt-Lorenz

Schulisch-beruflicher Lebenslauf

- **1997-2006** Besuch des Hochwald-Gymnasiums in Wadern
- **Juli 2006-Oktober 2006** Ausbildung zum Rettungssanitäter
- **Seit Oktober 2006** Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
- **September 2008** 1. Abschnitt der ärztlichen Staatsprüfung (Note 1,0)
- **Seit Februar 2009** Doktorand im Bereich der experimentellen kardiologischen Forschung in der Arbeitsgemeinschaft bei Prof. Dr. med. Ulrich Laufs, in der Klinik für Innere Medizin III, Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin der Universitätsklinik des Saarlandes Homburg/Saar
- **März 2011 - Januar 2012** wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgemeinschaft bei Prof. Dr. med. Ulrich Laufs
- **Seit August 2011** Praktisches Jahr an der Universitätsklinik des Saarlandes

Auszeichnungen und Preise

- Sonderpreis im Bereich „Biologie“ beim Schüler-Experimentieren/Jugend-Forscht Wettbewerb 2002
- Preis der Stadt Wadern für das beste Abitur 2006 am Schulstandort Wadern
- Preis für das beste Abitur im Bereich „Geographie“
- Stipendium der Studienstiftung Saar März 2011

Ehrenamtliche Tätigkeiten und Betätigungsfelder

- **2003-2006** Schülersprecher am Hochwaldgymnasium, Mitglied der Landesschülerversammlung Saar
- Mitarbeit an fremdsprachenbezogenen und naturwissenschaftlichen Projekten (z.B. Schüler-Experimentieren/ Jugend-Forscht) am Hochwaldgymnasium Wadern, auch international (z.B. Modell „European Parlament“, Den Haag und Amsterdam, 2005)

- **Seit 1996** Mitglied im Deutschen Roten Kreuz, Übernahme von Führungs- und Leitungsaufgaben, Mitarbeit in der Ausbildung des sanitätsdienstlichen Personals, Tätigkeit im Bereich im Zivil- und Katastrophenschutz
- **Seit Oktober 2006** Ehrenamtliche Tätigkeit als Rettungssanitäter im Rettungsdienst und Krankentransport.