

Aus dem Institut für Pharmakologie  
Direktor:  
Prof. Dr. Robert Grosse

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**Die agonistunabhängige Rolle des  
Angiotensin II-Rezeptors AT<sub>1A</sub>  
in der arteriellen Vasoregulation**



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Richard Wizemann  
aus Gießen

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 23.01.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. Gudermann
1. Korreferent:	Prof. Dr. Schratt

# Inhaltsverzeichnis:

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	3
<b>1.) Einleitung</b>	
<b>1.1 Die glatte Muskulatur</b>	
1.1.1 Aufbau und Funktion der vaskulären glatten Muskulatur.....	6
1.1.2 Regulation der Vasokonstriktion durch glatte Muskulatur.....	7
1.1.3 Mechanismus der myogenen Kontraktion der vaskulären glatten Muskulatur.....	9
<b>1.2 Die myogene Vasokonstriktion</b>	
1.2.1 Definition, Stärke und Funktion.....	12
1.2.2 Potenzielle Mechanosensoren.....	14
<b>1.3 Die Angiotensin-Rezeptoren</b>	
1.3.1 Einteilung, Lokalisation und Funktion von Angiotensin- Rezeptoren.....	16
1.3.2 Beziehung zwischen Struktur und Funktion des AT <sub>1A</sub> - Rezeptors.....	18
1.3.3 Das systemisch wirksame Renin-Angiotensin-Aldosteron- System und lokale Angiotensinproduktion.....	20
1.3.4 Die Rolle des AT <sub>1A</sub> -Rezeptors in der arteriellen Vasokonstriktion.....	22
<b>1.4 Gendefiziente Mäuse</b>	
1.4.1 Erzeugung gendefizienter Mäuse.....	23
1.4.2 Erzeugung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten gendefizienten Mäuse.....	24
<b>1.5 siRNA</b>	
1.5.1 Definition, Funktion und Eigenschaften von siRNA.....	25
1.5.2 Wirkmechanismus und Anwendung von siRNA.....	25
<b>1.6 Zielsetzung</b> .....	28
<b>2.) Material / Methoden</b>	
<b>2.1 Verwendete Geräte und Materialien</b>	
2.1.1 Geräte und Materialien für Gefäß- und Zellmessungen.....	30
2.1.2 Geräte und Materialien für gentechnische Experimente.....	31
2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Lösungen.....	32
<b>2.2 Messung der myogenen Vasokonstriktion</b>	
2.2.1 Versuchstiere.....	34
2.2.2 Präparation von Zerebral- und Mesenterialarterien.....	34
2.2.3 Einsetzen des Gefäßes in die Messkammer.....	37
2.2.4 Aufbau und Funktionsweise des Messstandes.....	38
2.2.5 Messprinzip und statistische Auswertung der myogenen Vasokonstriktion.....	40
2.2.6 Eingesetzte Lösungen.....	41
2.2.7 Optimierung der eingesetzten Lösungen.....	42
2.2.8 Einfluss der Ein- und Auswaschung einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung auf die Stärke der nachfolgend gemessenen myogenen Vasokonstriktion.....	43

<b>2.3</b>	<b>Messung der Gefäß-Außendurchmesser-Veränderung nach Applikation von Pharmaka</b>	
2.3.1	Konstruktion einer Apparatur zur Applikation von Pharmaka.....	44
2.3.2	Prinzip der Pharmakaapplikation / eingesetzte Pharmaka.....	45
<b>2.4</b>	<b>Mäusegenotypisierung</b>	
2.4.1	DNA-Gewinnung mittels Mäuseschwanzverdau.....	47
2.4.2	DNA-Genotypisierung.....	47
2.4.3	DNA-Fragment-Auftrennung mittels Agarose-Gel-Elektrophorese.....	48
<b>2.5</b>	<b>Herstellung eines Plasmids mit Fluoreszenzprotein und AT<sub>1A</sub>-Rezeptor</b>	
2.5.1	Klonierungsstrategie.....	50
2.5.2	Einfügen einer Enzymschnittstelle mittels Mutagenese.....	51
2.5.3	Umklonierung der mAT <sub>1A</sub> -Rezeptor DNA-Sequenz.....	51
<b>2.6</b>	<b>Generierung einer stabil den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimierenden Zelllinie</b>	
2.6.1	Zellkultur.....	53
2.6.2	Transfektion von plasmidförmiger DNA.....	54
2.6.3	Generierung einer stabil den AT <sub>1A</sub> -Rezeptor exprimierenden Zelllinie.....	54
<b>2.7</b>	<b>Expressionsverminderung des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors mittels siRNA</b>	
2.7.1	Genereller Versuchsablauf.....	55
2.7.2	Transfektion von siRNA-Sequenzen.....	56
2.7.3	Fluoreszenzmessung am konfokalen Lasermikroskop.....	57
<u>3.) Ergebnisse</u>		
<b>3.1</b>	<b>Erstellung einer Druckleiter zur Messung der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion an Zerebral- und Mesenterialarterien.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2</b>	<b>Einfluss der Applikation 60 mM kaliumhaltiger PSS auf die Stärke der anschließend gemessenen druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion.....</b>	<b>59</b>
<b>3.3</b>	<b>Myogene Vasokonstriktion an Arterien von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen</b>	
3.3.1	Verminderte myogene Vasokonstriktion an Mesenterialarterien	
	FVB/N Mäuse.....	63
	C57BL/6J Mäuse.....	65
3.3.2	Myogene Vasokonstriktion an Zerebralarterien.....	66
<b>3.4</b>	<b>Pharmakavermittelte arterielle Vasokonstriktion an AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen</b>	
3.4.1	Verminderte Angiotensin II-vermittelte Vasokonstriktion an Zerebralarterien.....	68
3.4.2	Pharmakavermittelte Vasokonstriktion an Mesenterialarterien.....	70
<b>3.5</b>	<b>Verminderung der Genexpression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors</b>	
3.5.1	In einer stabilen CHO-K1-Zelllinie mittels siRNA.....	72

---

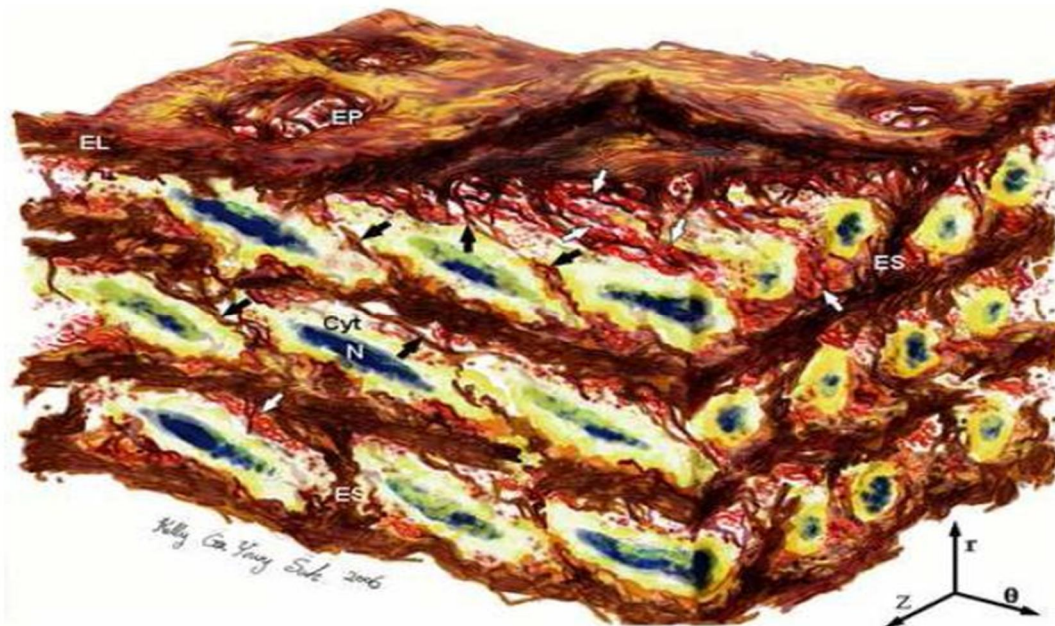
<u>4.) Diskussion</u>	
<b>4.1 Einfluss des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors auf die arterielle myogene Vasokonstriktion.....</b>	<b>76</b>
<b>4.2 Angiotensin II-vermittelte Vasokonstriktion an Mesenterial- und Zerebralarterien.....</b>	<b>81</b>
<b>4.3 Testung des Wirkgrades von siRNA gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor.....</b>	<b>84</b>
<b>4.4 Limitation der Messmethode der myogenen und pharmakavermittelten Vasokonstriktion.....</b>	<b>86</b>
<b>4.5 Ausblick und weitere Forschungsmöglichkeiten.....</b>	<b>88</b>
<u>5.) Zusammenfassung.....</u>	<u>93</u>
Abstract (englische Zusammenfassung).....	95
Kongressbeiträge.....	97
Abkürzungsverzeichnis.....	98
Literaturverzeichnis.....	100
Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	114
Danksagung.....	115

## 1.) Einleitung

### 1.1 Die glatte Muskulatur

#### 1.1.1 Aufbau und Funktion der vaskulären glatten Muskulatur

Die glatte Muskulatur kommt in Säugetieren in einer Vielzahl von Organen vor. Sie befindet sich in den Bronchien des respiratorischen Systems, in der Wand des Gastrointestinaltraktes (in der Tunica muscularis caudal des distalen Drittels des Oesophagus) und in Organen wie den Ureteren, der Harnblase und dem Hoden. Auch in der Wand von Arterien, Venen und Lymphgefäßen des vaskulären Systems sind glatte Muskelzellen zu finden. In den Bronchien reguliert die glatte Muskulatur die Belüftung der nachfolgenden Lungenabschnitte. Im Gastrointestinaltrakt sorgt die glatte Muskulatur für den Transport des Speisebreis und in den Ureteren für den Abfluss des Urins in die Harnblase. Im Hoden spielt die glatte Muskulatur für die Ejakulation eine Rolle (Holstein und Weiss, 1967; Michel und Parra, 2008).



**Abbildung 1.1: Aufbau der Tunica media der Aorta abdominalis**

Schemazeichnung der elektronenmikroskopisch ermittelten dreidimensionalen Struktur der Tunica media der Aorta abdominalis von männlichen Sprague-Dawley-Ratten. Eingebettet in ein aus elastischen Fasern bestehendes Grundgerüst (elastische Lamellen [EL], elastische Stützfasern [ES]) befinden sich die vaskulären glatten Muskelzellen mit Zellkern (N) und Zytoplasma (Cyt). In diesem Grundgerüst befinden sich Elastinporen (EP) mit einer Auflockerung der elastischen Fasern. In engem Kontakt zu den glatten Muskelzellen sind Kollagenfasern (weiße Pfeile) und elastische Fasern (schwarze Pfeile) angeordnet. (Abbildung leicht verändert aus O'Connell et al., 2008)

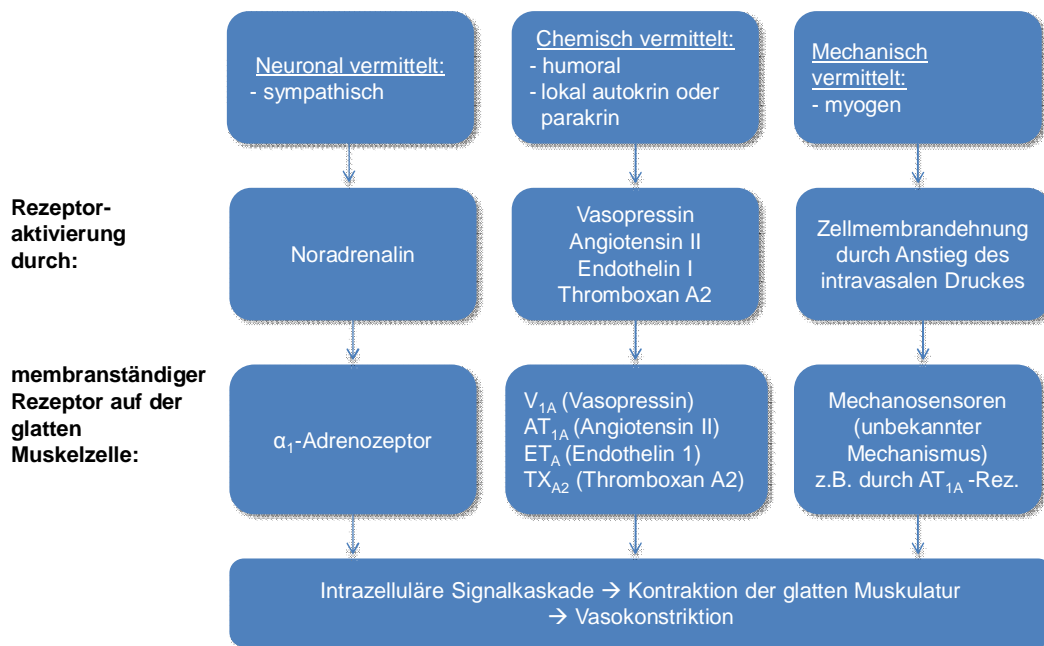
Die vaskuläre glatte Muskulatur ist in der Wand von Blutgefäßen in der Tunica media lokalisiert, die basierend auf elektronenmikroskopischen dreidimensionalen Volumenmessungen zu ca. 24% aus glatten Muskelzellen, 47% aus Elastin und 29% aus Kollagen besteht (O'Connell et al., 2008). Ellipsoid geformte glatte Muskelzellen (GMZ) aus der infrarenalen Aorta abdominalis weisen eine durchschnittliche Länge von  $19 \pm 3,3 \mu\text{m}$ , eine Breite von  $3,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$  und damit ein Volumen von  $1630 \pm 640 \mu\text{m}^3$  auf (O'Connell et al., 2008). Die GMZ sind eingebettet in ein Gerüst aus elastischen Fasern und befinden sich in engem Kontakt zu Kollagenfasern (siehe Abbildung 1.1). Im Gegensatz zu großen Arterien besteht die Wand von kleinen Widerstandsarterien und Arteriolen meist nur aus einer einzelnen Schicht von spindelförmigen GMZ. Im Bereich der Aufzweigung kleiner Arterien konnte elektronenmikroskopisch häufig eine zweite Schicht aus triangulär geformten GMZ mit langen Fortsätzen beobachtet werden (Ikebe et al., 2001).

### 1.1.2 Regulation der Vasokonstriktion durch glatte Muskulatur

Im Gegensatz zur quer gestreiften Skelettmuskulatur kann die Kontraktion der glatten Muskulatur nicht willkürlich beeinflusst werden. Drei unterschiedliche Mechanismen bewirken die Aktivierung spezifischer, auf der Membran von vaskulären GMZ lokalisierten Rezeptoren, die über intrazelluläre Signalkaskaden zur Muskelkontraktion mit konsekutiver Vasokonstriktion führen (siehe Abbildung 1.2). Über Neuronen des sympathischen Nervensystems ausgeschüttetes Noradrenalin kann  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren auf der Zellmembran von GMZ aktivieren und über eine intrazelluläre Signalkaskade die Vasokonstriktion auslösen. Humorale Botenstoffe wie beispielsweise Vasopressin, aber auch autokrin bzw. parakrin sezernierte Botenstoffe wie Endothelin 1 und Thromboxan A<sub>2</sub>, können über Aktivierung der jeweiligen spezifischen Rezeptoren eine Vasokonstriktion vermitteln (Carmines und Fleming, 1990; Kashihara et al., 2009). Angiotensin II wird sowohl humoral als auch parakrin gebildet und wirkt am AT<sub>1A</sub>-Rezeptor vasokonstriktorisch.

Mechanisch, durch Membrandehnung der GMZ kann über bis dato unbekannt mechanosensitive Strukturen eine Vasokonstriktion ausgelöst werden. Dieser von neuronalen und chemischen Mechanismen völlig unabhängige Vorgang

wird als „myogene Vasokonstriktion“ bezeichnet (Davis und Hill, 1999; Levick, 2010). Als potenzielle Struktur, die die myogene Vasokonstriktion vermittelt, wird der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Angiotensin II  $AT_{1A}$ -Rezeptor in Betracht gezogen. Auf zellulärer Ebene konnten diesem Rezeptor mechanosensitive Eigenschaften, wie die Aktivierung durch osmotisch induzierte Membrandehnung, nachgewiesen werden (Mederos y Schnitzler et al., 2008).



**Abbildung 1.2: Rezeptorvermittelte Vasokonstriktion**

Schemazeichnung von drei unterschiedlichen zur Vasokonstriktion führenden Mechanismen. Die durch spezifische Stimuli hervorgerufene Aktivierung von auf der Oberfläche vaskulärer glatter Muskelzellen lokalisierter Rezeptoren führt über unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden zur Kontraktion der glatten Muskulatur mit konsekutiver Vasokonstriktion. Die Ausschüttung von Noradrenalin durch sympathische Neuronen bewirkt die Aktivierung des  $\alpha_1$ -Adrenozeptors. Die humoral oder autokrin bzw. parakrin erfolgende Ausschüttung von Vasopressin, Angiotensin II, Endothelin 1 und Thromboxan A2 bewirkt die spezifische Aktivierung der  $V_{1A}$ -,  $AT_{1A}$ -,  $ET_A$ - und  $TX_{A2}$ -Rezeptoren. Membrandehnung aktiviert unbekannte Mechanosensoren (z. B. den Angiotensin II  $AT_{1A}$ -Rezeptor) und führt zur myogenen Vasokonstriktion.

Alle drei in Abbildung 1.2 dargestellten Mechanismen können kurzfristig, in einem Zeitraum von Sekunden bis Stunden, eine arterielle Vasokonstriktion auslösen. Um einen langfristig, über einen Zeitraum von Tagen bis Monaten mehr oder weniger stark ausgeprägten vasokonstriktorisches Effekt hervorzurufen, eignet sich der durch chemische Botenstoffe-vermittelte



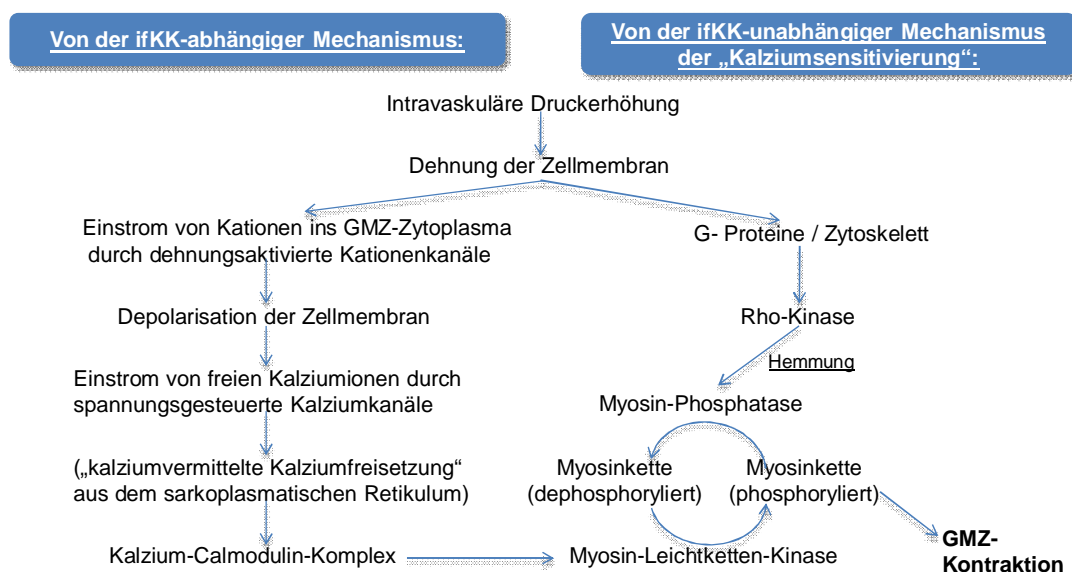
Mechanismus und nach neuen Erkenntnissen auch der neuronale Mechanismus (Guyton et al., 1969; Joyner et al., 2008).

### **1.1.3 Mechanismus der myogenen Kontraktion der vaskulären glatten Muskulatur**

Gegenwärtig wird folgende Hypothese der zur arteriellen myogenen Vasokonstriktion führenden Kontraktion der GMZ diskutiert: Die Erhöhung des intravaskulären Druckes führt zur Dehnung der GMZ, was mechanosensitive, zellmembranständige Strukturen aktiviert (siehe Kapitel 1.2.2). Diese aktivierten Strukturen führen durch intrazelluläre Signalkaskaden über zwei verschiedene Mechanismen zur Kontraktion der GMZ. Ein Mechanismus ist die von der intrazellulären freien Kalziumionenkonzentration (ifKK)-abhängige Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins. Der zweite Mechanismus ist die von der ifKK-unabhängige Hemmung der Dephosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins und wird auch „Kalziumsensitivierung“ genannt (Hill et al., 2009) (siehe Abbildung 1.3).

Beim ersten Mechanismus kommt es vermutlich durch die Dehnung der GMZ-Membran zur Aktivierung von nicht selektiven Ionenkanälen, die durch Kationenverschiebung nach intrazellulär eine Depolarisation der Zellmembran auslösen (Hill et al., 2009). Die hierdurch aktivierten spannungsabhängigen Kalziumkanäle, vorwiegend vom L-Typ, führen zu einem Einstrom von extrazellulären freien Kalziumionen (Somlyo und Somlyo, 1994). Bei einem Anstieg der ifKK kann auch aus intrazellulären Speichern, wie dem sarkoplasmatischen Retikulum, über einen vorwiegend durch den ryanodinrezeptorvermittelten Signalweg freies Kalzium in das Zytoplasma ausgeschüttet werden. Dieser Mechanismus wird als „kalziumvermittelte Kalziumfreisetzung“ bezeichnet, spielt aber in der glatten Muskulatur nur eine unbedeutende Rolle (Arendshorst und Thai, 2009). Durch den Anstieg der ifKK bildet sich ein Kalzium-Calmodulin-Komplex, der zur Dissoziation der Myosin-Bindungsstelle auf dem Aktinfilament und der Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLK) führt. Die MLK führt über eine Phosphorylierung der 20 kDa-schweren regulatorischen leichten Kette des Myosinfilaments zur Kontraktion der GMZ (Hill et al., 2009).

Beim Mechanismus der „Kalziunsensitivierung“ kommt es vermutlich unabhängig von der ifKK zu einer durch die Dehnung der GMZ-Membran ausgelösten, von G-Proteinen oder Zytoklettelementen-vermittelten Aktivierung von spezifischen Rho-Kinasen (Kim et al., 2008). Die Rho-Kinasen üben durch Phosphorylierung eine inhibitorische Wirkung auf die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLP) aus. Hierdurch kann die zur Minderung der GMZ-Kontraktion führende Dephosphorylierung der 20 kDa-schweren regulatorischen leichten Kette des Myosinfilaments verhindert werden (Hirano, 2007; Khromov et al., 2009; Kizub et al., 2010).



**Abbildung 1.3: Kontraktion der vaskulären glatten Muskulatur**

Schemazeichnung der vereinfacht dargestellten Kontraktionsmechanismen von vaskulären glatten Muskelzellen (GMZ) nach derzeitigem Kenntnisstand. Es wird ein von der intrazellulären freien Kalziumionenkonzentration (ifKK)-abhängiger und -unabhängiger Kontraktionsmechanismus unterschieden. Eine intravaskuläre Druckerhöhung mit konsekutiver Dehnung der GMZ-Membran führt zur Depolarisation der GMZ-Membran durch einen von dehnungsaktivierten kationenkanälenvermittelten Einstrom von Kationen. Durch spannungsgesteuerte L-Typ Kalziumkanäle gelangen freie Kalziumionen von extrazellulär in die GMZ. Die von der ifKK-abhängige Freisetzung freier Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum spielt bei der Kontraktion der GMZ nur eine untergeordnete Rolle. Eine hohe ifKK ermöglicht die Bindung freier Kalziumionen an Calmodulin mit Komplexbildung und Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase. Dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung der 20 kDa schweren regulatorischen leichten Kette des Myosins, was zur GMZ-Kontraktion führt. Die intravaskuläre Druckerhöhung mit konsekutiver Dehnung der GMZ-Membran führt auch zur Hemmung der Myosin-Phosphatase, vermutlich über einen durch G-Proteine-, Zytoskelettelemente- und Rho-Kinasen-vermittelten Signalweg. Durch die Hemmung der Myosin-Phosphatase findet keine Dephosphorylierung der 20 kDa-schweren regulatorischen leichten Kette des Myosins statt, was unabhängig von der ifKK zur Aufrechterhaltung der GMZ-Kontraktion führt.

Die „Kalziomsensitivierung“ scheint für die Aufrechterhaltung der myogenen Vasokonstriktion bei Absinken der ifKK eine bedeutende Rolle zu spielen. Ein Nachweis dieses Mechanismus konnte an isolierten Zerebralarterien von Ratten erbracht werden. Bei einem Anstieg des intravaskulären Druckes von 10 mmHg auf 60 und 100 mmHg wurde eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung der MLP festgestellt, was direkt mit der die GMZ-Kontraktion verstärkenden Wirkung dieses Mechanismus korreliert (Johnson et al., 2009).

Eine im Gegensatz zu nicht erkrankten Tieren chronisch verstärkte myogene Vasokonstriktion lässt sich sowohl bei arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II als auch bei hypertropher Kardiomyopathie nachweisen (Ahn et al., 2007; Harris et al., 2008; Petersen et al., 2002). An isolierten Basilararterien aus spontan hypertensiven Ratten im Vergleich mit Gefäßen aus nicht spontan hypertensiven Ratten konnte kraftmyografisch eine deutlich verstärkte myogene Vasokonstriktion ( $62,1 \pm 12,2\%$  vs.  $38,2 \pm 6,0\%$ ) nachgewiesen werden (Ahn et al., 2007). An isolierten Koronararterien aus drei Monate alten diabetischen, im Vergleich zu nicht diabetischen Ratten wurde druckmyografisch bei einem intravaskulären Druck von 80 mmHg ebenfalls eine erhöhte myogene Vasokonstriktion ( $40,8 \pm 3\%$  vs.  $34,6 \pm 6,7\%$ ) gemessen (Petersen et al., 2002). An Patienten mit koronarangiografisch nachgewiesenem Spasmus der linken Koronararterie führte die Applikation des Rho-Kinase-Inhibitors Fasudil zu einer starken Vasodilatation auf ca. 155% des Ausgangsdurchmessers vor Applikation des Pharmakons (Otsuka et al., 2008). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei vielen Erkrankungen eine verstärkte myogene Vasokonstriktion vorherrscht. Die krankheitsbezogene Bedeutung und eine daraus resultierende therapeutische Relevanz der myogenen Vasokonstriktion sind allerdings noch Gegenstand der aktuellen Forschung.

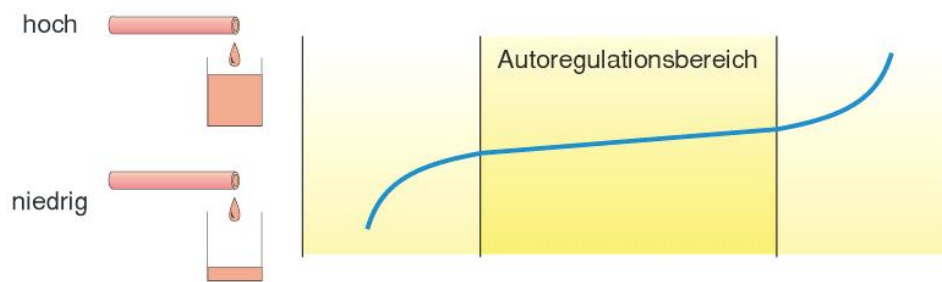
## 1.2 Die myogene Vasokonstriktion

### 1.2.1 Definition, Stärke und Funktion

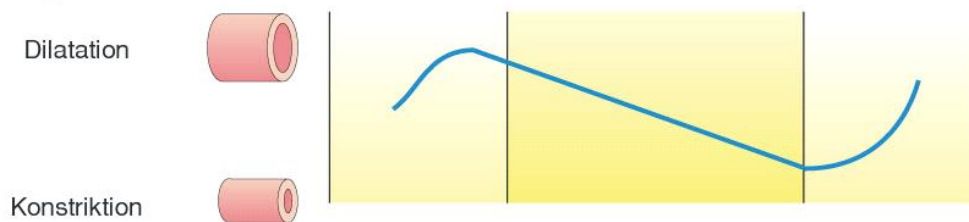
Die durch den Anstieg des intravaskulären Druckes hervorgerufene Kontraktion der vaskulären glatten Muskulatur mit anschließender Verminderung des luminalen sagittalen Gefäßdurchmessers wird als myogene Vasokonstriktion bezeichnet. Dieser später nach ihm benannte Effekt wurde schon 1902 von William Maddock Bayliss durch Experimente an denervierten Hinterläufen von Kaninchen beschrieben (Bayliss, 1902). Die Erkenntnis, dass die Autoregulation des Blutflusses teilweise durch einen vom Nervensystem-unabhängigen und vom intravaskulären Druck-abhängigen Mechanismus ausgelöst wird, gab den Anreiz für die weitere Erforschung der Perfusion ganzer Organe (Folkow, 1952). Durch den technischen Fortschritt konnten die detaillierten Eigenschaften der myogenen Vasokonstriktion isolierter kleiner Arterien und Arteriolen erst in den achtziger Jahren genauer untersucht werden (Harder, 1984; Jackson und Duling, 1989; Kuo et al., 1988).

An isolierten Arterien und Arteriolen von verschiedenen Säugetieren konnte auf Erhöhung des intravaskulären Druckes eine myogene Vasokonstriktion von 20-45% (relativer, prozentualer, maximal kontrahierter Gefäßdurchmesser im Vergleich zum passiv dilatierten Gefäßdurchmesser) festgestellt werden (Geary et al., 2003; Ito et al., 2007; Knot und Nelson, 1998; Lohn et al., 2002). Auch in Venen und Lymphgefäßen konnte mit demselben Verfahren eine myogene Vasokonstriktion von 3-8% und 7-9% nachgewiesen werden (Davis et al., 2009; Raffai et al., 2008). Der autoregulatorische Effekt fällt mit Abnahme des arteriellen Gefäßquerdurchmessers um so heftiger aus und ist am stärksten in Arteriolen ausgeprägt (Davis und Hill, 1999). Aus Säugetieren isolierte Mesenterial- und Zerebralarterien zeigen mit bis zu 45% eine ausgeprägte myogene Vasokonstriktion und werden deshalb gerne für die Erforschung myogener Eigenschaften verwendet (Knot und Nelson, 1998). Wegen der vergleichsweise einfachen Isolationsmethode und der vielfach vorbeschriebenen myogenen Eigenschaften wurden Zerebral- und Mesenterialarterien von Mäusen auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

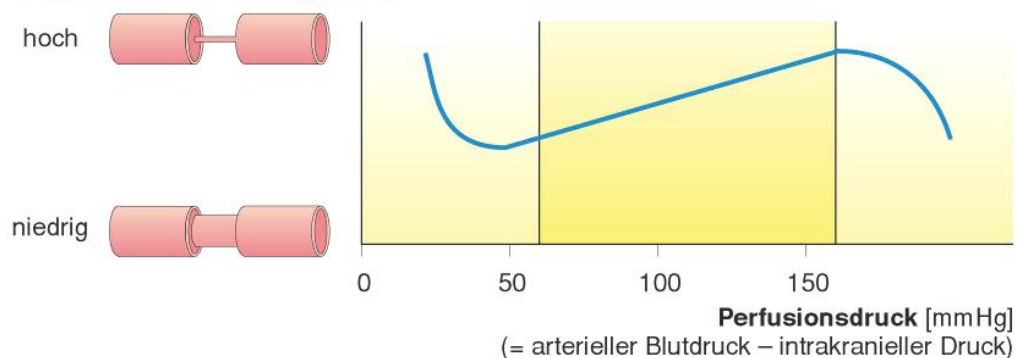
## Hirndurchblutung



## Hirngefäße



## Widerstand der Hirngefäße



### Abbildung 1.4: Physiologie der myogenen Vasokonstriktion

Die Auswirkung der vaskulären myogenen Vasokonstriktion auf den Blutfluss wird in dieser Abbildung am Beispiel der Gehirndurchblutung dargestellt.

Oben: Über einen großen intraarteriellen Autoregulationsbereich von ca. 60-160 mmHg wird die Gehirndurchblutung fast konstant gehalten. Achtung: Der hier angegebene Perfusionsdruck entspricht nicht dem systemischen Blutdruck, sondern wirkt als transmuraler Druck auf die Gefäßwand.

Mitte: Zur Aufrechterhaltung eines nahezu konstanten Blutflusses in den nachgeschalteten Gefäßen kommt es bei steigendem Perfusionsdruck zur zunehmenden myogenen Vasokonstriktion der Gehirnarterien.

Unten: Hierdurch nimmt der arterielle Gefäßwiderstand nach dem Hagen-Poiseuilleschen-Gesetz kontinuierlich zu, was zu einer Verminderung des Blutflusses führt.

(Abbildung leicht verändert aus Deetjen, Speckmann, Hescheler: Physiologie, 4. Auflage 2004, Urban und Fischer Verlag)

Die myogene Vasokonstriktion kleiner Arterien und Arteriolen dient der Konstanthaltung des Blutflusses und des hydrostatischen Filtrationsdruckes im nachfolgenden kapillären Gefäßbett zur Vermeidung von Ödemen. Die physiologische Steigerung des intraarteriellen Blutdruckes führt hierbei zu einer erhöhten Membranspannung der vaskulären GMZ, was die myogene Vasokonstriktion auslöst. Als Folge verkleinert sich der Gefäßquerdurchmesser mit konsekutiver Steigerung des Strömungswiderstandes in diesem Gefäßabschnitt (Hagen-Poiseuillesches-Gesetz), was einen verringerten kapillären Blutfluss zur Folge hat (siehe Abbildung 1.4).

Eine anschließende Blutdrucksenkung führt zur Vergrößerung des Gefäßdurchmessers, wodurch der kapilläre Blutfluss wieder erhöht wird. Durch diesen Mechanismus wird die Durchblutung von Organen und Geweben in einem gewissen physiologischen Blutdruckbereich konstant gehalten, was die Kapillaren vor Schädigung schützt und die Odembildung verhindert. Die myogene Vasokonstriktion dient außerdem der Aufrechterhaltung eines basalen Gefäßtonus, der auf die vasodilatatorische Wirkung chemischer Botenstoffe wie z. B. Stickstoffmonoxid einen Einfluss hat (Hill et al., 2009). Sie ist ein sowohl vom Endothel als auch von chemischen Botenstoffen und neuralen Einflüssen unabhängiger, innerhalb von Sekunden und Minuten einsetzender Mechanismus (Bevan und Laher, 1991; Davis und Hill, 1999; Hill et al., 2007).

### **1.2.2 Potenzielle Mechanosensoren**

Die Signalkaskade der myogenen Vasokonstriktion ist intensiv untersucht worden und wird ausführlich in Kapitel 1.1.3 beschrieben. Die distalen Abschnitte der Kaskade wurden bereits sehr gut charakterisiert, wobei die proximalen Abläufe, inklusive der Identität der mechanosensitiven Elemente, noch Gegenstand aktueller Forschung sind. Technische Fortschritte mit Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie, mit neuen elektrophysiologischen und molekularbiologischen Methoden sowie die Herstellung gendefizienter Tiermodelle ermöglichten die Erkennung potenzieller Mechanosensoren der myogenen Vasokonstriktion. In den letzten 20 Jahren wurden sowohl Zytoskelettelemente und Enzyme als auch Ionenkanäle und transmembranäre

Rezeptoren als Mechanosensoren vaskulärer GMZ in Erwägung gezogen (Hill et al., 2009).

An aus männlichen Ratten isolierten Arteriolen konnte eine nahezu vollständige Aufhebung der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion nach Zugabe von Inhibitoren der  $\alpha 5\beta 1$ - und  $\alpha v\beta 3$ -Integrine nachgewiesen werden (Martinez-Lemus et al., 2005). Durch elektrophysiologische Methoden konnte an isolierten glatten Muskelzellen eine Aktivierung von an der GMZ-Kontraktion beteiligten spannungsgesteuerten Kalziumkanälen mittels  $\alpha 5\beta 1$ -integrinbehafteter Antikörper hervorgerufen werden (Wu et al., 2001). An isolierten Zerebralarterien von männlichen Ratten wurde eine nahezu vollständige Inhibition der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion durch Ausschaltung der Funktion von Aktin-Zytoskelettelementen hervorgerufen (Cipolla et al., 2002). Diese Beispiele verdeutlichen die potenzielle Rolle von Integrinen und Aktinen als Mechanosensoren der myogenen Vasokonstriktion.

Auch Enzyme, wie Phospholipasen C und Tyrosinkinasen wurden als mechanosensitive Elemente in Betracht gezogen, da deren Aktivität auf zellulärer Ebene durch Membrandehnung gesteigert werden konnte (Jarajapu und Knot, 2002; Oishi et al., 1998). Mechanosensitive Eigenschaften konnten auf zellulärer Ebene auch bei einer ganzen Reihe von selektiven und unselektiven Ionenkanälen nachgewiesen werden. Ein durch Dehnung der GMZ-Membran aktivierter spannungsgesteuerter Kalziumkanal (SgKK) als alleiniges potenzielles mechanosensitives Element der myogenen Vasokonstriktion wird aktuell als unwahrscheinlich eingeschätzt, da sich auch bei pharmakologischer Blockade des SgKK durch Dehnung der GMZ-Membran eine Depolarisation auslösen lässt (Hill et al., 2009). Ein Beispiel für einen Ionenkanal mit nachgewiesenen myogenen Eigenschaften stellt der TRPC6-Kanal dar. An isolierten Gehirnarterien von Ratten konnte durch Verminderung der Genexpression dieses Kanals eine signifikant erniedrigte druckinduzierte myogene Vasokonstriktion gemessen werden (Welsh et al., 2002).

Mechanosensitive Eigenschaften wurden in letzter Zeit auf zellulärer Ebene bei den auf der GMZ-Membran exprimierten,  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten transmembranären  $H_1$ - (Histamin),  $AT_{1A}$ - (Angiotensin II) und  $V_1$ - (Vasopressin) Rezeptoren nachgewiesen (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Durch elektrophysiologische Methoden konnte eine vom Agonisten Angiotensin II-unabhängige Aktivierung des  $AT_{1A}$ -Rezeptors durch Dehnung der Zellmembran festgestellt werden (Hunyady und Turu, 2004; Mederos y Schnitzler et al., 2008; Zou et al., 2004). Die potenzielle Rolle des  $AT_{1A}$ -Rezeptors als Mechanosensor der myogenen Vasokonstriktion wird im Rahmen dieser Arbeit in vivo an Gefäßen von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen weiter erforscht und quantifiziert.

### 1.3 Die Angiotensin-Rezeptoren

#### 1.3.1 Einteilung, Lokalisation und Funktion von Angiotensin-Rezeptoren

In Säugetieren können aus dem in der Leber synthetisierten und durch die Protease Renin verkürzten Protein Angiotensinogen drei unterschiedliche, als chemische Botenstoffe wirksame Proteine (Angiotensin II, III und IV) hergestellt werden. Durch spezifische Bindung an unterschiedliche Rezeptoren ( $AT_{1-}$ ,  $AT_{2-}$  und  $AT_{4-}$ Rezeptor) können diese Proteine auf die Steuerung wichtiger Funktionen Einfluss nehmen. Die  $AT_{1-}$  und  $AT_{2-}$ Rezeptoren sind transmembranäre, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Proteinstruktur des Angiotensin IV bindenden  $AT_{4-}$ Rezeptors konnte als insulinregulierte Aminopeptidase identifiziert werden (Albiston et al., 2010; Albiston et al., 2001). In Nagetieren, wie Mäusen und Ratten, aber nicht in Menschen kommen zwei pharmakologisch identische  $AT_{1-}$ Rezeptor Subtypen vor ( $AT_{1A}$  und  $AT_{1B}$ ), die beide in der Aminosäuresequenz zu ca. 95% mit dem menschlichen  $AT_{1-}$ Rezeptor identisch sind (Langford et al., 1992).

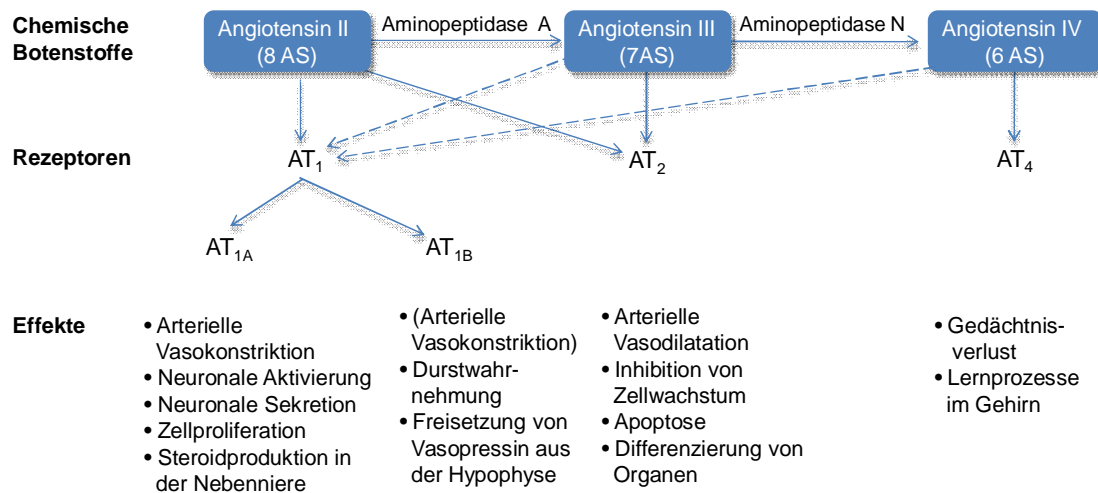
Der  $AT_{1-}$ Rezeptor-Subtyp  $AT_{1A}$  ist in vielen Organen vorhanden, wie z. B. dem Gehirn, dem Herzen, der Leber, der Nebenniere und Niere sowie dem arteriellen vaskulären System. Der Subtyp  $AT_{1B}$  kommt in hohen Konzentrationen in der Hypophyse und Nebenniere vor (Csikos et al., 1998).



Der  $AT_2$ -Rezeptor konnte sowohl in fetalen Geweben als auch in Gehirn, Myokard, Nebenniere, Ovar und dem Uterus von erwachsenen Säugetieren nachgewiesen werden (Csikos et al., 1998). Der  $AT_4$ -Rezeptor kommt in Säugetieren in vielen Organen vor, wobei die höchsten Proteinkonzentrationen in diversen Gehirnstrukturen nachgewiesen werden konnten (Miller-Wing et al., 1993; Vanderheyden, 2009).

Die pharmakologische Aktivierung des  $AT_{1A}$ -Rezeptors durch Angiotensin II führt zur Kontraktion der vaskulären glatten Muskulatur, zur neuronalen Aktivierung, Neurosekretion, zu Ionentransport, Zellproliferation und beeinflusst die Steroidproduktion in der Nebenniere (de Gasparo et al., 2000). Der  $AT_{1B}$ -Rezeptor spielt eine Rolle in der Durstwahrnehmung und der Freisetzung von Vasopressin aus der Neurohypophyse. Auch eine Beteiligung dieses Rezeptors an der arteriellen Vasokonstriktion wird vermutet (Bogdarina et al., 2009; Zhou et al., 2003). Ein durch Angiotensin III über den  $AT_1$ -Rezeptor-vermittelter Effekt auf die Freisetzung von Vasopressin aus der Hypophyse und auf blutdruckkontrollierende Strukturen im Gehirn wird diskutiert (Reaux et al., 2001). Auch eine durch Angiotensin IV über den  $AT_1$ -Rezeptor vermittelte vasokonstriktorische Wirkung konnte an isolierten Mesenterialarterien von Ratten nachgewiesen werden (Loufrani et al., 1999) (siehe Abbildung 1.5).

Der  $AT_2$ -Rezeptor spielt für die arterielle Vasodilatation, Inhibition von Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung von Organen eine Rolle (Csikos et al., 1998; de Gasparo et al., 2000). Als Angiotensin IV-vermittelte Funktion des  $AT_4$ -Rezeptors wird aktuell nur ein negativer Einfluss auf den Lernprozess und das Gedächtnis angesehen (Albiston et al., 2010). Weitere Funktionen des  $AT_4$ -Rezeptors werden kontrovers diskutiert (de Gasparo et al., 2000; Vanderheyden, 2009). Der inverse Agonist Losartan besitzt eine hohe Affinität zur Blockade des  $AT_1$ -Rezeptors, hat jedoch keine Affinität zum  $AT_4$ -Rezeptor. Eine durch direkte Bindung des  $AT_2$ -Rezeptors an den  $AT_1$ -Rezeptor ausgelöste partiell antagonisierende Wirkung auf die  $AT_1$ -Rezeptor-vermittelte Zellproliferation und Vasokonstriktion wird diskutiert (AbdAlla et al., 2001; Hernandez Schulman et al., 2007).



**Abbildung 1.5: Angiotensine und Angiotensin-Rezeptoren**

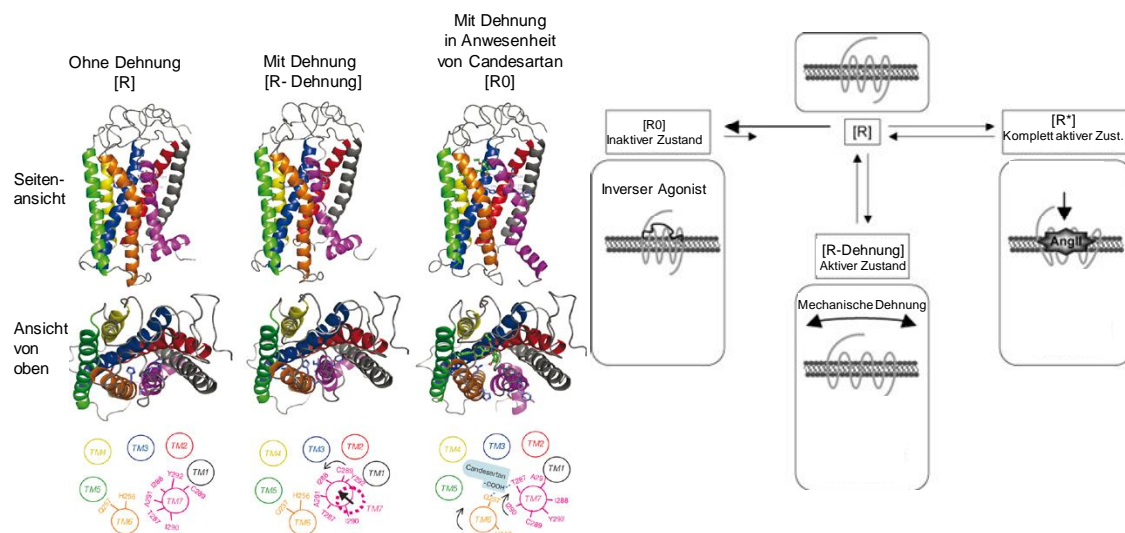
Schematische Darstellung der Wirkung der chemischen Botenstoffe Angiotensin II-IV auf spezifische Rezeptoren und einigen daraus resultierenden Effekten. In Klammern unter den Angiotensinen II-IV ist ihre Anzahl von Aminosäuren (AS) genannt. Über eine durch die Aminopeptidase A und die Aminopeptidase N katalysierte Abspaltung von Aminosäuren kann aus Angiotensin II Angiotensin III und Angiotensin IV hergestellt werden. Diese chemischen Botenstoffe aktivieren spezifische Zelloberflächenrezeptoren und lösen dadurch verschiedene Effekte aus. In Mäusen und Ratten, aber nicht in Menschen, lassen sich zwei pharmakologisch identische Subtypen des AT<sub>1</sub>-Rezeptors nachweisen. In Mäusen kann eine arterielle Vasokonstriktion durch eine pharmakologische Aktivierung des AT<sub>1A</sub>- (und evtl. AT<sub>1B</sub>-) Rezeptors durch den Agonisten Angiotensin II ausgelöst werden.

### 1.3.2 Beziehung zwischen Struktur und Funktion des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors

Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor ist ein sieben Transmembrandomänen umfassender, an ein heterotrimeres G-Protein-gekoppelter Rezeptor und weist einen extrazellulären N-Terminus und einen zytoplasmatischen C-Terminus auf. Bis in die frühen neunziger Jahre bestand die Vorstellung, dass dieser Rezeptor nur zwei verschiedene Konformationszustände einnehmen kann, den durch agonistenvermittelten aktiven, sowie den inaktiven Zustand. Agonisten verlagern die Rezeptorkonformation zum aktiven Zustand hin. Antagonisten verhalten sich meistens kompetitiv gegenüber Agonisten und können nur durch die Verdrängung des Agonisten vom Rezeptor die durch den Rezeptor ausgelöste Wirkung abschwächen, aber nicht direkt den Rezeptorkonformations-Zustand verändern (Milligan, 2003). Inzwischen konnte eine dritte Gruppe von Liganden, die „inversen Agonisten“ identifiziert werden, die die inaktive Rezeptorkonformation stabilisieren und im Gegensatz zu

Antagonisten die Rezeptoraktivität unter die Basalrate reduzieren können (Bond und Ijzerman, 2006).

Inverse Agonisten können auch im Gegensatz zu Antagonisten die agonistunabhängige und thermodynamisch begründete Rezeptoraktivität reduzieren (Bond und Ijzerman, 2006). Auf zellulärer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass durch Interaktionen der Carboxylgruppe des inversen Agonisten Candessartan die durch Zelldehnung ausgelöste mechanische Aktivierung des Angiotensin II  $AT_{1A}$ -Rezeptors vollständig blockiert werden kann (Yasuda et al., 2008b). Diese Eigenschaft wurde auch



**Abbildung 1.6: Molekulares Modell der agonistunabhängigen, durch mechanische Dehnung ausgelösten Konformationsänderung des  $AT_{1}$ -Rezeptors (Schema links) und Modell der verschiedenen Zustände des Angiotensin II  $AT_{1}$ -Rezeptors (Schema rechts).**

Der  $AT_{1}$ -Zelloberflächenrezeptor ist Mitglied der sieben Transmembrandomänen umfassenden, an heterotrimeren G-Proteinen gekoppelten Rezeptoren und weist einen extrazellulären N-Terminus und einen zytosomatischen C-Terminus auf. Der Rezeptor kann aus dem nicht gedehnten, nicht an einen Liganden gekoppelten Grundzustand [R] in drei weitere Zustände überführt werden. Mechanische Zellmembrandehnung führt (agonistunabhängig) zur Rotation gegen den Uhrzeigersinn mit Umlagerung der Transmembrandomäne 7 in die Ligandenbindetasche (siehe Schema links), wodurch es zu einem partiell aktiven Rezeptorzustand [R-Dehnung] kommt. Ein inverser Agonist wie z. B. Candessartan kann eine Verschiebung vom Grundzustand [R] zum inaktiven Rezeptorzustand [R0] durch Minderung der konstitutiven Rezeptoraktivität unter die Basalrate bewirken. Dies geschieht durch eine im Uhrzeigersinn verlaufende Rotation der Transmembrandomäne 7. Die Applikation des Agonisten Angiotensin II führt durch Bindung an der Transmembrandomäne 3 und 6 sowie durch Rotation der Transmembrandomäne 7 von der Ligandenbindetasche weg zu einem komplett aktiven Rezeptorzustand [R\*]. (Abbildungen leicht verändert aus Yasuda et al. 2008; Akazawa, Yasuda et al. 2009)

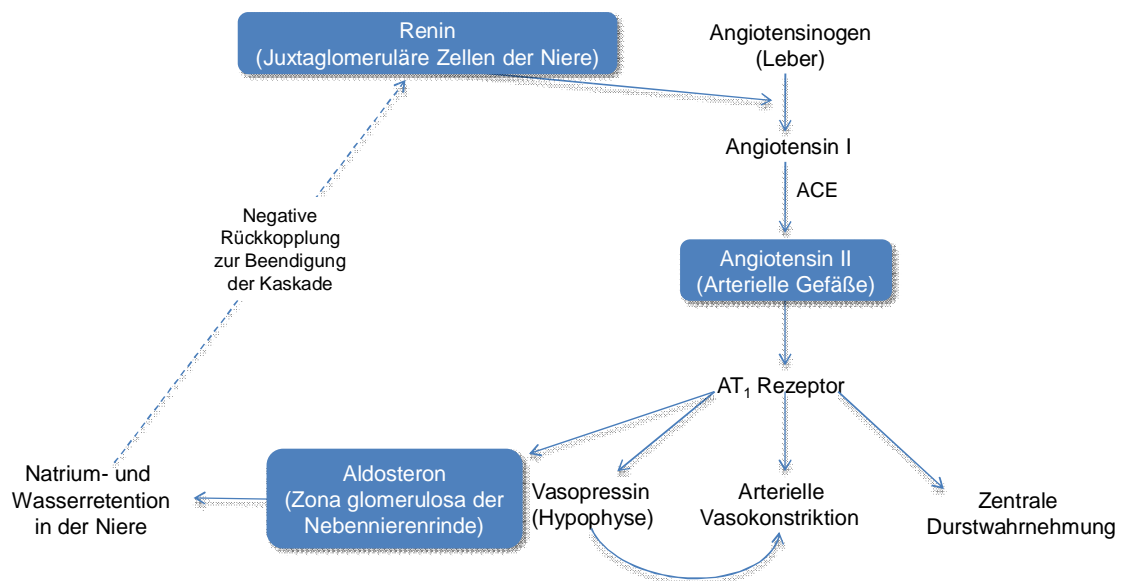
bei Olmesartan und Valsartan, aber nicht bei Losartan nachgewiesen (Qin et al., 2009). Die durch Agonisten ausgelösten Rezeptor-Konformationsänderungen unterscheiden sich von den durch inverse Agonisten ausgelösten (Villardaga et al., 2005). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von Angiotensin II an die Transmembrandomäne 3 und 6 und durch Rotation der Transmembrandomäne 7 von der Ligandenbindetasche weg zu einer Aktivierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors führt (Akazawa et al., 2009; Yasuda et al., 2008b). Bei der mechanischen Aktivierung dieses Rezeptors kommt es allerdings zu einer Rotation der Transmembrandomäne 7 gegen den Uhrzeigersinn in die Ligandenbindetasche hinein (Yasuda et al., 2008b) (siehe Abbildung 1.6).

### **1.3.3 Das systemisch wirksame Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und lokale Angiotensinproduktion**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase des Wasser- und Salzhaushaltes und beeinflusst in einem Zeitraum von Stunden bis Monaten die Blutdruckregulation. Der physiologische Ablauf der Kaskade ist folgend beschrieben. Bei einem länger andauernden Abfall des systemischen Blutdruckes kommt es über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus zur Sekretion von Renin aus juxtaglomerulären Zellen der Niere. Die Proteinase Renin katalysiert die Verkürzung des in der Leber gebildeten Angiotensinogens zu Angiotensin I. Es folgt die Verkürzung von Angiotensin I durch das auf Gefäßendothelzellen lokalisierte Angiotensin-konvertierende-Enzym (Tracey et al.) mit Bildung des Oktapeptids Angiotensin II (siehe Abbildung 1.7).

Angiotensin II ist der biologische Effektor des Systems und kann durch Bindung an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor sowohl vasokonstriktorisch wirken als auch die Freisetzung der chemischen Botenstoffe Aldosteron (aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde) und Vasopressin (aus der Neurohypophyse) induzieren. Aldosteron bewirkt eine vermehrte Natriumrückresorption in der Niere und Vasopressin kann sowohl über den V<sub>1a</sub>-Rezeptor vasokonstriktorisch wirken, als auch in der Niere eine gesteigerte Wasserretention hervorrufen. Die kombinierten Effekte verursachen einen Anstieg des systemischen Blutdruckes.

Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus kommt es zur Beendigung der Kaskade des RAAS. Der in der Niere lokalisierte juxtaglomeruläre Apparat misst die Osmolarität des Konzentrats im distalen Tubulus und den Perfusionsdruck im Vas afferens der Glomeruli der Niere und kann sowohl lokal die Nierenperfusion beeinflussen als auch über die Drosselung der Reninsekretion einen negativen Effekt auf das systemische RAAS ausüben (Keeton und Campbell, 1980).



**Abbildung 1.7: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

Schemazeichnung mit Darstellung von chemischen Botenstoffen und darunter in Klammern der jeweilige Syntheseort. Bei einem Abfall des systemischen Blutdruckes kommt es zur Ausschüttung von Renin, das die proteolytische Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I katalysiert. Durch Abspaltung von Aminosäuren von Angiotensin I durch das Angiotensin-konvertierende-Enzym (Tracey et al.) wird Angiotensin II gebildet. Angiotensin II wirkt durch Aktivierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors sowohl direkt vasokonstriktorisch, vermittelt aber auch die Ausschüttung der chemischen Botenstoffe Vasopressin und Aldosteron. Vasopressin wirkt über V<sub>1A</sub>-Rezeptoren vasokonstriktorisch und Aldosteron bewirkt eine gesteigerte Natrium- und Wasserrückresorption in der Niere. Bei Anstieg des systemischen Blutdrucks führt ein negativer Rückkopplungsmechanismus in den juxtaglomerulären Zellen der Niere durch Drosselung der Reninfreisetzung zur Beendigung der Kaskade.

Eine vom systemischen RAAS völlig unabhängige, lokale Produktion von Angiotensin II durch parakrine und autokrine Mechanismen konnte im Herz, Gehirn, Fettgewebe, den Gonaden, der Plazenta, Niere und in Endothelzellen von Arterien nachgewiesen werden (Lavoie und Sigmund, 2003). Durch diesen Mechanismus hergestelltes Angiotensin II scheint einen Einfluss auf die

Regeneration des Myokards, das Wachstum von Adipozyten und das Verspüren von Durst zu haben (Bader und Ganten, 2008; Cassis et al., 2008; Sun, 2010). Auch die Produktion freier Radikale auf proinflammatorische, proatherosklerotische Stimuli in der glatten Gefäßmuskulatur wird auf parakrin / autokrin produziertes Angiotensin I zurückgeführt (Fleming et al., 2006). Über 60% des im Gefäßsystem zirkulierenden Angiotensin II wird beim Menschen nicht vom Angiotensin-konvertierenden-Enzym, sondern anderweitig z. B. von Chymasen gebildet (Wolf, 2008). Eine kompensatorische Hochregulierung dieses Mechanismus könnte für den langfristigen Wirkverlust von das systemische RAAS blockierenden ACE Hemmern verantwortlich sein.

#### **1.3.4 Die Rolle des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der arteriellen Vasokonstriktion**

Eine pharmakologische Aktivierung des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors durch Angiotensin II führt zur arteriellen Vasokonstriktion. Aber auch für die myogene Vasokonstriktion scheint der AT<sub>1A</sub>-Rezeptor eine bedeutende Rolle zu spielen. In AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen zeigte sich ein erniedrigter systemischer Blutdruck und eine gestörte Salurese (Audoly et al., 2000). Dieser Rezeptor scheint auch einen Einfluss auf die Genese von Bluthochdruck auszuüben (Wichi et al., 2007; Zhu et al., 2006). Die pharmakologische Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors mit den inversen Agonisten Losartan und Candesartan führte zu einer vollständigen Reversibilität der verstärkten myogenen Vasokonstriktion in isolierten Mesenterialarterien von Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (Gschwend et al., 2003).

In typischen, eine myogene Vasokonstriktion aufweisenden Arterien, nämlich mesenterialen, zerebralen und renalen Arterien, konnte eine hohe Protein- und Messenger-RNA-Konzentration des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors nachgewiesen werden (Bao et al., 2007; Li et al., 1999; Ruan et al., 1997; Viswanathan et al., 2000; Zhou et al., 2005). Auf zellulärer Ebene wurden mechanosensitive Eigenschaften dieses Rezeptors, nämlich die Aktivierung durch osmotisch-induzierte Membrandehnung festgestellt (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Die mechanische Aktivierung des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors durch Dehnung der Zellmembran von GMZ findet unabhängig von parakrin / autokrin gebildetem Angiotensin II statt (Hunyady und Turu, 2004; Zou et al., 2004). Um den Einfluss des AT<sub>1A</sub>-

Rezeptors auf die myogene Vasokonstriktion weiter zu quantifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche an isolierten Arterien von gendefizienten Mäusen durchgeführt.

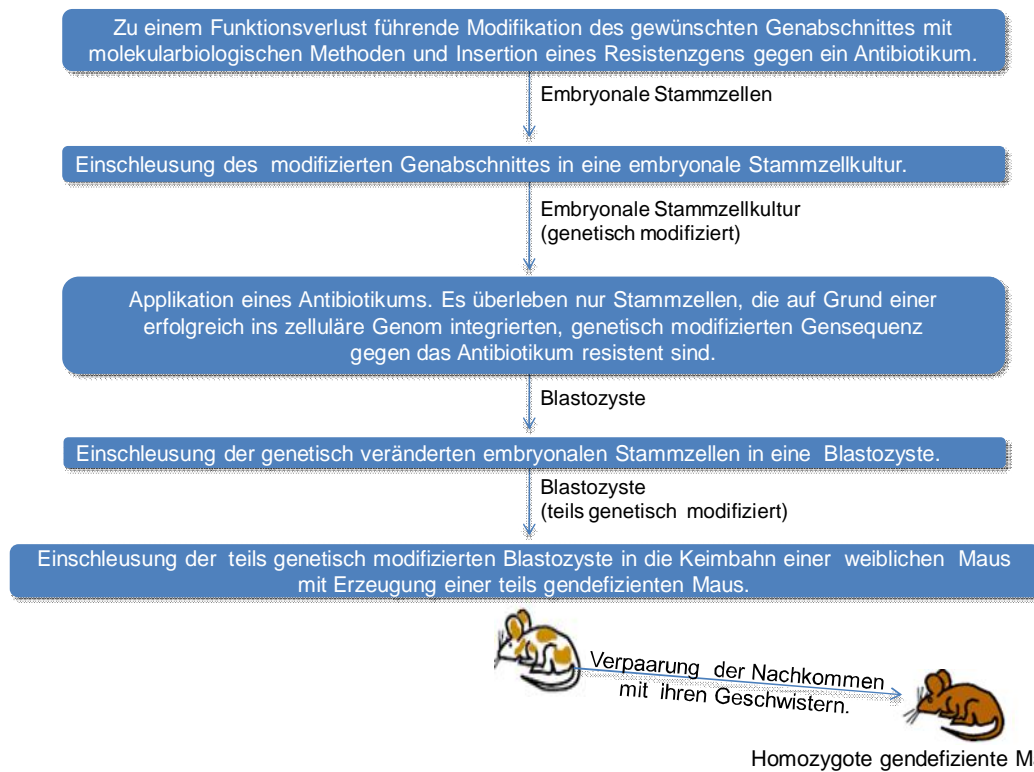
## 1.4 Gendefiziente Mäuse

### 1.4.1 Erzeugung gendefizienter Mäuse

An der Maus lassen sich physiologische Vorgänge und Krankheiten gut untersuchen, da sie eine gute Fertilitätsrate aufweisen und einfach zu halten sind. Ihre Entwicklung und ihr Stoffwechsel sind dem des Menschen sehr ähnlich. Vor Kurzem gelang es, das komplette Genom der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und weitverbreiteten Mauslinie C57BL/6J zu sequenzieren (Waterston et al., 2002). Es konnten ca. 30000 zu über 90% homologe, proteincodierende Gene identifiziert werden.

Schon 1980 gelang die Herstellung lebensfähiger, genetisch veränderter Mäuse durch Mikroinjektion gereinigter DNA in bereits befruchtete Oozyten (Gordon et al., 1980). Diese Methode ist als Pronukleus-Injektion bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten gendefizienten Mäuse wurden durch eine andere weit verbreitete Methode hergestellt. Hier erfolgt eine zu einem Funktionsverlust führende Modifikation der auszuschaltenden DNA-Zielsequenz, die dann mithilfe eines Vektors in embryonale Stammzellen eingeschleust wird (siehe Abbildung 1.8).

Nach Injektion dieser modifizierten embryonalen Stammzellen in eine Blastozyste wird das Zellkonglomerat in die Keimbahn einer weiblichen Maus eingebracht. Stammzellen haben die Tendenz, in fremdes Gewebe einzuwachsen und sich dort zu differenzieren (Evans und Kaufman, 1981). Deshalb entwickeln sich nun sogenannte chimäre Tiere, die teils aus unveränderten Zellen des Muttertieres und genetisch veränderten Zellen bestehen. Durch weitere Verpaarung dieser Tiere können homozygot gendefiziente Mäuse hergestellt werden, die komplett aus genetisch veränderten Zellen bestehen.



**Abbildung 1.8: Erzeugung von gendefizienten Mäusen**

Stark vereinfachte Schemazeichnung mit Darstellung der Methode zur Erzeugung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten gendefizienten Mäuse. Für weitere Erläuterungen siehe betreffenden Textabschnitt im Kapitel 1.4.

### 1.4.2 Erzeugung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten gendefizienten Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Labor von Thomas M. Coffman erzeugte C57BL/6J Mäuse mit einer homozygoten Gendefizienz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors verwendet (Ito et al., 1995). Die codierende Sequenz dieses Rezeptors wurde hierfür durch eine Neomycin-Resistenz-Sequenz ersetzt und es erfolgte die distale Insertion eines *Herpes Simplex* Thymidinkinase codierenden Gens. Die resultierende genetisch veränderte DNA-Sequenz wurde in embryonale Stammzellen eingeschleust.

Durch anschließende Kultivierung der Stammzellen mit Applikation des Virostatikums Ganciclovir und des Antibiotikums Geneticin (Synonym: G 418) überlebten nur die Zellen, die die veränderte Gensequenz an der richtigen Stelle in ihr Genom eingebaut hatten und somit eine Resistenz gegen diese Stoffe aufwiesen. Es folgte die Einschleusung der Stammzellen in eine



weibliche Maus nach oben beschriebener Methode (siehe Abbildung 1.8). Trotz des Verlusts der vielfältigen Funktionen des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors überlebten die hergestellten gendefizienten Mäuse und wiesen keine makroskopischen Organveränderungen auf (Ito et al., 1995).

## 1.5 siRNA

### 1.5.1 Definition, Funktion und Eigenschaften von siRNA

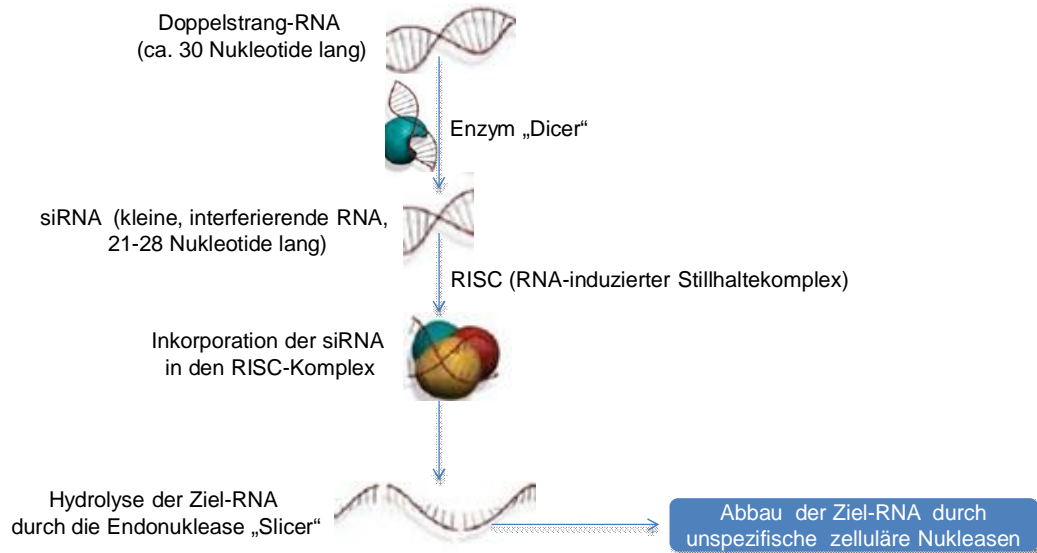
siRNA, auch „small interfering RNA“ (kleine, interferierende RNA) genannt, besteht aus einem ca. 21-28 Nukleotiden langen RNA-Fragment. Dieses Fragment ist spezifisch für und komplementär zu einem Abschnitt zellulärer RNA. Das siRNA-Fragment kann in eine Zelle oder einen Organismus eingeschleust werden und kurzfristig (über Stunden) zur Verminderung der Genexpression der spezifischen zellulären RNA-Sequenz führen. Dies hat einen Funktionsverlust der durch diese Sequenz codierten physiologischen Funktionen zur Folge. Das Wirkprinzip von siRNA besteht hierbei in der Hydrolyse spezifischer zellulärer RNA, die anschließend von unspezifischen zellulären Nukleasen abgebaut werden kann.

Im Gegensatz zur Erforschung von Genfunktionen durch gendefiziente Organismen erweist sich siRNA als weniger kostenintensiv, weniger zeitaufwendig und ermöglicht das Studium der kurzfristig innerhalb von Stunden hervorgerufenen physiologischen Auswirkungen eines spezifischen Funktionsverlustes von Genen. Auch der Einfluss von physiologischen gegenregulatorischen Mechanismen wird durch die kurzfristige Wirkweise von siRNA im Vergleich zu gendefizienten Organismen minimiert.

### 1.5.2 Wirkmechanismus und Anwendung von siRNA

Ca. 30 Nukleotide lange, inaktive Doppelstrang-RNA-Sequenzen werden ins Zytoplasma von Zellen eingeschleust. Nach derzeitigem Kenntnisstand verkürzt ein „dicer“ (engl.: „Würfelschneider“) genanntes Enzym diese Sequenz mit Herstellung einer aktiven, 21-28 Nukleotide langen siRNA, mit einem 2 Nukleotide langem Überhang am 3'-Ende der Sequenz. Die siRNA wird von

einem enzymhaltigen „RNA-induzierten Stillhaltekomplex“ (Driscoll und Chalfie) am 5'-Ende phosphoryliert und der zur zellulären Ziel-RNA komplementäre Strang der siRNA wird in den Komplex inkorporiert (siehe Abbildung 1.9).



**Abbildung 1.9: Vermuteter zytosolischer Wirkmechanismus von siRNA**

Stark vereinfachte Schemazeichnung. Inaktive, ca. 30 Nukleotide lange Doppelstrang-RNA-Sequenzen werden im Zytosol der Zielzelle von einem „Dicer“ genannten Enzym (engl.: „Würfelschneider“) verkürzt, mit Herstellung von aktiven, 20-22 Nukleotide langen siRNA-Sequenzen. Die siRNA wird von einem enzymhaltigen RISC-Komplex (RNA-induzierter Stillhaltekomplex) am 5'-Ende phosphoryliert und die zur Ziel-RNA komplementäre Sequenz der siRNA wird in den Komplex inkorporiert. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird diese Sequenz nun entwunden und lagert sich nach deren Auffindung an die Ziel-RNA an. Durch die Endonuklease „Slicer“ (engl.: „Schneider“) wird die Ziel-RNA an einer bestimmten Stelle hydrolysiert und kann so durch unspezifische zelluläre Nukleasen abgebaut werden.

In einer ATP-abhängigen Reaktion wird dieser Strang nun entwunden und dient zur Auffindung der Ziel-RNA, mit der er hybridisiert (Anlagerung der siRNA an die komplementäre Ziel-RNA mit Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen). Durch die  $Mg^{2+}$ -abhängige Endonuklease „Slicer“ (engl.: „Schneider“) wird die Ziel-RNA nun an einer spezifischen Stelle hydrolysiert und kann von unspezifischen zytosolischen Nukleasen abgebaut werden (Zamore und Haley, 2005). Die siRNA bleibt bei diesem Vorgang intakt und kann zusammen mit dem RISC-Komplex den weiteren Abbau von Ziel-RNA katalysieren (Agrawal et al., 2003).

Eine Alternative zur Anwendung von siRNA zur Verminderung der Genexpression spezifischer zellulärer RNA-Sequenzen sind Antisense-Oligonukleotide (ASO). ASO sind kurzkettige RNA-Sequenzen, deren Wirkweise sich von siRNA unterscheidet und hauptsächlich in der spezifischen Bindung von komplementärer Ziel-RNA mit anschließender Blockade der Proteinervielfältigung liegt. Ein indirekter Vergleich der Wirkstärke von spezifischer, gegen das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) gerichteter siRNA- und ASO-Sequenzen in Konzentrationen von 100 nM bzw. 200 nM mittels Fluoreszenzmikroskopie auf zellulärer Ebene ergab folgendes Ergebnis: Nach 5 h Einwirkzeit konnte durch siRNA eine GFP-Fluoreszenz-Minderung von ca. 80% und durch ASO eine GFP-Fluoreszenz-Minderung von ca. 50% nachgewiesen werden (Bertrand et al., 2002). Dies verdeutlicht die starke Wirkung von siRNA in der spezifischen Minderung der Genexpression. Ein weiterer Vorteil von siRNA scheint die im Vergleich zu ASO längere Wirkdauer zu sein. Nach 20 h Einwirkzeit zeigte siRNA eine starke Wirkung, während sich durch ASO keine Wirkung mehr nachweisen ließ (Bertrand et al., 2002).

Durch die kurzfristige Wirkweise der siRNA innerhalb von Stunden können kompensatorische Effekte des Organismus auf den Funktionsverlust des spezifisch ausgeschalteten Gens weitestgehend vermieden werden. Deshalb eignet sich siRNA besonders zur Untersuchung der Funktion von Rezeptoren und Ionenkanälen. Durch die Arbeit von Jean-Rémi Bertrand et al. wurde gezeigt, dass synthetisch hergestellte siRNA-Sequenzen auch in lebenden Tieren erfolgreich zur Verminderung der Genexpression eines spezifischen Proteins verwendet werden können (Bertrand et al., 2002). Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte die Testung von gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichteter siRNA zum späteren Einsatz im Tiermodell für die weitere Erforschung der Rolle dieses Rezeptors in der myogenen Vasokonstriktion.

## 1.6 Zielsetzung

Der auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimierte  $AT_{1A}$ -Rezeptor konnte unabhängig vom Agonisten Angiotensin II auf zellulärer Ebene durch Membrandehnung aktiviert werden (Mederos y Schnitzler et al., 2008). In  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen wurde im Vergleich zu nicht gendefizienten Mäusen ein signifikant erniedrigter systolischer Blutdruck nachgewiesen (Ito et al., 1995). Möglicherweise sind  $AT_{1A}$ -Rezeptoren an der arteriellen myogenen Vasokonstriktion beteiligt und beeinflussen somit den arteriellen Blutdruck. Zur weiteren Erforschung der Rolle des  $AT_{1A}$ -Rezeptors in der myogenen Vasokonstriktion mittels Tiermodell erfolgte die Etablierung einer Apparatur zur Messung der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion isolierter Arterien.

Im Einzelnen waren folgende Ziele definiert:

- 1.) Etablierung eines Messstandes zur Untersuchung der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion und der pharmakainduzierten Vasokonstriktion isolierter Arterien. Erstellung spezifischer Protokolle zur Messung der myogenen Vasokonstriktion isolierter Zerebral- und Mesenterialarterien.
- 2.) Messung der pharmakainduzierten Vasokonstriktion kleiner isolierter Arterien verschiedener Gefäßgebiete von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten und entsprechenden suffizienten Mäusen. Diese Untersuchung dient der Quantifizierung der Stärke der durch die Pharmaka Angiotensin II, Vasopressin, Phenylephrin und Endothelin 1 ausgelösten Vasokonstriktion.
- 3.) Vergleich des Ausmaßes der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion an isolierten kleinen Arterien verschiedener Gefäßgebiete von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten und  $AT_{1A}$ -Rezeptor suffizienten Mäusen.
- 4.) Herstellung einer stabil den  $AT_{1A}$ -Rezeptor exprimierenden CHO-K1-Zelllinie. Untersuchung des Wirkgrades verschiedener, gegen den  $AT_{1A}$ -Rezeptor gerichteter siRNA-Sequenzen an dieser Zelllinie mittels Fluoreszenzmikroskopie. Geplant ist eine spätere Anwendung der siRNA in vivo. Nach der von Stacey Reading et al. für Antisense-Oligonukleotide beschriebenen Methode kann siRNA durch Mini-Osmo-Pumpen in das zerebrale Ventrikelsystem von Ratten appliziert werden (Reading et al., 2007). Dies ermöglicht eine effiziente Verminderung der Genexpression des  $AT_1$ -Rezeptors in Zerebralarterien. Durch einen Vergleich der Stärke der myogenen Vasokonstriktion isolierter Zerebralarterien, behandelt mit gegen den  $AT_{1A}$ -

Rezeptor gerichteter oder Kontroll-siRNA, können neue Erkenntnisse zur Rolle des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der myogenen Vasokonstriktion gewonnen werden.

## 2.) Material / Methoden

### 2.1 Verwendete Geräte und Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Materialien für die Gefäßmessungen:

<u>Gerät / Material:</u>	<u>Hersteller:</u>
DMT Pressure Myograph (System Model 111P)	Danish Myo Technology
Peristaltikpumpe (REGLO Digital)	Ismatec
Vakuumpumpe (Nr. 1230041)	Thomas
Wasserbad (D1)	Haake
Mikroskop mit Oberbeleuchtung (SZ51)	Olympus
Schlauch (ID1,6 mm; AD 3,2 mm)	Tygon
Glaskapillaren (GB120T-8P)	Science Products GmbH
Sterilfilter (0,2 µm Filtropur S)	Sarstedt
Einmalspritzen (5, 10, 20 ml)	B. Braun
Dreiwegehahn (Discofix® C)	B. Braun
Pinzette (Dumont 5 Biologie)	Fine Science Tools
Federschere (Vannas, gerade, 3 mm Blatt)	Fine Science Tools
Stechkanülen (Mikrolance 3, 25 G)	Becton & Dickinson
Pinzette (#11023-10)	Fine Science Tools
Schere (#BC106R)	Aesculap
Petrischale (92x16 mm, Plastik)	Sarstedt
Sylgard (184 Silicone Elastomer Kit)	Dow Corning
Messbecher (500, 1000 ml)	Simax
Messkolben (500, 1000, 2000 ml)	Brand
Glasflaschen (500, 1000, 2000 ml)	Simax
Glasschneider	Spezialanfertigung

**Geräte und Materialien für Zelleexperimente:**

<u>Gerät / Material:</u>	<u>Hersteller:</u>
Sterilbank (HERAsafe®)	Heraeus
Vakuumpumpe (Nr. 1230041)	Thomas
Wasserbad (Typ 3048)	Köttermann
Brutschrank (Heracell® 150)	Heraeus
Zentrifuge (Laborfuge 400)	Heraeus
Zellkulturplatten (6, 48, 96 Loch)	Sarstedt
Pipetten (Plastik, 2, 5, 10 ml)	Sarstedt
El. Saughilfe (Pipetus)	Hirschmann Laborgeräte
Kulturflaschen (6, 25 ml)	Sarstedt
Kulturschälchen 35 mm Ø (Nr. 150318)	NUNC
Glaspipetten (Pasteur, lang)	Marienfeld
Pipetten (Plastik 10, 20, 200, 1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000 µl)	Sarstedt
Falcon Flaschen (15, 50 ml)	Sarstedt

**2.1.2 Geräte und Materialien für gentechnische Experimente:**

<u>Gerät / Material:</u>	<u>Hersteller:</u>
Temperierter Schüttler (HEMR 13)	HCL
Elektrophoresegerät (Power Pack 1000)	Bio-RAD
Zentrifuge (Biofuge Pico)	Heraeus
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries
Analysewaage (AF 200)	Mettler
PCR-Maschine (T3 Termocycler)	Biometra
Plasmid Miniprep Kit II	Peq-Lab
Gel-Elektrophorese-Kammern	Spezialanfertigung
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Thermo scientific
Mutagenese Kit (Quick Change II site-directed)	Stratagene
Nucleobond X-tra Midi Kit	Machinery-Nagel
Plastikgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Skalpell (No. 11)	Feather
Doppelspatel	Aesculap

**2.1.3 Verwendete Chemikalien:**

<u>Chemikalie:</u>	<u>Hersteller:</u>
NaCl	Roth
KCl	Sigma
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma
MgSO <sub>4</sub>	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
Glukose	Sigma
EGTA (Ethylenglycol-bis-N, N, N', N'-tetraacetat)	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Agarose (Peq-GOLD-Universal)	Peq Lab
Ethidiumbromid	Sigma
Hefeextrakt	Roth
Trypton / Pepton	Roth
Angiotensin II	Sigma
Vasopressin (Arg <sup>8</sup> - Vasopressin)	Sigma
Phenylephrin	Sigma
Endothelin 1	Sigma
Penicillin / Streptomycin	Sigma
Ampicillin	Sigma
Candamycin	Sigma
Polylysin	Sigma
G418 Sulfat (Geneticin)	PAA
Ethanol absolut (99,8%)	VVR



**Verwendete Enzyme:**

<u>Enzym:</u>	<u>Hersteller:</u>
Taq-Polymerase	Fermentas
DpnI	Fermentas
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
KpnI	Fermentas
XhoI	Fermentas
T4 Ligase	Fermentas
Proteinase K (rekombinant)	Roche Diagnostics GmbH

**Verwendete Lösungen:**

<u>Lösung</u>	<u>Hersteller:</u>
TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer	Eigenherstellung
Laufpuffer (6x)	Fermentas
GeneRuler™ DNA-Leiter (100 bp)	Fermentas
DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) Kulturmedium	Gibco
Ham's F12 Kulturmedium	PAA
DPBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung) Medium	PAA
Trypsin	PAA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Restriktionsenzym-puffer (gelb)	Fermentas
Restriktionsenzym-puffer (T4-Ligase-Puffer)	Fermentas
dNTP (Dexoxy-ribonucleosid-Triphosphat, 10 mM)	Fermentas
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Fermentas
Steriles Wasser	Braun
Puffer B	Eigenherstellung
SDS (Natrium-dodecyl-Sulfat, 10%) Lösung	Eigenherstellung
NaCl Lösung (35 g pro 100 ml)	Eigenherstellung
FCS (fetales-Kälberserum)	Gibco
FuGENE® HD (Transfektionsreagenz)	Roche

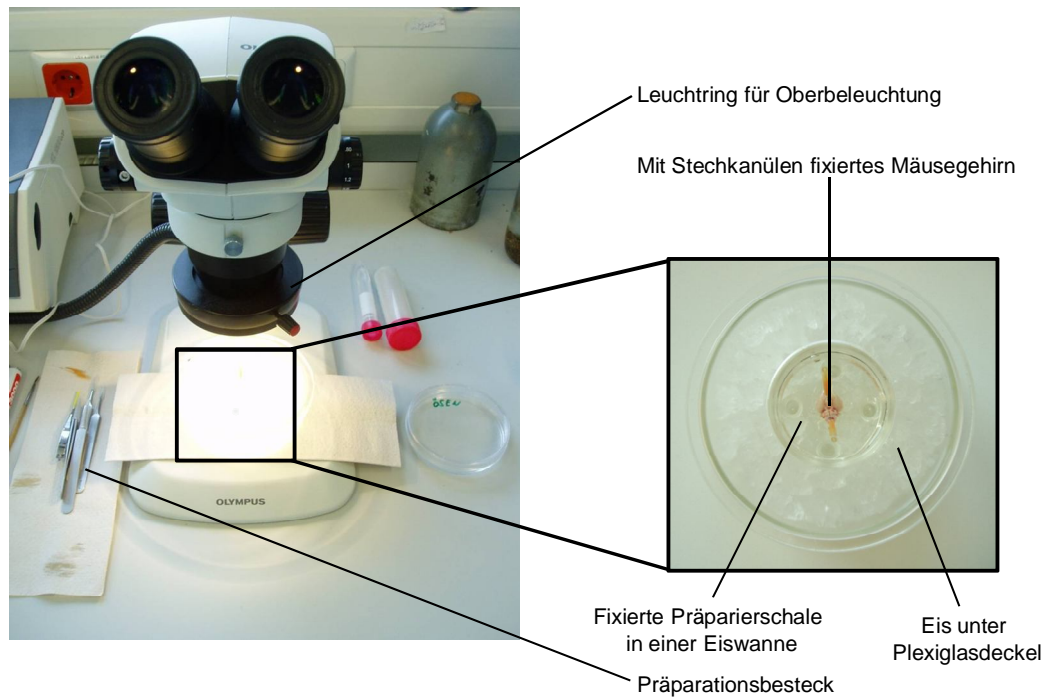
## 2.2 Messung der myogenen Vasokonstriktion

### 2.2.1 Versuchstiere

Für die Tierversuche wurden  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefiziente und komplementäre nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefiziente Mäuse von zwei häufig in der Forschung verwendeten Tierstämmen, nämlich C57BL/6J Mäusen (The Jackson Laboratory) und FVB/N Mäusen (MDC Berlin und Harlan Laboratories) benutzt. FVB/N-Mäuse wurden 1935 aus einer Schweizer Mäusekolonie gewonnen, die eine Schwäche gegenüber dem leukämieverursachenden Friend-Virus B (murines Leukämievirus) aufweist und danach benannt wurde. Die Haltung der Tiere in separat belüfteten Käfigen entsprach Standardbedingungen mit 20 °C Raumtemperatur, ca. 40% Luftfeuchtigkeit und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

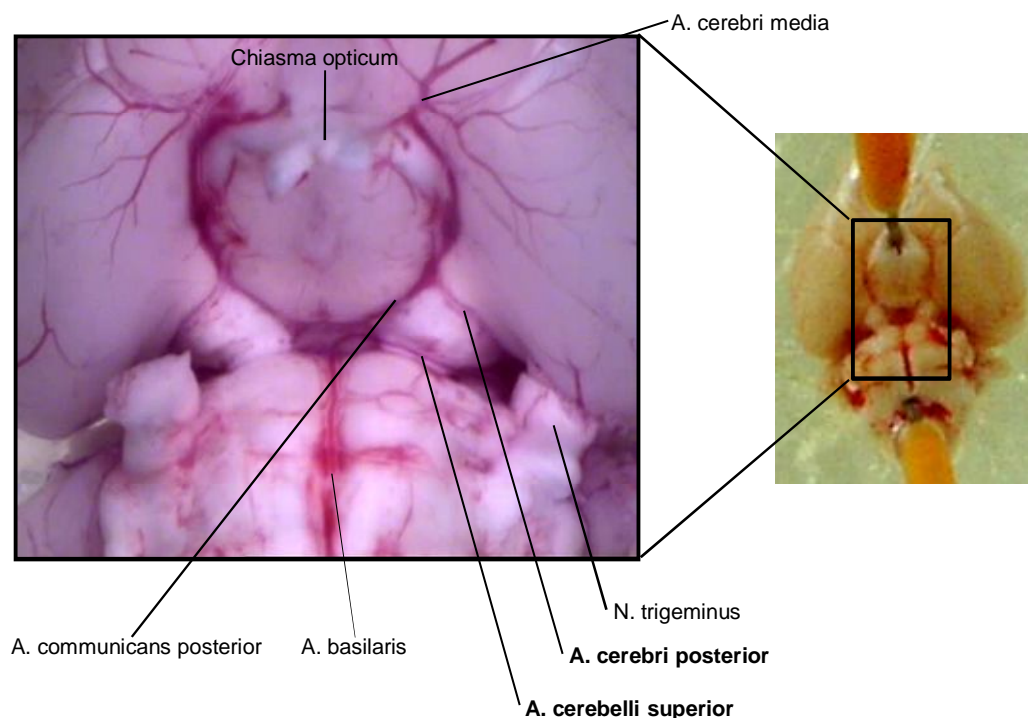
### 2.2.2 Präparation von Zerebralarterien

Nach Betäubung mit Isofluran erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch zervikale Dislokation und Dekapitation. Nach der vorsichtigen Freilegung wurde die Kalotte mit einer feingliedrigen Schere über der Schädelhöhle abgetrennt. Dies geschah durch die beidseitige sagittale Schnittführung über dem Jochbogen nach nasal und eine transversale Durchtrennung der Ossa nasales. Nach Abtrennung der Nn. optici und Nn. trigemini wurde das abgelöste Gehirn in ein Glas mit kalter, vorher mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begaster physiologischer Salzlösung (PSS) transferiert und auf Eis gelagert. Nach Überführung des entnommenen Gehirns in eine speziell angefertigte Präparierschale mit Sylgard-beschichtetem Boden, die ebenfalls eisgekühlte PSS enthielt, wurde das Gehirn mit der basalen Seite nach oben kranial und kaudal mit Stechkanülen fixiert (siehe Abbildung 2.1). Sylgard ist ein durchsichtiges, aus zwei flüssigen Komponenten vernetztes, besonders stabiles und elastisches Silikon.



**Abbildung 2.1: Der Präparationsarbeitsplatz**

Arbeitsplatz zur präparativen Isolation von Arterien unter dem Lichtmikroskop (Bild links). Vergrößert wird die mit kalter PSS gefüllte, auf Eis gelagerte Präparationsschale mit einem durch Stechkanülen fixierten Mäusegehirn dargestellt (Bild rechts).



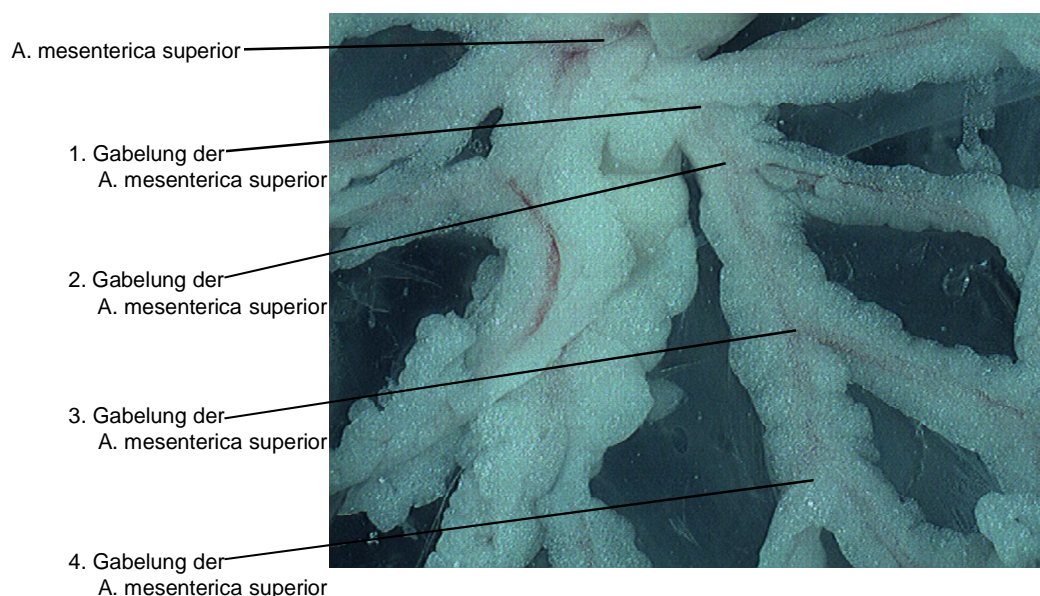
**Abbildung 2.2: Ansicht eines Mäusegehirns von basal**

Mit Stechkanülen fixiertes Mäusegehirn von basal (Bild rechts). Vergrößerter Ausschnitt eines Mäusegehirns von basal (Bild links) mit Abbildung der anschießend präparativ isolierten Arterien (fett gedruckte Beschriftung).

Es folgte die beidseitige Freipräparation der A. cerebri posterior und der A. cerebelli superior von Meningengewebe. Nach größtenteils stumpfer Mobilisierung der Arterien wurden diese möglichst weit distal abgetrennt und zur Aufbewahrung in ein Gefäß mit kalter, vorher mit Carbogen begaster, eisgekühlter PSS transferiert (siehe Abbildung 2.2).

### Präparation von Mesenterialarterien

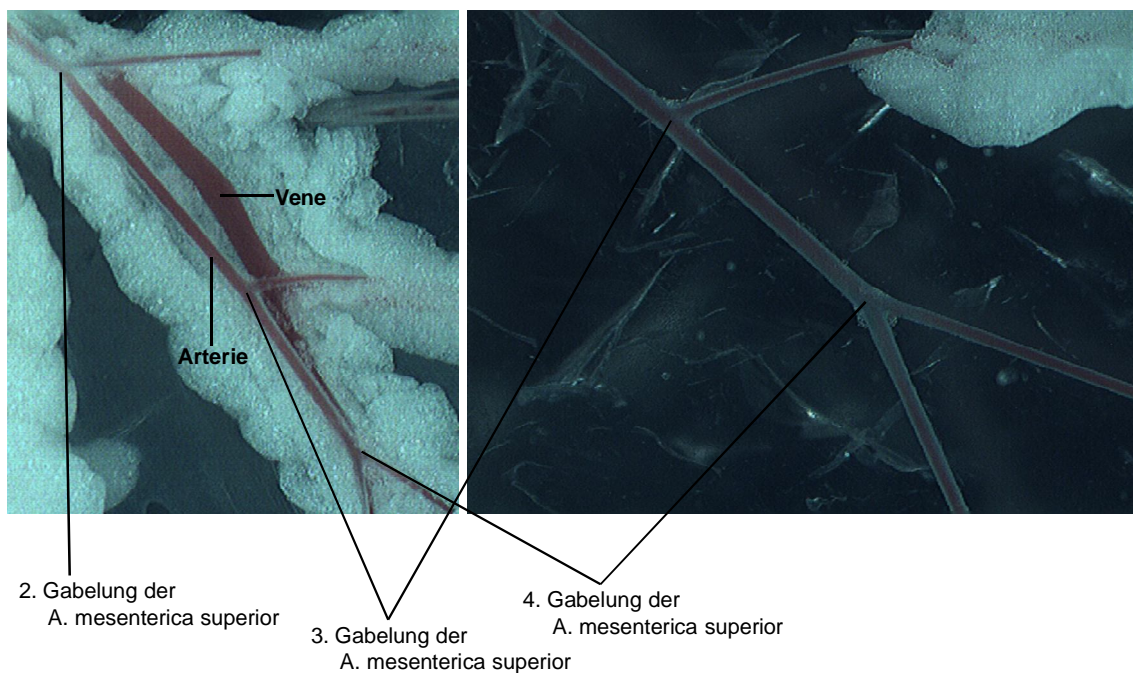
Nach Betäubung mit Isofluran erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch zervikale Dislokation. Nach Eröffnung des Abdomens wurde das Rectum stumpf mobilisiert und horizontal durchtrennt. Das Mesocolon / Mesenterium wurde so weit proximal am Darm wie möglich bis zum Abgang der A. mesenterica superior aus dem Truncus coeliacus abpräpariert und abgesetzt. Nach Transferierung des entnommenen Präparates in eine mit Sylgard-beschichtete Präparationsschale, die gekühlte mit Carbogen begaste PSS enthielt, wurde die mit Fettgewebe umhüllte A. mesenterica superior und ihre Abgänge mit Stechkanülen fixiert und geordnet dargestellt (siehe Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3: Aufzweigung der A. mesenterica superior**

Darstellung der von Fettgewebe umhüllten A. mesenterica superior mit distaler Aufzweigung. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden aufgrund präparativer Limitationen nach der zweiten und dritten Gabelung lokalisierte Arterien verwendet. Je weiter distal die Arterien lokalisiert sind, desto stärker fällt die an isolierten Arterien gemessene myogene Vasokonstriktion aus.

Es folgte die Freipräparation der A. und V. mesenterica superior. Die Arterie ließ sich aufgrund ihrer deutlich breiteren Wandschichten und den V-förmigen Gabelungen von den dünnwandigen und labilen Venen gut unterscheiden (siehe Abbildung 2.4). Für die Versuche wurden nach der 2. und 3. Gabelung der A. mesenterica superior lokalisierte Gefäßabschnitte verwendet, da die myogene Vasokonstriktion isolierter Arterien um so stärker ausfällt, je weiter distal diese lokalisiert sind. Die Gefäßabschnitte wurden vom Fettgewebe frei präpariert und zur Aufbewahrung in ein Gefäß mit kalter PSS transferiert.



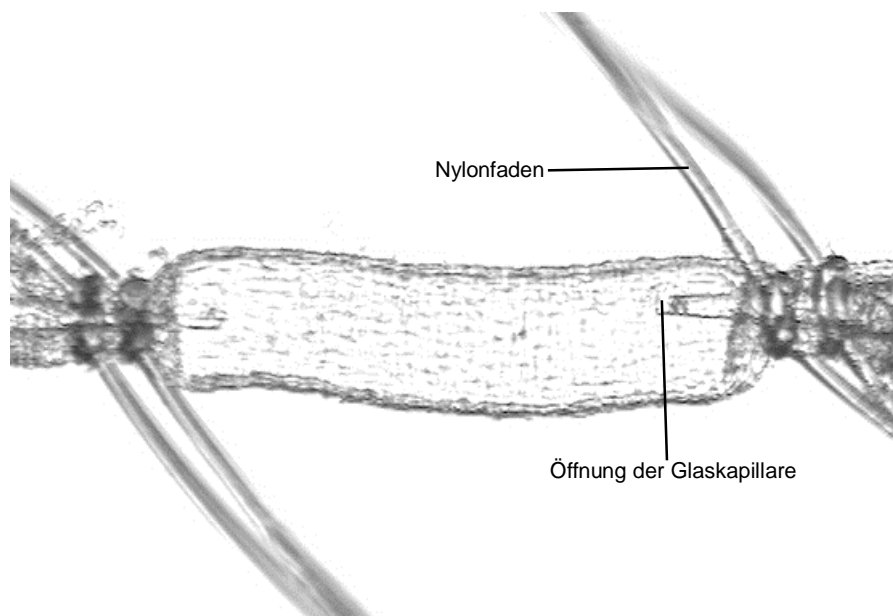
**Abbildung 2.4: Präparation der A. mesenterica superior mit distalen Aufzweigungen**

Die mit Blut gefüllten Gefäße lassen sich in teilweise freipräpariertem Zustand gut vom umliegenden Fettgewebe abgrenzen. Die Arterie kann aufgrund ihrer breiteren Wand gut von der dünnwandigen und großkalibrigen Vene unterschieden werden (Bild links). Arterie in frei präpariertem Zustand (Bild rechts).

### 2.2.3 Einsetzen des Gefäßes in die Messkammer

Vor dem Einsetzen der herauspräparierten Arterien in die Messkammer wurde diese mit zwei elongierten, auf die richtige Länge zugeschnittenen und an den Enden feuerpolierten Glaskapillaren (GB120T-8P, Science Products GmbH) bestückt. Durch Spülen der Glaskapillaren mit gefilterter, vorher auf 37 °C erhitzter PSS, konnten in den Glaskapillaren verbliebene Luftblasen beseitigt werden. Nach der Füllung der Messkammer mit kalter PSS wurden je zwei vorher aus einem dünnen Nylonfaden angefertigte Ösen an den Glaskapillaren angebracht (siehe Abbildung 2.5).

Mithilfe von geeigneten Pinzetten (Dumont 5 Biologie, Fine Science Tools) konnten die Arterien mit ihren im Durchmesser ca. 20  $\mu\text{m}$  großen Öffnungen über die Spitzen der Glaskapillaren gezogen und mit je zwei Nylonfäden befestigt werden. Nach dem Aufziehen von einem Gefäßende wurde das Gefäß vorsichtig mit gefilterter PSS durchgespült, um darin verbliebene Blutbestandteile zu entfernen. Die Arterien wurden so auf den Glaskapillaren befestigt, dass möglichst distale und bindegewebsfreie Arterienabschnitte im Messbereich platziert waren.



**Abbildung 2.5: Zwischen zwei Glaskapillaren eingespannte Arterie**

Darstellung einer Zerebralarterie, die an beiden Enden über Glaskapillaren gestülpt ist. Die Befestigung erfolgt auf beiden Seiten mit je zwei durch einen einfachen Überhandknoten fixierte Nylonfäden.

#### 2.2.4 Aufbau und Funktionsweise des Messtandes

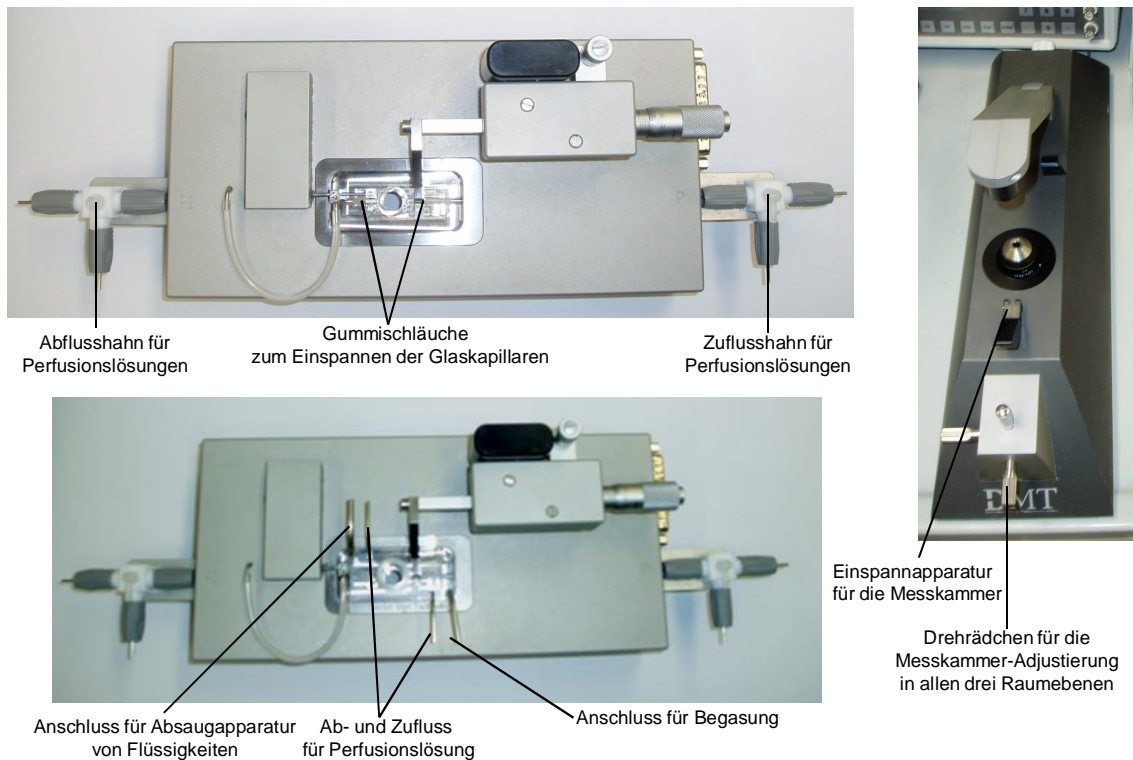
Die Gefäßmessungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Druckmyograf-System 111P (Danish Myo Technology) durchgeführt. Das System basiert auf der druckkontrollierten Perfusion eines zwischen zwei Glaskapillaren eingespannten Gefäßes, dessen Außendurchmesser-Veränderungen durch eine kontinuierliche Videoanalyse erfasst werden. Hierfür ist das System mit einem in allen drei Raumebenen adjustierbaren invertierten Auflichtmikroskop (Objektiv Zeiss Achromat 10x/0,25) mit integrierter Kamera ausgestattet.

Die Parameter Temperatur der Badlösung ( $^{\circ}\text{C}$ ), Zufluss- und Abflussdruck der Perfusionslösung (mmHg) des Gefäßes und die am Gefäß anliegende

Zugspannung werden durch in der Messkammer integrierte Sensoren während der gesamten Messung aufgezeichnet und vom Computer mit dem speziell dafür entwickelten Programm Myo View™ (Danish Myo Technology) analysiert. Verändert werden können die Parameter Temperatur, sowie Zufluss- und Abflussdruck des Gefäßes, die mit einer einstellbaren Abweichung vom Sollwert von der Apparatur ständig konstant gehalten werden. Außerdem können durch in der Messkammer eingebaute Vorrichtungen sowohl das eingespannte Gefäß perfundierende, als auch das eingespannte Gefäß umspülende Lösungen appliziert werden.

Die Druckregulation des Systems erfolgt durch die kontrollierte Zufuhr von Druckluft in zwei temperierte Behälter mit physiologischer Salzlösung, die durch eine Schlauchapparatur den Durchfluss durch das Gefäß regeln. In der Messkammer sind zwei separate Drucksensoren eingebaut, die ständig den Zufluss- / Abflussdruck am Gefäß messen und durch eine kontinuierliche Rückkopplung die Zufuhr an Druckluft in das System regulieren können. So kann der Druck im Gefäß ständig konstant gehalten werden. Um eine hohe Messgenauigkeit zu erhalten, wurde der Myograf einmal pro Monat nach einer im Handbuch beschriebenen Prozedur druckkalibriert.

Die Messkammer ist während der Messung mit einem durchsichtigen Plastikdeckel abgedeckt, in dessen Mitte sich ein unter dem Lösungsspiegel liegendes Deckgläschen befindet. Dies vermindert Störungen bei der Gefäß-Außendurchmessererfassung mittels Videomikroskopie durch z. B. auf der Lösungsoberfläche schwimmende Staubpartikel. Außerdem kann mithilfe eines im Plastikdeckel integrierten Stahlrohres eine Begasung (z. B. mit Carbogen) der das Gefäß in der Messkammer umspülenden Lösung angeschlossen werden (siehe Abbildung 2.6).



**Abbildung 2.6: Die Messkammer**

Darstellung der Apparatur zur Untersuchung von isolierten Arterien ohne Deckel (Bild oben) und mit Deckel (Bild unten). Auflichtmikroskop mit Rädchen zur Feinadjustierung der eingespannten Messkammer (Bild rechts).

### 2.2.5 Messprinzip und statistische Auswertung der myogenen Vasokonstriktion

Am in die Messkammer eingespannten, mit auf 37 °C vorgewärmter PSS perfundierten Gefäß wurde ein basaler intravaskulärer Druck von 5 mmHg appliziert. Die simultane Einstellung sowohl des am Gefäß anliegenden Zuflussdruckes als auch des Abflussdruckes ermöglichte einen dem gesamten Gefäß anliegenden annähernd isobaren intravaskulären Druck. Um möglichst physiologische Bedingungen zu ermöglichen, erfolgte während der gesamten Messung eine Begasung des Gefäßes mit Carbogen, woraus auch eine pH-Wert-Einstellung der Lösung um 7,4 resultierte. Es folgte eine ca. 20 Minuten lange Äquilibrationsphase, in der die das Gefäß umspülende PSS langsam auf 37 °C erhitzt wurde. Nach der Applikation der ca. 1 Stunde dauernden Druckleiter (Messung der myogenen Vasokonstriktion) wurde der Gefäßinnendruck wieder auf 5 mmHg reduziert. Es erfolgte der zweimalige Austausch der das Gefäß umgebenden Badlösung mit auf 37 °C temperierter kalziumfreier PSS.



Nach einer halben Stunde Inkubation wurde die Druckleiter nochmals appliziert (Messung der maximalen Gefäßdilatation). Es folgten eine Reduktion des intravaskulären Druckes auf 40 mmHg (prämyogener Bereich) und der Austausch der das Gefäß umgebenden Lösung mit vorher auf 37 °C temperierter 60 mM kaliumhaltiger PSS zur Messung der maximal möglichen Gefäßkontraktion. Um Temperatureinflüsse auf den myogenen Gefäßtonus zu verhindern, wurde die Temperatur der das Gefäß umgebenden Badlösung während den gesamten Messungen konstant auf 37 °C gehalten. Um eine gleichbleibende Gefäßspannung zu ermöglichen, erfolgte außerdem die kontinuierliche Adjustierung der Gefäßlänge während der Messungen. Bei einer anhaltenden passiven Dilatation des Gefäßes bis 120 mmHg intravaskulärem Druck bei der unter PSS applizierten Druckleiter erfolgte der Abbruch der Messung aufgrund mangelnder Myogenität.

Die Berechnung der myogenen Vasokonstriktion erfolgte separat für jeden einzelnen applizierten intravaskulären Druck im Druckbereich von 5-160 mmHg nach folgender Formel (Bai et al., 2004):

$$\text{Prozentuale Vasokonstriktion} = 100 \times [(DCa^{2+}\text{- frei} - DPSS) / DCa^{2+}\text{- frei}]$$

$DCa^{2+}\text{- frei}$  = minimaler Gefäßaußendurchmesser unter kalziumfreier PSS

$DPSS$  = minimaler Gefäßaußendurchmesser unter PSS

Die erhobenen Daten wurden mit dem Programm Origin 7.5G von der Firma OriginLab® ausgewertet.

Die durch einen unabhängigen Zwei-Proben T-Test errechneten Signifikanzen werden mit \* bei  $p \leq 0,05$ , \*\* bei  $p \leq 0,01$  und \*\*\* bei  $p \leq 0,001$  angegeben.

### 2.2.6 Eingesetzte Lösungen

Nach Applikation einiger in der Literatur beschriebener physiologischer Salzlösungen ließ sich die beste myogene Gefäßantwort an Zerebralarterien von C57BL/6J Mäusen mit Lösungen aus der Arbeit von Harm J. Knot und Mark

Nelson erzielen (Knot und Nelson, 1998). Diese Lösungen wurden für die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Gefäßmessungen eingesetzt und sind unten beschrieben.

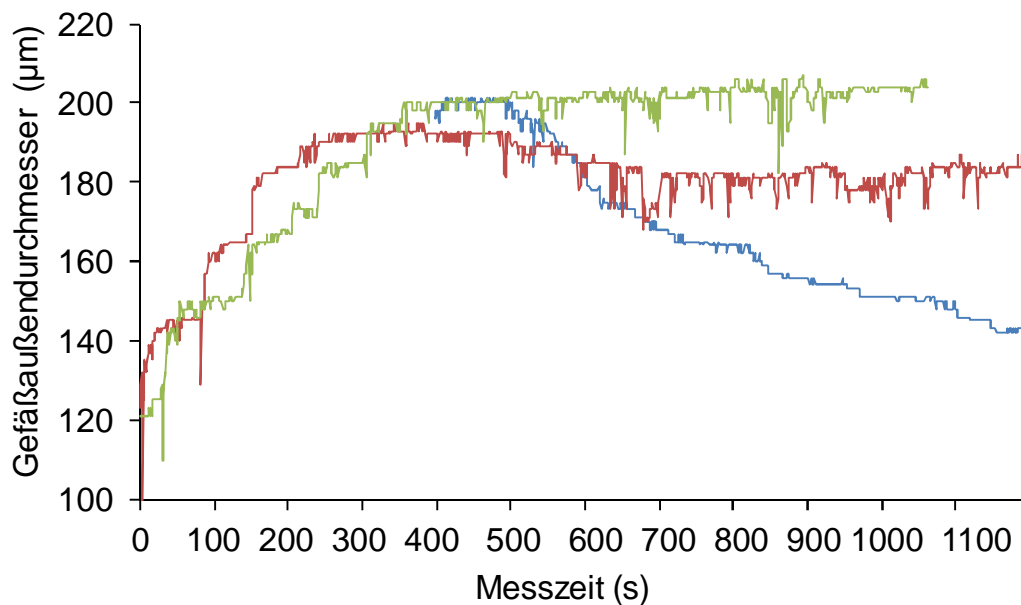
Als kalziumfreie PSS wurde die unten aufgeführte PSS ohne Zusatz von  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  verwendet. An jedem Messtag wurde die benötigte Menge dieser Lösung außerdem mit 3 mM EDTA versehen, um in der Lösung befindliche freie Kalziumionen zu binden.

Chemikalie	PSS (physiologische Salzlösung)			60 mM K-PSS-Lösung		
	MM (g / mol)	C (mol / l)	M (g) für 1 l Lösung	MM (g / mol)	C (mol / l)	M (g) für 1 l Lösung
NaCl	58,44	119	6,954	58,44	63,7	3,722
KCl	74,56	4,7	0,35	74,56	60	4,474
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136,09	1,2	0,163	136,09	1,2	0,163
$\text{NaHCO}_3$	84,01	25	2,016	84,01	25	2,1
$\text{Mg}_2\text{SO}_4$	246,48	1,2	0,296	246,48	1,2	0,296
Glukose	180,16	11,1	1,982	180,16	11,1	2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,02	1,6	0,235	147,02	1,6	0,235

- M = Masse (in Gramm)  
 MM = Molmasse (in Gramm pro Mol)  
 C = Konzentration (in Mol pro Liter)

### 2.2.7 Optimierung der eingesetzten Lösungen

Die Applikation von kalziumfreier PSS ohne Zusatz von EDTA zur Messung der maximalen Gefäßdilatation konnte die Ausbildung einer leichten myogenen Vasokonstriktion nicht komplett verhindern. Erst nach Zusatz von 3 mM EDTA zur Bindung von in der Lösung vorhandenen freien Kalziumionen kam es über den gesamten applizierten Druckbereich zur erwünschten vollständigen passiven Dilatation der Arterie (siehe Abbildung 2.7).



**Abbildung 2.7: Passive Dilatation einer Zerebralarterie**

Darstellung der Gefäß-Außendurchmesser-Veränderung bei Erhöhung des intravaskulären Druckes von 5 auf 160 mmHg in 10 mmHg Schritten. Myogene Vasokonstriktion unter PSS (blaue Linie), leichte myogene Vasokonstriktion unter kalziumfreier PSS ohne Zusatz von EDTA (rote Linie). Eine maximale passive Dilatation des Gefäßes konnte nur unter kalziumfreier PSS mit Zusatz von 3 mM EDTA zur Bindung freier, gelöster Kalziumionen beobachtet werden (grüne Linie).

### 2.2.8 Einfluss der Ein- und Auswaschung einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung auf die Stärke der nachfolgend gemessenen myogenen Vasokonstriktion

Nur 30 von 58 (das entspricht 51,7%) gemessenen Mesenterialarterien von gendefizienten und nicht gendefizienten FVB/N Mäusen bildeten eine myogene Vasokonstriktion aus. 28 von 58 (das entspricht 48,3%) der gemessenen Mesenterialarterien desselben Mäusestammes dilatierten passiv bis zum maximal applizierten intravaskulären Druck. Extravasal applizierte 60 mM kaliumhaltige Lösung verursacht eine Depolarisation der glatten Muskelzellen mit anschließender Vasokonstriktion der Arterie (Lagaud et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Testung der Hypothese, dass Gefäße, die auf extravaskuläre Applikation einer stark kaliumhaltigen Lösung mit einer Vasokonstriktion reagieren, anschließend eine myogene Vasokonstriktion auf Erhöhung des intravaskulären Druckes ausbilden. Bei Zutreffen der Hypothese würde die Selektion der eine myogene Vasokonstriktion ausbildenden Gefäße

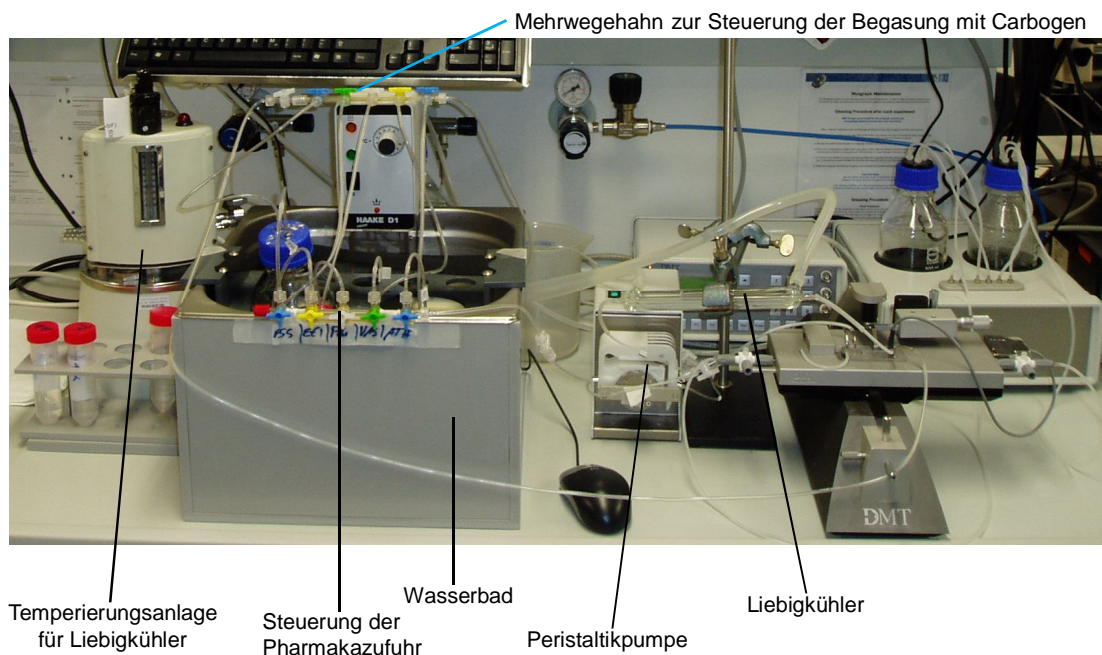
durch die vorherige Applikation von kaliumhaltiger Lösung einen wesentlich geringeren Messaufwand bedeuten.

Nach dem Einsetzen des Gefäßes in die Messkammer und Äquilibration bei 37 °C und 5 mmHg intravaskulärem Druck wurde eine vorher mit Carbogen begaste, auf 37 °C erhitzte, 60 mM kaliumhaltige physiologische Salzlösung extravaskulär für maximal 30 Sekunden appliziert und anschließend vollständig wieder ausgewaschen. Ein Teil der Gefäße reagierte auf diesen Stimulus mit Ausbildung einer Vasokonstriktion. An den übrigen Gefäßen ließ sich keine Veränderung des Außendurchmessers nachweisen. Nur an Arterien, die vasokonstriktorisch reagierten, wurde eine anschließende Messung der druckabhängigen myogenen Vasokonstriktion durchgeführt. Bei gleichwertigen Messergebnissen würde diese Methode zu einer enormen Zeitersparnis beim Messen führen. (Ergebnisse siehe Kapitel 3.2).

## 2.3 Messung der Gefäß-Außendurchmesser-Veränderung nach Applikation von Pharmaka

### 2.3.1 Konstruktion einer Apparatur zur Applikation von Pharmaka

Um Pharmaka unter möglichst physiologischen Bedingungen zu applizieren, erfolgte die Konstruktion einer hierfür geeigneten Anlage. Dies ermöglichte für eine definierte Zeitspanne das Ein- und Auswaschen einer mit Carbogen begasten, auf 37 °C temperierten, Pharmakon in einer physiologischen Wirkkonzentration enthaltenden Lösung. Hierfür wurden die in physiologischer Salzlösung gelösten Pharmaka in sterilen, 15 ml großen Plastikbechern (Sarstedt) in einem dafür hergestellten Gestell in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert. Durch in den Deckel des Plastikbechers angebrachte Öffnungen konnte jedes gelöste Pharmakon durch Schläuche separat mit Carbogen begast werden. Aus rostfreiem Stahl angefertigte Apparaturen ermöglichten außerdem die homogenere Verteilung des zugeführten Gases in den Plastikbechern (siehe Abbildung 2.8).



**Abbildung 2.8: Apparatur zur Applikation von Pharmaka**

Darstellung einer Apparatur zur Applikation von mit Carbogen begasten Lösungen, die Pharmaka in physiologischer Endkonzentration enthalten. Durch einen zwischen Wasserbad und Messkammer angeordneten, separat temperierten Liebigkühler konnte der durch die Einwaschung bedingte Temperaturabfall in der Messkammer auf  $37 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  reduziert werden.

Die Überführung der Pharmakalösung in die Messkammer erfolgte durch Plastikschräuche, gesteuert durch einen Mehrwegehahn. Eine zwischengeschaltete Peristaltikpumpe ermöglichte die kontrollierte Zufuhr und Abfuhr der Pharmaka aus der Messkammer. Die Isolation der Plastikschräuche und die Minimierung der Abstände zwischen der Messkammer und dem Pharmakareservoir konnten ein Temperaturabfall der Lösung in der Messkammer bei Pharmakazufuhr auf  $34,5 \text{ }^\circ\text{C}$  nicht verhindern. Durch einen zwischen Wasserbad und Messkammer angeordneten, separat temperierten Liebigkühler konnte die Temperaturschwankung in der Messkammer auf  $37 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  minimiert werden.

### 2.3.2 Prinzip der Pharmakaapplikation / Eingesetzte Pharmaka

Die mit Carbogen begaste und auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  temperierte pharmakaenthaltende Lösung wurde durch ein Schläuchsystem mittels Peristaltikpumpe in die Messkammer befördert. Eine einminütige Applikation ermöglichte einen kompletten Austausch der in der Messkammer vorhandenen physiologischen

Salzlösung mit der pharmakaenthaltenden Lösung. Es folgte eine sofortige dreiminütige Auswaschzeit mit temperierter, begaster PSS. Die dreimal längere Auswaschzeit ermöglichte die komplette Rückbildung der durch die Pharmakaapplikation am Gefäß hervorgerufenen Vasokonstriktion auf den Ausgangszustand. Appliziert wurden die vasokonstriktorisch wirkenden Pharmaka Angiotensin II, Vasopressin, Phenylephrin und Endothelin 1 in eben genannter Reihenfolge in der unten aufgeführten maximalen Aktivierungskonzentration für ihre entsprechenden Rezeptoren.

Zur Quantifizierung der vasokonstriktorischen Effekte der Pharmaka wurde am Ende jeder Messung nach einer sechsminütigen Auswaschzeit mit PSS eine begaste, auf 37 °C temperierte 60 mM kaliumenthaltende PSS appliziert, die eine maximale Vasokonstriktion auslöste.

<u>Pharmakon:</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Eingesetzte Endkonzentration</u>
Angiotensin II	Sigma (A9525)	100 nM
Endothelin 1	Sigma (E7764)	200 nM
Phenylephrin	Sigma (P6126)	30 µM
Arg <sup>8</sup> -Vasopressin	Sigma (V9879)	1 µM

## 2.4 Mäusegenotypisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei in der Forschung weitverbreitete Mauslinien (C57BL/6J und FVB/N) verwendet. Es wurde mit AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen von beiden Mauslinien gearbeitet. Die verwendeten gendefizienten Mäuse wurden durch Ersetzen einer 0,5 kb langen Genregion in der codierenden Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors durch ein Resistenzgen für das Antibiotikum Neomycin generiert (siehe Kapitel 1.4.2, (Ito et al., 1995)). Da sich gendefiziente und nicht gendefiziente Tiere äußerlich nicht unterschieden, erfolgte die Detektion der Genmutation bei allen verwendeten Tieren nach nachfolgend beschriebenem Prinzip.

### 2.4.1 DNA-Gewinnung mittels Mäuseschwanzverdau

Im Alter von vier Wochen wurde bei jeder Maus ein ca. 2 mm langes Stück Schwanz entfernt und die darin enthaltene genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) nach folgendem Verfahren isoliert: Das Stück Mäuseschwanz wurde über Nacht bei 55 °C in 330 µl Lysepuffer (1% SDS, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl) mit je 333 µg Proteinase K inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten nach Zugabe von 15 µg Ribonuklease A, was die Spaltung in der Lösung vorhandener einzelsträngiger Ribonukleinsäure (RNA) ermöglichte. Die Präzipitation der gelösten DNA erfolgte durch Zugabe von je 100 µl gesättigter Kochsalzlösung (35 mg NaCl in 100 ml H<sub>2</sub>O) mit anschließender Zentrifugation (30 Minuten bei 13000 U/min). Nach Abguss des flüssigen Überstandes folgte die Reinigung der am Boden des Gefäßes abgesetzten DNA mit 99% und 70% Ethanol. Die über ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknete DNA wurde schließlich in je 100 µl doppelt destilliertem Wasser gelöst und im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

### 2.4.2 DNA-Genotypisierung

Die Genotypisierung der gewonnenen DNA erfolgte durch ein als Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bekanntes Verfahren. Zur Replikation der gewünschten DNA-Segmente wurden verschiedene spezifische, ca. 21 Basen lange, einzelsträngige DNA-Sequenzen (auf engl. „Primer“ genannt) hergestellt und getestet. In der Abbildung 2.9 werden die sich als erfolgreich erwiesenen Primer-Sequenzen, der Reaktionsansatz und die angewendeten PCR-Programme dargestellt.

Je 2 µl gelöste DNA wurden in ein 0,2 ml großes PCR-Gefäß überführt und auf Eis mit 48 µl Reaktionsansatz vermischt. Von jeder Mäuse-DNA wurden anschließend zwei verschiedene PCR angefertigt. Einmal eine PCR zum Nachweis einer für den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor spezifischen Sequenz, die in nicht gendefizienten Mäusen vorhanden ist. Außerdem eine für die genetisch veränderte Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors spezifische PCR, die in AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen vorkommt (siehe Abbildung 2.9). Bei jeder PCR wurde eine Probe der Reagenzien ohne DNA als Negativkontrolle mitgeführt.

Primer	Sequenz	Sequenzlokalisierung
AT1A32	5' GAAGCCCAGGATGTTCTTGG 3'	AT <sub>1A</sub> -Rezeptor, nicht kodierende Sequenz
AT1A RM 54	5' GTGTCTGAGACCAACTCAACC 3'	AT <sub>1A</sub> -Rezeptor, kodierende Sequenz
NeoPVU	5' GGCAGCGCGGCTATCGTGG 3'	Neomycin-Resistenz-Sequenz

PCR Programm für Primer AT1A32 und AT1A RM 54

Temperatur:	Zeit:
95°C	300s
95°C	30s
55°C	30s
72°C	60s
10°C	unendlich

} 35 Zyklen

Reaktionsansatz (für 20 Proben)

Volumen	Reagenz
100µl	Taq Polymerasepuffer (10x)
20µl	dNTP'S (10mM)
75µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
20µl	Primer
20µl	Primer
722µl	H <sub>2</sub> O
6µl	Taq Polymerase

PCR Programm für Primer AT1A32 und NeoPVU

Temperatur:	Zeit:
95°C	300s
95°C	30s
55°C	30s
72°C	40s
10°C	unendlich

} 35 Zyklen

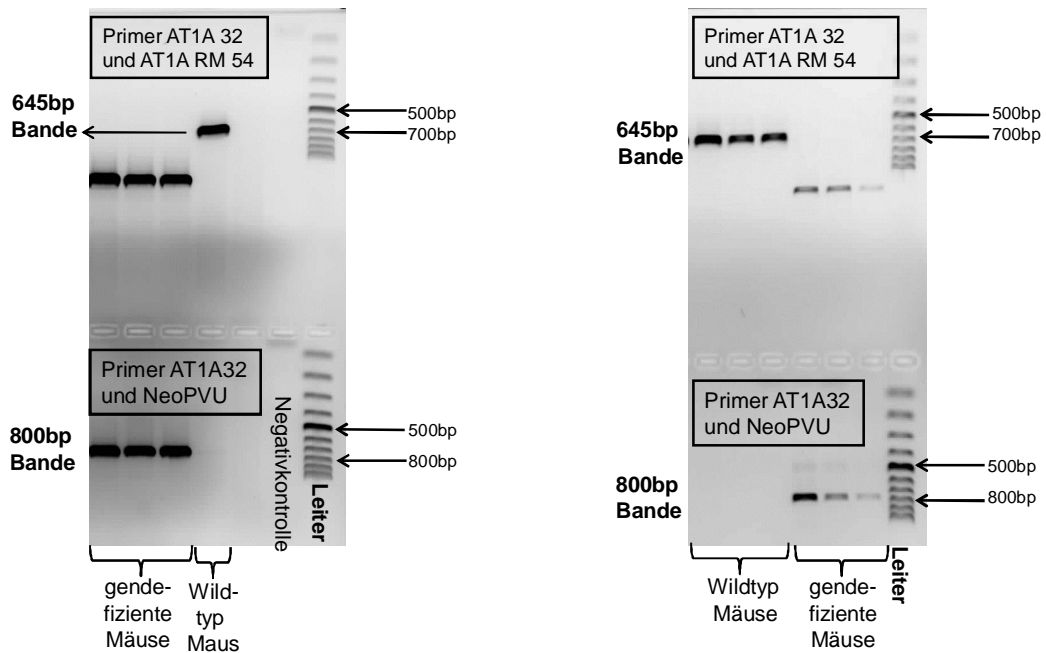
### Abbildung 2.9: Vervielfältigung der Mäuse-DNA mittels PCR

Darstellung der verwendeten Primer (Tabelle oben), des Reaktionsansatzes (Tabelle links) und der angewendeten PCR-Programme (Tabellen rechts). Durch eine PCR mit den spezifisch in der Gensequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors bindenden Primern AT1A32 und AT1A RM 54 konnte das Vorhandensein dieses Rezeptors in der Mäuse-DNA nachgewiesen werden. Durch eine PCR mit den Primern AT1A 32 und Neo PVU konnte die genetisch veränderte Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors gendefizienter Mäuse nachgewiesen werden.

### 2.4.3 DNA-Fragment-Auftrennung mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Zum Nachweis der durch die PCR vervielfältigten DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die eine negative Nettoladung besitzenden DNA-Fragmente werden hier in einem elektrischen Feld auf dem Agarosegel ihrer Länge nach aufgetrennt. Der Anteil der Agarose im Gel beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit der PCR-Produkte. Ein Gel aus 1% Agarose und 99% Tris-Acetat-Essigsäure-Puffer erwies sich für die zu erwartende Fragmentlänge als geeignet. Vor dem Auftragen von 12,5 µl der durch die PCR vervielfältigten DNA-Proben wurde 10 µl Ladepuffer hinzugefügt, um das saubere Einfüllen der Proben in die Geltaschen zu gewährleisten. Eine aus DNA-Fragmenten definierter Länge, in einem Bereich von 100 bis 1000 bp bestehende Leiter (GeneRuler™ 100 bp DNA-Leiter Fermentas) wurde zur Größenbestimmung der unbekanntenen Fragmente verwendet.





**Abbildung 2.10: DNA-Fragment-Auftrennung mittels Agarose-Gel-Elektrophorese**

Darstellung von aufgetrennten DNA-Fragmenten von FVB/N (Bild links) und C57BL/6J Mäusen (Bild rechts). DNA aus homozygoten, nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten „Wildtyp“-Mäusen erzeugt eine 645 bp lange Bande (PCR mit den Primern AT1A 32 und AT1A RM 54), aber keine 800 bp lange Bande (PCR mit den Primern AT1A 32 und Neo PVU). DNA aus homozygoten  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen erzeugt keine 645 bp lange Bande (PCR mit den Primern AT1A 32 und AT1A RM 54), aber eine 800 bp lange Bande (PCR mit den Primern AT1A 32 und Neo PVU). Durch die PCR unveränderte DNA stellt sich als unterhalb des Bereichs der Leiter gelegene Bande dar.

Nach der Auftrennung konnten die DNA-Fragmente durch vorher in das Gel eingebrachtes Ethidiumbromid, das sich in die DNA-Doppelstränge interkaliert, unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht werden. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse konnten so entweder als homozygote nicht gendefiziente Mäuse oder als homozygote  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefiziente Mäuse charakterisiert werden. In der Abbildung 2.10 sind die zu erwartenden Banden erklärt.

## 2.5 Herstellung eines Plasmids mit einem Fluoreszenzprotein und AT<sub>1A</sub>-Rezeptor

### 2.5.1 Klonierungsstrategie

Ziel dieser Versuchsreihe war es, mit molekularbiologischen Methoden ein Plasmid herzustellen, das den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor und ein fluoreszierendes Protein enthält. Es stand die codierende Gensequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors von *Mus musculus* enthaltende Plasmid pBC12MI zur Verfügung. Als fluoreszierende Proteine wurden das erweiterte gelbe Fluoreszenzprotein (EYFP) und das erweiterte grüne Fluoreszenzprotein (EGFP) verwendet, die in separaten Plasmiden des Typs pcDNA3.1/V5-His-TOPO vorlagen. Die codierende Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors sollte durch zwei passende Enzyme extrahiert und in das Plasmid mit dem jeweiligen Fluoreszenzmolekül eingefügt werden (Umklonierung).

Um einen anschließenden Funktionsverlust wichtiger Sequenzen (Rezeptor-Sequenz, EYFP-Sequenz, Antibiotika-Resistenz-Sequenzen) im Zielplasmid zu vermeiden, durfte keine der verwendeten Enzymschnittstellen innerhalb dieser Sequenzen vorkommen. Durch das Programm Fast Digest™ konnten in den Plasmiden vorhandene, häufig vorkommende Enzymschnittstellen ermittelt werden. Die Nukleotidsequenz des Plasmids pcDNA3.1/V5-His-TOPO konnte vom Hersteller Fermentas und die Nukleotidsequenz des mAT<sub>1A</sub>-Rezeptors konnte durch die Datenbank PubMed unter folgender Adresse ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_177322.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_177322.3)) bezogen werden. Geeignete Enzymschnittstellen der Enzyme Kpn I am Anfang der mAT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Sequenz und Xho I am Ende der mAT<sub>1A</sub>-Rezeptorsequenz konnten ermittelt werden. Im Zielplasmid pcDNA3.1/V5-His-TOPO war die Schnittstelle für das Enzym Kpn I, aber leider keine Schnittstelle für das Enzym Xho I vorhanden. Ein „ortsspezifische Mutagenese“ genanntes, im folgenden Abschnitt genauer beschriebenes Verfahren wurde angewendet, um die fehlende Enzymschnittstelle in das Zielplasmid einzufügen.

### 2.5.2 Einfügen einer Enzymschnittstelle mittels Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese beschreibt ein Verfahren, bei dem kurze DNA-Sequenzen vervielfältigt und an einer spezifischen Stelle in ein Plasmid eingefügt werden können. Durch das Programm QuikChange® Primer Design (Agilent Technologies Inc.) konnten zwei für die Mutagenese benötigte, die gewünschte Enzymschnittstelle enthaltende kurze DNA-Sequenzen (engl. „Primer“) erstellt werden. Beide Primer entstanden aus je 40 Basen, um eine hohe Passgenauigkeit zum entsprechenden DNA-Komplementärstrang auf dem Plasmid zu ermöglichen. Der Ablauf der Vervielfältigung dieser Primer mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird folgend beschrieben:

In ein 0,2 ml großes PCR-Gefäß wurde ca. 50 ng DNA des den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor enthaltenden Plasmids, ca. 10 pmol der beiden die Enzymschnittstelle für das Enzym Xho I enthaltenden Primer, und die Reagenzien des QuikChange Mutagenese-Kits (Stratagene) pipettiert. Nach Zugabe der PfuTURBO DNA-Polymerase (Stratagene) wurde das veränderte Plasmid durch Applikation eines spezifischen PCR-Programmes vervielfältigt.

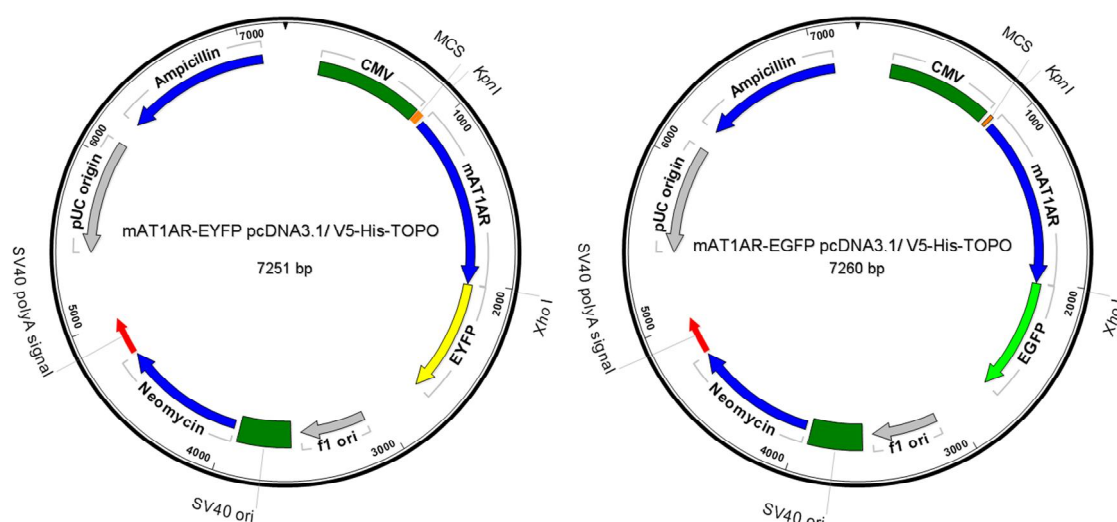
Es folgte ein Verdau mit dem Enzym Dpn I zum Abbau methylierter DNA-Reste. Anschließend wurde die im Mutageneseansatz vorhandene DNA mit Natriumacetat präzipitiert, aufgereinigt und in destilliertem Wasser gelöst. Zur Kontrolle des mittels Mutagenese neu entstandenen Plasmids wurde ein Testverdau mit den Enzymen Kpn I und Xho I durchgeführt. In einer anschließenden Auftrennung der entstandenen Fragmente mittels Agarose-Gel-Elektrophorese konnte das erwartete Fragment spezifischer Länge nachgewiesen werden.

### 2.5.3 Umklonierung der mAT<sub>1A</sub>-Rezeptor DNA-Sequenz

Um den DNA-Abschnitt, der die codierende Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors enthält, aus dem Plasmid pBC12MI in das Plasmid pcDNA3.1/V5-His-TOPO zu überführen, wurden beide Vektoren mit den vorher ausgewählten Enzymen Xho I und Kpn I inkubiert. Die entstandenen DNA-Fragmente konnten in einer anschließenden Agarose-Gel-Elektrophorese isoliert und durch ein als Gelextraktion bekanntes Verfahren vom Agarosegel separiert werden.

Das Einfügen des DNA-Fragments, das die Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors enthielt, in das Zielpasmid (auch „Ligation“ genannt), erfolgte durch Zugabe des Enzyms T4 Ligase (und T4 Ligasepuffer, Fermentas) mit Inkubation des Reaktionsansatzes über Nacht bei 16 °C. Zur Vervielfältigung des neu entstandenen Plasmids wurde der Ligationsansatz in kompetente bzw. transformierbare Bakterien eingeschleust und auf Agarplatten bei 37 °C angezchtet. Da der Vektor eine Ampicillinresistenz aufweist, wurden die Agarplatten mit dem Antibiotikum Ampicillin beimpft. Dies ermöglichte das selektive Heranwachsen von Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, denn die übrigen Bakterien wurden durch das Antibiotikum vernichtet. Nach Heranwachsen von sichtbaren Bakterienkolonien wurden diese einzeln zur weiteren Vervielfältigung steril in ein Gefäß mit Flüssigmedium und 0,1% Ampicillin überführt und in einem Schüttler über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Nach sichtbarer Trübung des Flüssigmediums wurde die DNA unter Verwendung des NucleoBond Miniprep Kit (Macherey-Nagel) aus den Bakterien isoliert, aufgereinigt und anschließend in destilliertem Wasser gelöst. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Proben erfolgte fotometrisch, basierend auf einem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm.



**Abbildung 2.11: Neu generierte Plasmide mit AT<sub>1A</sub>-Rezeptor und EYFP (Bild links) bzw. EGFP (Bild rechts).**

Schemazeichnung der neu generierten Plasmide mit codierender Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors und der direkt nachfolgenden Sequenz der Fluoreszenzproteine EYFP bzw. EGFP. Die codierende Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors wurde mit den Enzymen KpnI und XhoI in die Plasmide eingefügt. Die Plasmide beinhalten Sequenzen für eine Resistenz gegen die Antibiotika Ampicillin und Neomycin.

## 2.6 Generierung einer stabil den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimierenden Zelllinie

### 2.6.1 Zellkultur

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden CHO-K1-Zellen (eine Zelllinie aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters) verwendet. Die Kultivierung der Zellen fand im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt der Luft von 5% statt. Als Nährmedium diente Ham's F12 Kulturmedium (PAA laboratories). Vor der Verwendung wurde das Nährmedium mit ca. 10% fetalem Kälberserum (Gibco) sowie mit 10 U ml<sup>-1</sup> Penicillin und 100 µg ml<sup>-1</sup> Streptomycin (Carl Roth GmbH) angereichert. Die Zellen wurden in 250 ml großen Kulturflaschen (Sarstedt) kultiviert. Bei einer Konfluenz der auf dem Flaschenboden adhärenen Zellen von 80-90% wurden



**Abbildung 2.12: Arbeitsplatz zur Kultivierung von Zellen**

die Zellen mit einer 0,02% EDTA-haltigen 0,05% Trypsinlösung (PAA laboratories) vom Flaschenboden abgelöst und in verschiedenen Verdünnungen (1:20 und 1:40) in weitere Kulturflaschen verteilt.

### 2.6.2 Transfektion von plasmidförmiger DNA

Für die Transfektionen (Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen) wurde das Transfektionsmittel FuGENE® HD (Roche), eine Suspension aus vorwiegend polykationischen Lipiden, verwendet. Je 100000 CHO-K1 Zellen wurden in Plastikschrälchen (35 mm Ø, Nunc) für 48 Stunden kultiviert. Ungefähr 1 µg Plasmid-DNA wurde in fetalem, kälberserumfreien Kulturmedium mit der dreifachen Menge des Transfektionsmittels FuGENE® HD (Roche) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in die Plastikschrälchen mit den Zellen überführt.

Durch Einsetzen eines Plasmids mit DNA-Sequenz des Fluoreszenzproteins EYFP bzw. EGFP konnte wenige Stunden nach einer erfolgreichen Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie (Anregung mit einem Licht von 514 nm Wellenlänge) eine intrazellulär gelegene Fluoreszenz nachgewiesen werden. Leider erwies sich trotz mehrmaliger Wiederholung die Transfektion der das erweiterte grüne Fluoreszenzprotein (EGFP) beinhaltenden Zellen CHO-K1-pcDNA3.1/V5-His-TOPO-mAT<sub>1A</sub>R-EGFP als nicht stabil, sodass die Arbeit mit dieser Zelllinie eingestellt wurde. Bei dem Fluoreszenzprotein EYFP trat diese Problematik nicht auf, sodass die Arbeit mit Zellen, die dieses erfolgreich transfizierte Plasmid enthielten, fortgesetzt wurde.

### 2.6.3 Generierung einer stabil den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimierenden Zelllinie

Das den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor beinhaltende, neu generierte Plasmid pcDNA3.1/V5-His-TOPO-mAT<sub>1A</sub>R-EYFP konnte mit der oben beschriebenen Prozedur erfolgreich in CHO-K1 Zellen transfiziert werden. Zwei Tage nach der Transfektion wurde eine polyklonale Selektion zur Auslese der erfolgreich transfizierten Zellen durchgeführt. Da das Plasmid eine Resistenz gegen das Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (Synonym: G-418, PAA laboratories) aufwies, wurde dieses in einer Endkonzentration von 800 µg/ml dem jeweiligen Kulturmedium zugesetzt. Nur Zellen, die das transfizierte Plasmid mit enthaltenem Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum erfolgreich ins zelluläre Genom eingebaut hatten, konnten überleben. Am zweiten bis vierten Tag nach Selektionsbeginn starben insgesamt 55-90% der Zellen. Bei einer Kontrolle der Transfektionsrate durch Fluoreszenzmikroskopie konnte jedoch nur in ungefähr

der Hälfte der überlebenden Zellen eine intrazelluläre Fluoreszenz detektiert werden, was eine weitere Selektion der Zellen erforderte.

Zur weiteren Auslese erfolgte deshalb eine monoklonale Selektion. Hierfür wurden die Zellen einzeln in 96-Loch-Schalen aus Plastik (Sarstedt) ausgesät und angezchtet. Aus Einzelzellen gewachsene ausnahmslos eine intrazelluläre Fluoreszenz aufweisende Zellansammlungen wurden zur weiteren Proliferation in Kulturplatten mit größeren Schalen (Sarstedt) und schließlich in 250 ml große Kulturflaschen (Sarstedt) überführt. Durch diese Methode konnte eine stabile Zelllinie mit erfolgreich transfiziertem Plasmid hergestellt werden.

## 2.7 Expressionsverminderung des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors mittels siRNA

### 2.7.1 Genereller Versuchsablauf

Ziel dieses Versuches war die Minderung der Genexpression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors durch spezifisch gegen diesen Rezeptor gerichtete siRNA in einer stabil diesen Rezeptor exprimierenden CHO-K1 Zelllinie. Da die intrazelluläre Gensequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors physikalisch an die Gensequenz des fluoreszierenden Proteins EYFP gekoppelt war, konnte die gemessene Minderung der EYFP-Fluoreszenz als Maß für die Abnahme der Genexpression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors verwendet werden. Zwei verschiedene, gegen die AT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Sequenz und die EYFP-Sequenz gerichtete siRNA jeweils mit und ohne endständige Schutzgruppen, standen zur Verfügung. An das Ende der RNA-Sequenz gebundene, so genannte „Schutzgruppen“, verhindern durch Stabilisierung der RNA-Sequenz den enzymatischen Abbau und können aus Zuckern bestehen, wie in unserem Fall dem Methyl.

Alle siRNA-Sequenzen waren mit der Sequenz des Fluoreszenzproteins Cy 5 (Cyaninderivat) gekoppelt. Die erfolgreiche Transfektion der siRNA in die Zellen konnte so durch eine intrazelluläre Fluoreszenz, die mit einer anderen Wellenlänge angeregt wurde als die EYFP-Fluoreszenz, nachgewiesen werden. Das Fluoreszenzprotein Cy 5 emittiert bei Anregung mit ca. 630-640 nm langem Licht eine rote Fluoreszenz von 650-670 nm Wellenlänge.

Getestet wurde jede siRNA in den Endkonzentrationen von je 50, 100 und 200 nM zu Einwirkzeiten von 24 und 48 Stunden. Als Positivkontrolle dienten nicht mit siRNA transfizierte, den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimierende CHO-K1 Zellen. Als Negativkontrolle dienten mit siRNA transfizierte, native, nicht den mAT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimierende CHO-K1 Zellen. Länger als 48 Stunden andauernde Einwirkzeiten der siRNA auf die Zellen, wie z. B. 72 Stunden, wurden nach initialer Testung nicht für die Hauptexperimente verwendet, da hier die enorme Zelldichte eine genaue Fluoreszenzbestimmung nicht mehr ermöglichte.

#### RNA-Sequenzen der im Ergebnisteil aufgeführten siRNA:

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Sequenz:</u>
Anti-AT <sub>1A</sub> R siRNA 1	5' #accaagcuguuuccaaaua**uauuuggaaacagcuuggu** 3'
Anti-AT <sub>1A</sub> R siRNA 2	5' #ggagcuggaggaaauacuu**aaguauuccuccagcucc** 3'
Anti-EYFP siRNA 1	5' #ggcuacguccaggagcgca**ugcgcuccuggacguagcc** 3'
Anti-EYFP siRNA 2	5' #cuacaacagccacaacguc**gacguuguggcuguuguag** 3'

\* Thymin-2'-desoxyribosid

# Cy 5 (Fluoreszenzmolekül aus der Gruppe der Cyanine)

Die siRNA wurde über die Firma BioSpring GmbH aus Frankfurt am Main bezogen.

### **2.7.2 Transfektion von siRNA-Sequenzen**

Die 47 Basen langen siRNA-Sequenzen wurden mithilfe des Transfektionsmittels X-tremeGENE siRNA (Roche) in Plastikschälchen (35 mm Ø, Nunc) mit je 50000 auf Glasplättchen 24 Stunden kultivierten CHO-K1-Zellen transfiziert. Um saubere Arbeitsbedingungen zu ermöglichen, wurde der für die Transfektion genutzte Arbeitsplatz und die eingesetzten Pipetten vorher gründlich mit diethylpyrocarbonathaltigem, weitestgehend ribonukleasefreiem Wasser gereinigt. Weiterhin kamen nur ribonukleasefreie, mit einem Filter versehene Pipettenspitzen zum Einsatz. Die siRNA-Stammlösung wurde nach Zugabe von ribonukleasefreiem Wasser in der Konzentration von 100 µM bei -80 °C gelagert, um einem enzymatischen Abbau der Sequenzen durch Ribonukleasen entgegenzuwirken. Durch die niedrige Temperatur (-80 °C) kann



die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus der RNA-Sequenzen wesentlich verringert werden.

Die gewünschten Mengen an siRNA und Transfektionsmittel wurden in je 100  $\mu$ l angewärmtes Ham's F12 Zellkulturmedium (Sarstedt) ohne fetales Kälberserum gegeben. Nach sofortiger Vermischung des Inhalts beider Gefäße folgte die Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde das Medium vorsichtig in die Plastikschaale mit den Zellen überführt.

### **2.7.3 Fluoreszenzmessung am konfokalen Lasermikroskop**

Genau 24 und 48 Stunden nach Transfektion der siRNA in die Zellen konnte die Fluoreszenz des von den Zellen exprimierten Proteins EYFP und des an die siRNA-Sequenz gebundenen Proteins Cy 5 am konfokalen Lasermikroskop gemessen werden. Die Messung erfolgte unter physiologischen Bedingungen an lebenden Zellen. Das Glasplättchen mit den anheftenden Zellen wurde in eine selbst gebaute Messkammer eingespannt und mit auf 37 °C erwärmtem Zellkulturmedium (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, DMEM, Gibco) während der Messung bedeckt gehalten.

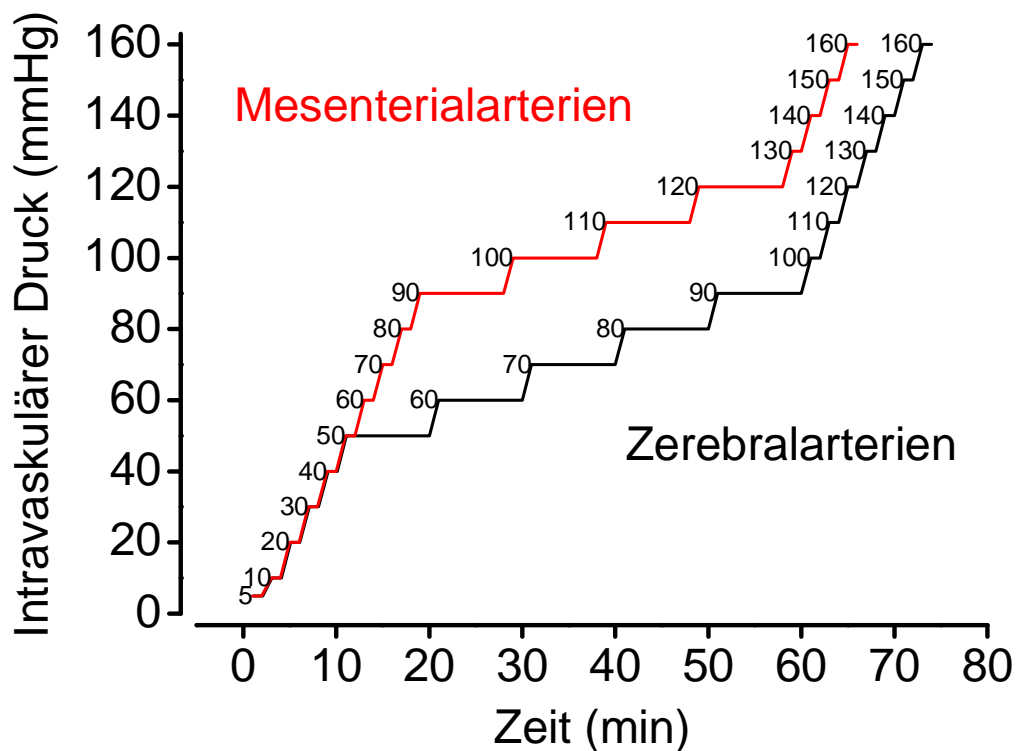
Durch die nacheinander stattfindende spezifische Anregung der Fluoreszenzproteine EYFP (mit 514 nm) und Cy 5 (mit 633 nm) konnte eine Überlagerung der Fluoreszenzen verhindert werden. Alle Messungen wurden mit demselben Objektiv (Plan-APOCHROMAT 20x/ 0,75, Zeiss) und den gleichen Einstellungen durchgeführt. Das Programm LSM 510 Meta, Carl Zeiss wurde für die Auswertung der Fluoreszenzdaten verwendet. Für eine Versuchsreihe konnte die Gesamtfluoreszenz von je 100 vollständig abgebildeten Zellen durch manuelles Einkreisen der Messbereiche bestimmt werden.

## 3.) Ergebnisse

### 3.1 Erstellung einer Druckleiter zur Messung der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion an Zerebral- und Mesenterialarterien

Die Messung der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion erfolgte unter flusskonstanten Bedingungen mit Berücksichtigung des nahezu gesamten physiologischen, dem Menschen ähnlichen arteriellen Druckbereichs von Mäusen. Eine Literaturrecherche zum intravaskulären Druckbereich ergab die flusskonstante Applikation von 10-100 mmHg bzw. 10-110 mmHg intravaskulärem Druck in Zerebralarterien von Mäusen (Bai et al., 2004; Knot und Nelson, 1998). Erste Messungen an Mäusezerebralarterien mit Applikation einer von 0-160 mmHg reichenden Druckleitersequenz (in 10 mmHg-Schritten) mit Messintervallen von jeweils 120 Sekunden zeigten, dass die Zeitintervalle von 120 Sekunden für eine ausreichende Stabilisierung des Gefäßes im myogenen Druckbereich zu kurz gewählt waren, da die maximale myogene Vasokonstriktion bei den jeweiligen Drücken nicht vor Ende der Sequenz erreicht wurde.

Eine Verlängerung der Messsequenzen im myogenen Bereich auf 600 Sekunden ermöglichte die zuverlässige Ermittlung der jeweiligen maximalen myogenen Vasokonstriktion des Gefäßes bei diesen Druckstufen. Bei den Zerebralarterien von Mäusen lag der myogene Bereich, d. h. der Druckbereich mit Beginn einer anhaltenden myogenen Vasokonstriktion, bei wesentlich niedrigeren Drücken von ca. 50-90 mmHg als bei Mesenterialarterien. Die Länge der Messsequenzen für Mesenterialarterien wurde deshalb abgeändert, da hier eine myogene Vasokonstriktion erst ab ca. 90 mmHg auftrat (siehe Abbildung 3.1). Da das in die Messkammer eingespannte Gefäß bei dem Anfangsdruck der Druckleiter von 0 mmHg kollabierte, wurde dieser auf 5 mmHg erhöht.



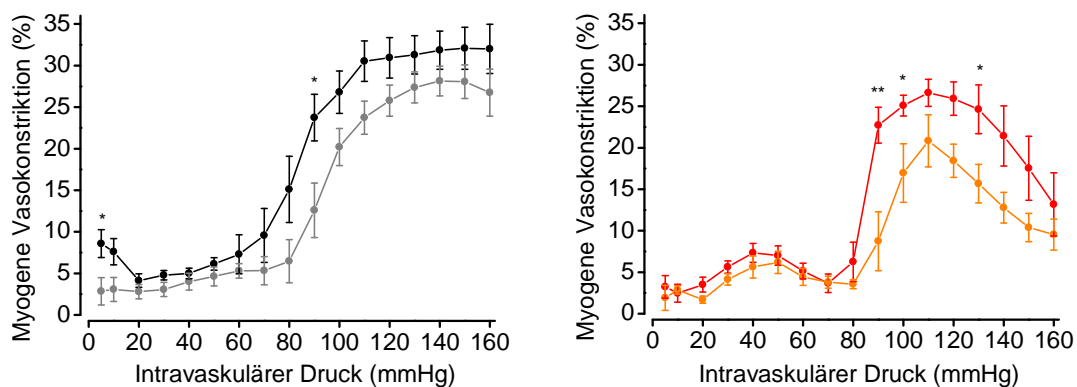
**Abbildung 3.1: Druckleiter-Protokolle**

Schematische Darstellung der erstellten Druckleiterprotokolle für die Messung der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion von Mesenterialarterien (rote Linie) und Zerebralarterien (schwarze Linie). Ausgehend von einem basalen intravaskulären Druck von 5 mmHg wurden Drücke von 10-160 mmHg in 10 mmHg Schritten appliziert. Zu Beginn des myogenen Bereiches wurde jede Druckstufe 600 Sekunden lang und bei den übrigen Drücken je 120 Sekunden lang appliziert. Die niedrigsten intravaskulären Drücke mit Ausbildung einer myogenen Vasokonstriktion lagen bei Zerebralarterien mit ca. 50-90 mmHg in einem tieferen Druckbereich als bei Mesenterialarterien mit 90-120 mmHg.

### 3.2 Einfluss der Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen PSS auf die Stärke der anschließend gemessenen druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Testung der Hypothese, dass Gefäße, die auf extravaskuläre Applikation einer stark kaliumhaltigen Lösung mit einer Vasokonstriktion reagieren, anschließend eine myogene Vasokonstriktion auf Erhöhung des intravaskulären Druckes ausbilden. Bei Zutreffen der Hypothese würde die Selektion der eine myogene Vasokonstriktion ausbildenden Gefäße durch die vorherige Applikation von kaliumhaltiger Lösung einen wesentlich geringeren Messaufwand bedeuten.

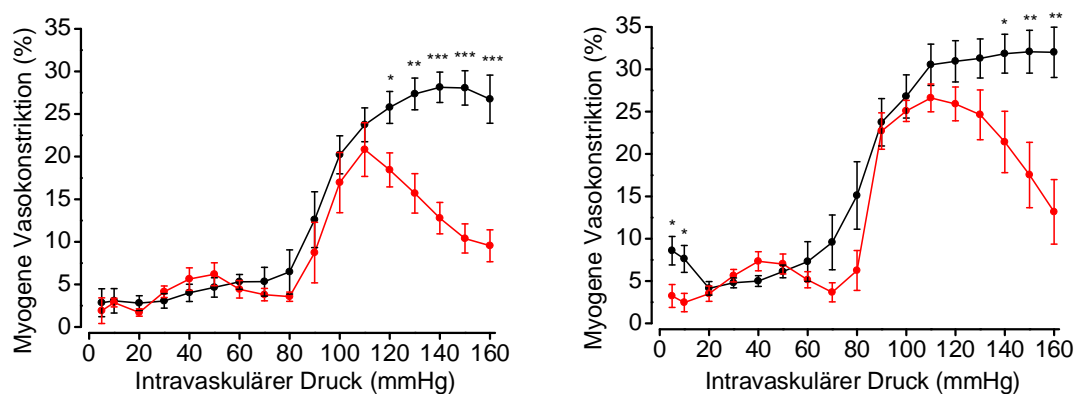
An Mesenterialarterien von *nicht* AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen zeigte sich mit und ohne vorheriger Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung nur bei 5 mmHg und 90 mmHg intravaskulärem Druck ein einfach ( $p \leq 0,05$ ) signifikanter Unterschied in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion. In allen restlichen Druckbereichen konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. An Mesenterialarterien von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen wurde allerdings ein hoch signifikanter Unterschied ( $p = 0,004$ ) bei 90 mmHg und ein signifikanter ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied bei 100, 120 und 130 mmHg intravaskulärem Druck festgestellt. Die Durchschnittswerte der myogenen Vasokonstriktion mit vorheriger Ein- und Auswaschung einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung lagen homogen über denen der Vergleichsgruppe (siehe Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2: Myogene Vasokonstriktion von Mesenterialarterien aus AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten (Bild rechts) und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten (Bild links) Mäusen**

Der linke Teil der Abbildung zeigt die myogene Vasokonstriktion mit (schwarze Linie) und ohne (graue Linie) vorherige Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die myogene Vasokonstriktion mit (rote Linie) und ohne (orange Linie) vorherige Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung. Die Messungen wurden *in vitro* an nach der 2. und 3. Aufzweigung der A. mesenterica superior lokalisierten, isolierten Mesenterialarterien aus drei Monate alten, männlichen FVB/N Mäusen durchgeführt. Während den Messungen lag kein Gefäßdurchfluss vor. Mit bzw. ohne Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung erfolgte die Messung von 7 bzw. 8 Gefäßen, die aus 5 bzw. 6 nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen entnommen wurden. Mit und ohne Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung erfolgte die Messung von 8 bzw. 7 Gefäßen, die aus 6 bzw. 5 AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen entnommen wurden.

Sowohl mit, als auch ohne vorherige Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung kann bei hohen intravaskulären Drücken ein signifikanter Unterschied in der myogenen Vasokonstriktion von Mesenterialarterien von nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten und  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten männlichen, drei Monate alten FVB/N Mäusen nachgewiesen werden. Bei Messungen ohne vorherige Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung wurde allerdings ein höheres Signifikanzniveau erreicht und das bei einem niedrigeren intravaskulären Druck von 120 mmHg (anstatt 140 mmHg) (siehe Abbildung 3.3). Nach Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung zeigte sich bei intravaskulären Drücken von 5 und 10 mmHg eine unphysiologisch hohe Differenz in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion.



**Abbildung 3.3 : Myogene Vasokonstriktion mit (Graph rechts) und ohne (Graph links) Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung vor den Messungen**

Myogene Vasokonstriktion von Mesenterialarterien aus  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten (rote Linien) und nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten (schwarze Linien) Mäusen. Die Messungen wurden *in vitro* an nach der 2. und 3. Abzweigung der A. mesenterica superior lokalisierten, isolierten Mesenterialarterien aus drei Monate alten, männlichen FVB/N Mäusen durchgeführt. Während den Messungen lag kein Gefäßdurchfluss vor. Mit und ohne Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung erfolgte die Messung von 7 bzw. 8 Gefäßen, die aus 5 bzw. 6 nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen entnommen wurden. Mit und ohne Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung erfolgte die Messung von 8 bzw. 7 Gefäßen, die aus 6 bzw. 5  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen entnommen wurden.

In Anbetracht dieser Ergebnisse ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

1.) Eine vorherige Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung verhindert nicht die Ausbildung einer nachfolgenden myogenen Vasokonstriktion. Dies bestätigen vorhergehende ähnliche Messungen: druckmyografisch konnte an isolierten Mesenterial- und Zerebralarterien von Ratten auch nach Applikation

einer 46 bzw. 120 mM kaliumhaltigen Lösung eine myogene Vasokonstriktion gemessen werden (McCarron et al., 1997; Wesselman et al., 1996).

2.) Die Stärke der myogenen Gefäßantwort scheint nach einer vorherigen kurzen Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung genotypunabhängig um etwa im Durchschnitt 5% verstärkt zu sein. Ursächlich hierfür könnte eine durch Applikation der stark kaliumhaltigen Lösung ausgelöste Kalziumsensitivierung sein (Bai et al., 2004). Auch eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen auf der GMZ-Membran, ausgelöst durch die Membrandepolarisation nach Applikation der stark kaliumhaltigen Lösung wird diskutiert (Davis und Hill, 1999).

Die vorherige Applikation einer 60 mM kaliumhaltigen Lösung eignet sich somit als zeitsparende Methode zum Vergleich der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion an isolierten Arterien. Der genaue Zusammenhang zwischen der extravaskulären Applikation einer stark kaliumhaltigen Lösung und der GMZ-Kontraktion ist allerdings noch Gegenstand der aktuellen Forschung.

### 3.3 Myogene Vasokonstriktion an Arterien von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen

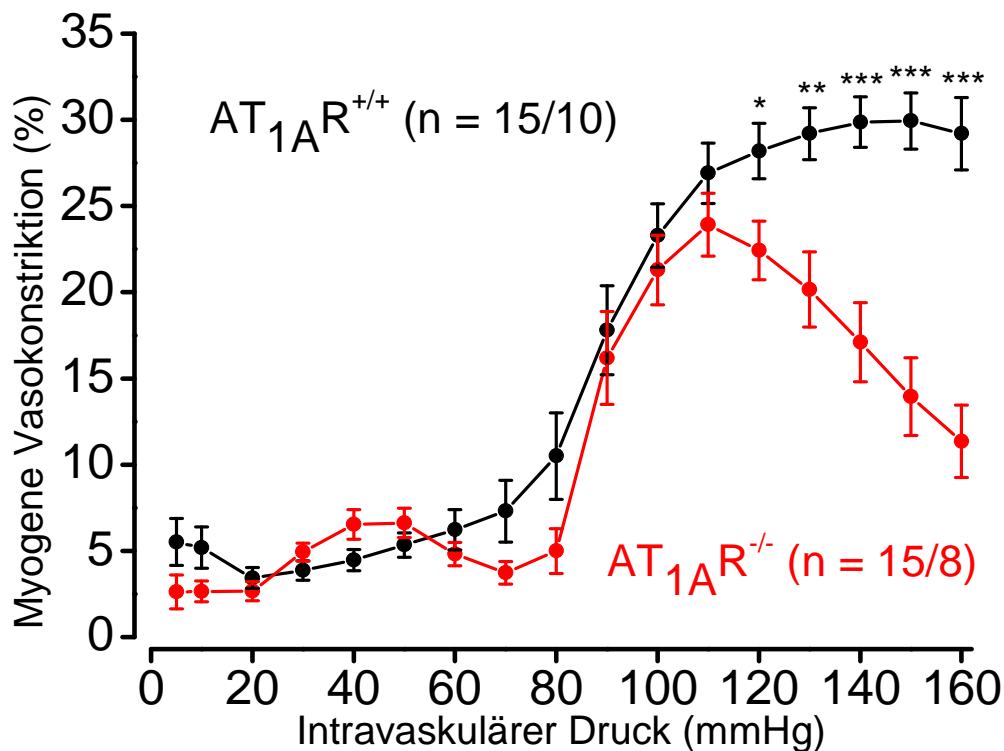
Es erfolgte der Vergleich der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion von Mesenterialarterien (siehe Kapitel 3.3.1) und Zerebralarterien (siehe Kapitel 3.3.2) aus AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen. Es wurden Tiere der häufig in der Forschung verwendeten Mäuserassen FVB/N und C57BL/6J benutzt. Um den physiologischen arteriellen Druckbereich der Maus vollständig abzudecken, wurden intravaskuläre Drücke von 5 mmHg bis 160 mmHg appliziert. Während den Messungen lag kein Gefäßdurchfluss vor. Für die Messungen wurden nach der 2. und 3. Aufzweigung der A. mesenterica superior lokalisierte Arterien sowie distale Abschnitte der A. cerebri posterior und A. cerebelli superior verwendet.

#### 3.3.1 Verminderte myogene Vasokonstriktion an Mesenterialarterien:

##### **FVB/N Mäuse**

Der Vergleich der myogenen Vasokonstriktion von Mesenterialarterien aus drei Monate alten, männlichen AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten FVB/N Mäusen mit Gefäßen aus nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten FVB/N Mäusen gleichen Alters und Geschlechts zeigte folgende Gemeinsamkeiten und Unterschiede:

Im Druckbereich von 5 mmHg bis 110 mmHg konnte kein signifikanter Unterschied in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion nachgewiesen werden. Bei hohen intravaskulären Drücken wurde ein signifikanter, bis zum maximal gemessenen intravaskulären Druck von 160 mmHg zunehmender Unterschied in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion zwischen den beiden Vergleichsgruppen gemessen. Dieser Effekt war bei einem intravaskulären Druck von 120 mmHg signifikant ( $p = 0,020$ ), bei 130 mmHg hoch signifikant ( $p = 0,002$ ) und bei 140 mmHg bis 160 mmHg höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ) (siehe Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Myogene Vasokonstriktion von Mesenterialarterien von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten FVB/N Mäusen**

Darstellung der myogenen Vasokonstriktion von Mesenterialarterien von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten (AT<sub>1A</sub>R<sup>-/-</sup>) und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten (AT<sub>1A</sub>R<sup>+/+</sup>) FVB/N Mäusen bei zunehmendem intravaskulären Druck. Die myogene Vasokonstriktion bei einem bestimmten intravaskulären Druck wird als relative prozentuale Verminderung des Gefäßaußendurchmessers in maximal kontrahiertem Zustand im Vergleich zum maximal dilatierten Zustand angegeben. Die Messungen wurden *in vitro* an nach der 2. und 3. Aufzweigung der A. mesenterica superior lokalisierten Mesenterialarterien aus drei Monate alten, männlichen FVB/N Mäusen durchgeführt. Während den Messungen lag kein Gefäßdurchfluss vor. n steht für die Anzahl der gemessenen Gefäße und dahinter die Anzahl der Mäuse, aus denen diese Gefäße entnommen wurden. Die Signifikanz sind mit \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  angegeben.

Die Stärke der myogenen Vasokonstriktion der Mesenterialarterien lag im prämyogenen Bereich bei intravaskulären Drücken von 5 mmHg bis 70 mmHg unter 10% (zur Berechnungsmethode der myogenen Vasokonstriktion siehe Kapitel 2.2.5). Von 70 mmHg bis 110 mmHg intravaskulärem Druck stieg die myogene Vasokonstriktion in beiden Vergleichsgruppen kontinuierlich bis auf einen Wert von ca. 25% an. Ab 120 mmHg nahm der Unterschied in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion in beiden Vergleichsgruppen weiter zu. In Gefäßen von nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen verstärkte sich die myogene Vasokonstriktion bis zu einem Maximalwert von 29,9% bei

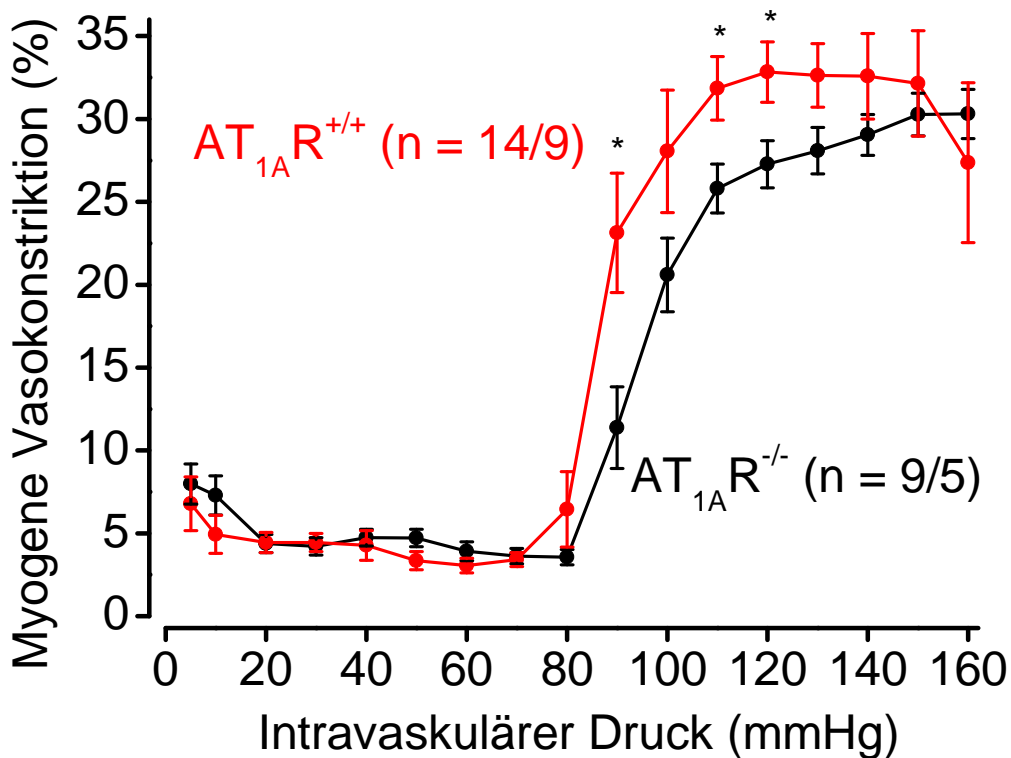


150 mmHg. In Gefäßen von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen verminderte sich die myogene Gefäßantwort kontinuierlich von 22,4% bei 120 mmHg auf 11,4% bei 160 mmHg intravaskulärem Druck. Der größte Unterschied in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion zwischen den Vergleichsgruppen lag bei absolut 17,9% (bei 160 mmHg) und relativ 46,6% (bei 150 mmHg).

### **C57BL/6J Mäuse**

Die Stärke der druckabhängigen myogenen Vasokonstriktion von Mesenterialarterien aus männlichen C57BL/6J AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen wurde im Vergleich zu C57BL/6J nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen gleichen Geschlechts gemessen. Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion wurden nur bei intravaskulären Drücken von 90, 110 und 120 mmHg festgestellt. Bei allen anderen intravaskulären Drücken zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion (siehe Abbildung 3.5).

Die Diskrepanz der an Mesenterialarterien von FVB/N Mäusen, im Gegensatz zu C57BL/6J Mäusen erhobenen Daten lässt sich am ehesten durch den fehlenden Abgleich des Mäusealters im Gegensatz zu den ordnungsgemäß alters- und geschlechtsgepaarten Messungen an Mesenterialarterien von FVB/N Mäusen erklären. Auch das hohe durchschnittliche Mäusealter von C57BL/6J Mäusen (6 Monate) im Gegensatz zu FVB/N Mäusen (3 Monate) könnte eine Rolle auf die Ausbildung der myogenen Vasokonstriktion spielen. Druckmyografisch konnte an Mesenterialarterien aus 36 Wochen alten im Gegensatz zu 12 Wochen alten C57BL/6 Mäusen eine stark erniedrigte ( $10,0 \pm 3,8\%$  vs.  $19,1 \pm 2,2\%$ ) myogene Vasokonstriktion bei einem intravaskulären Druck von 120 mmHg festgestellt werden (Gros et al., 2002). Dies weist auf eine eingeschränkte Aussagefähigkeit der an Mesenterialarterien aus C57BL/6J Mäusen erhobenen Daten hin.



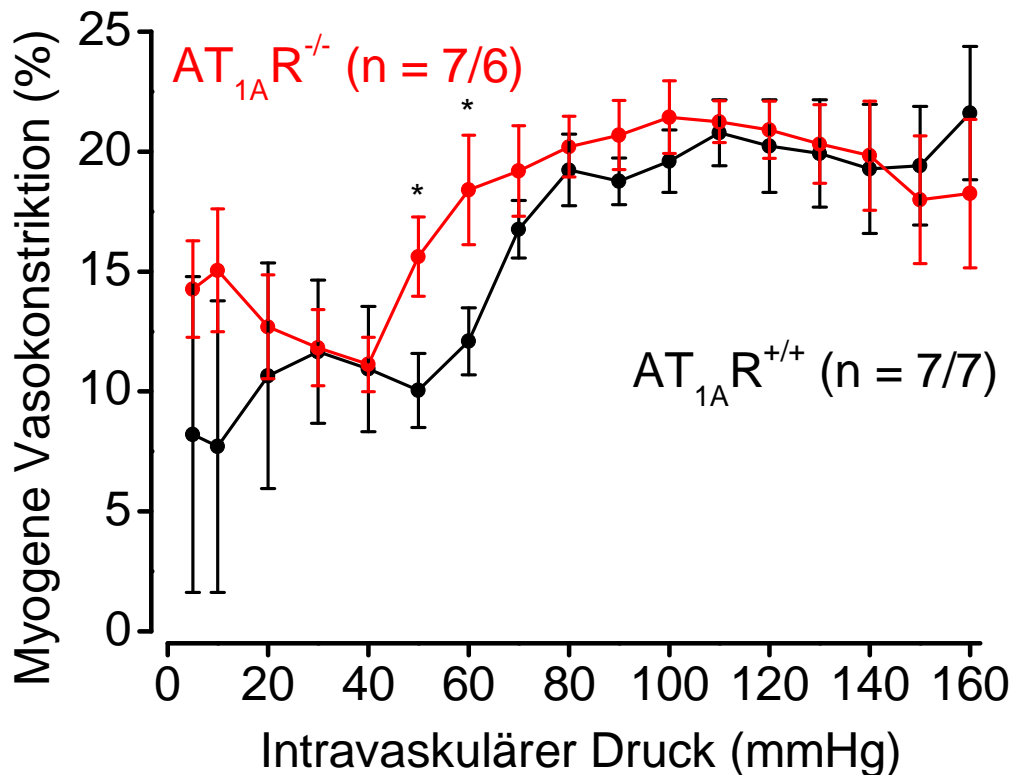
**Abbildung 3.5: Myogene Vasokonstriktion von Mesenterialarterien von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten C57BL/6J Mäusen**

Darstellung der myogenen Vasokonstriktion von Mesenterialarterien von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten (AT<sub>1A</sub>R<sup>-/-</sup>) und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten (AT<sub>1A</sub>R<sup>+/+</sup>) C57BL/6J Mäusen bei zunehmendem intravaskulären Druck. Die myogene Vasokonstriktion bei einem bestimmten intravaskulären Druck wird als relative prozentuale Verminderung des Gefäßaußendurchmessers in maximal kontrahiertem Zustand im Vergleich zum maximal dilatierten Zustand angegeben. Die Messungen wurden *in vitro* an nach der 2. und 3. Aufzweigung der A. mesenterica superior lokalisierten Mesenterialarterien aus 5-8 Monate alten, männlichen C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Während den Messungen lag kein Gefäßdurchfluss vor. n steht für die Anzahl der gemessenen Gefäße und dahinter die Anzahl der Mäuse, aus denen diese Gefäße entnommen wurden.

### 3.3.2 Myogene Vasokonstriktion an Zerebralarterien

Die Stärke der myogenen Vasokonstriktion an Zerebralarterien von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten C57BL/6J Mäusen wurde verglichen. Am Anfang des myogenen Bereiches von Zerebralarterien bei intravaskulären Drücken von 50 und 60 mmHg konnte ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion festgestellt werden. Bei allen anderen gemessenen intravaskulären Drücken zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion (siehe Abbildung 3.6). Ursächlich für das

Fehlen eines ausgeprägten Unterschieds in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion könnte am ehesten der fehlende Abgleich des Mäusealters und -geschlechts bei den Zerebralarterienmessungen von C57BL/6J Mäusen sein. Auch das durchschnittliche Mäusealter von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten C57BL/6J Mäusen von 6 Monaten könnte einen negativen Effekt auf die Ausbildung der myogenen Vasokonstriktion ausüben.



**Abbildung 3.6: Myogene Vasokonstriktion von Zerebralarterien aus  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten und nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen**

Darstellung der myogenen Vasokonstriktion von Zerebralarterien von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten ( $AT_{1A}R^{-/-}$ ) und nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten ( $AT_{1A}R^{+/+}$ ) C57BL/6J Mäusen bei zunehmendem intravaskulären Druck. Die myogene Vasokonstriktion bei einem bestimmten intravaskulären Druck wird als relative prozentuale Verminderung des Gefäßaußendurchmessers in maximal kontrahiertem Zustand im Vergleich zum maximal dilatierten Zustand angegeben. Die Messungen wurden *in vitro* an isolierten, distalen Gefäßabschnitten der A. cerebri posterior und A. cerebelli superior aus C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Während den Messungen lag kein Gefäßdurchfluss vor. n steht für die Anzahl der gemessenen Gefäße und dahinter die Anzahl der Mäuse, aus denen diese Gefäße entnommen wurden.

### 3.4 Pharmakavermittelte arterielle Vasokonstriktion an AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen

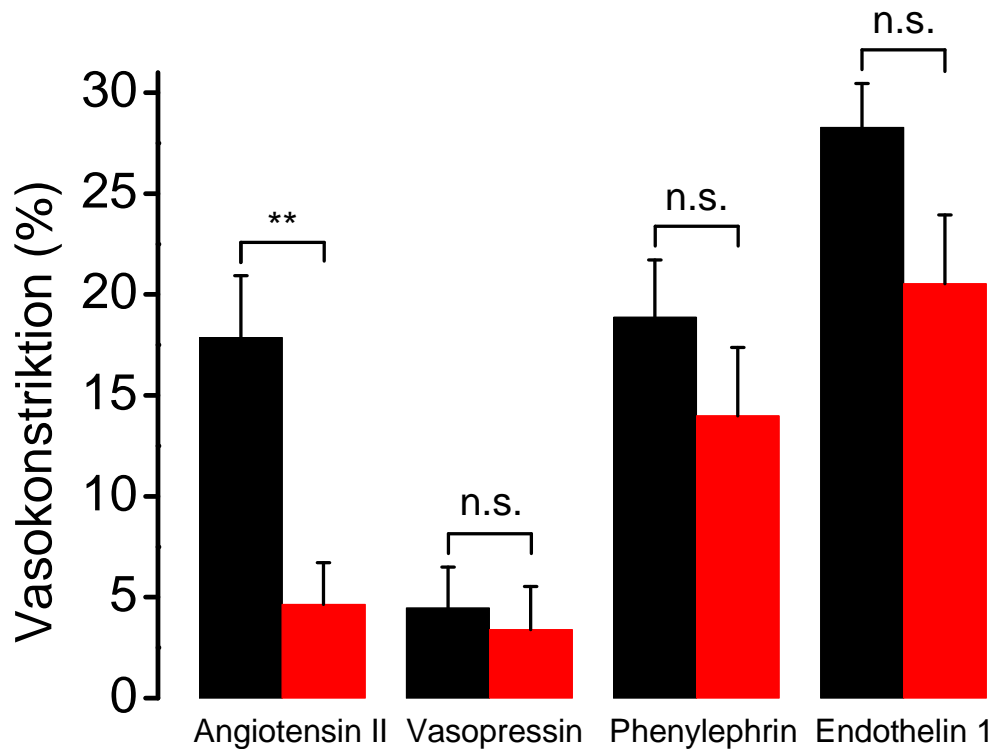
Es erfolgte der Vergleich der pharmakainduzierten Vasokonstriktion an Zerebralarterien (siehe Kapitel 3.4.1) und Mesenterialarterien (siehe Kapitel 3.4.2) von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen. Bei einem im prämyogenen Bereich liegenden intravaskulären Druck von 40 mmHg wurden unter druckkonstanten Bedingungen vasokonstriktorisch wirkende Pharmaka extravasal in folgender Reihenfolge und physiologischer Endkonzentration appliziert: Angiotensin II (100 nM), Vasopressin (1 µM), Phenylephrin (30 µM), Endothelin 1 (200 nM). Es wurden Tiere der häufig in der Forschung verwendeten Mäuserassen FVB/N und C57BL/6J benutzt. Für die Messungen wurden nach der 2. und 3. Aufzweigung der A. mesenterica superior lokalisierte Arterien und distale Abschnitte der A. cerebri posterior und A. cerebelli superior verwendet.

#### 3.4.1 Verminderte Angiotensin II-vermittelte Vasokonstriktion an Zerebralarterien

Es zeigte sich ein hoch signifikanter ( $p = 0,003$ ) Unterschied in der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion von Zerebralarterien aus AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen. Bei Applikation von Vasopressin, Phenylephrin und Endothelin 1 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Gefäßantwort festgestellt werden. Die Pharmaka entfalteten eine in folgender Reihenfolge absteigend dargestellte vasokonstriktorische Wirkung: Endothelin 1 > Phenylephrin > Angiotensin II > Vasopressin (siehe Abbildung 3.7).

Warum konnte eine signifikante Verminderung der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion, aber kein ausgeprägter Unterschied in der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion an isolierten Zerebralarterien festgestellt werden? Ursächlich hierfür könnte am ehesten der fehlende Alters- und Geschlechtsabgleich bei den Messungen der myogenen Vasokonstriktion im Gegensatz zu den ordnungsgemäß alters- und geschlechtsgepaarten

Messungen der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion sein. Auch eine (Teil) Kompensation der myogenen Vasokonstriktion in  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen durch den  $AT_{1B}$ -Rezeptor wäre möglich.

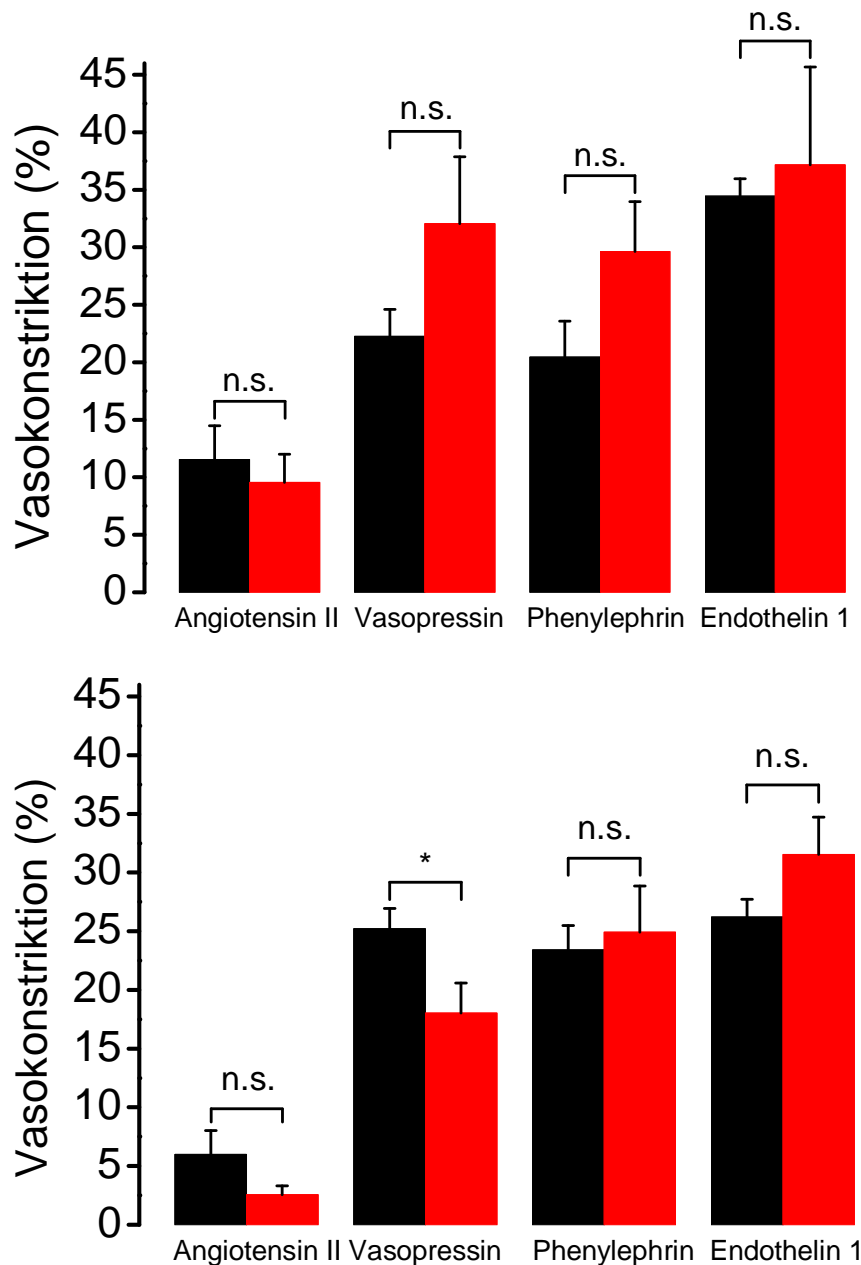


**Abbildung 3.7: Pharmakainduzierte Vasokonstriktion an Zerebralarterien von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten (rote Balken) und nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten (schwarze Balken) Mäusen**

Die Pharmaka wurden in PSS gelöst in folgenden Endkonzentrationen verwendet: Angiotensin II (100 nM), Vasopressin (1  $\mu$ M), Phenylephrin (30  $\mu$ M), Endothelin 1 (200 nM). Die Vasokonstriktion wird als relative prozentuale, maximale Verringerung des Gefäßaußendurchmessers nach Applikation eines Pharmakons, bezogen auf den Gefäßaußendurchmesser unter extravaskulärer Perfusion mit PSS, dargestellt. Alle separat auf 37 °C temperierten Pharmakalösungen wurden bei einem im prämyogenen Bereich liegenden intravaskulären Druck von 40 mmHg unter druckkonstanten Bedingungen mittels Peristaltikpumpe appliziert. Die Messungen wurden *in vitro* an isolierten, distalen Gefäßabschnitten der A. cerebri posterior und A cerebelli superior aus 5 Monate alten weiblichen C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Während den Messungen lag kein Gefäßdurchfluss vor. Es wurden je 9 Gefäße von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten und nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen gemessen.

### 3.4.2 Pharmakavermittelte Vasokonstriktion an Mesentriearterien

Ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,029$ ) zeigte sich nur bei der durch Vasopressin-vermittelten Vasokonstriktion an Gefäßen aus  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten und nicht  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten C57BL/6J Mäusen. An Mesentriearterien von FVB/N Mäusen konnte dieser Effekt allerdings nicht bestätigt werden. Alle weiteren Messungen lieferten keine signifikanten Unterschiede in der pharmakavermittelten Vasokonstriktion (siehe Abbildung 3.8). Eine mögliche Ursache für den nicht signifikanten Unterschied in der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion an Mesentriearterien könnte eine vermehrte kompensatorische Expression des durch Angiotensin II ebenfalls vasokonstriktorisch wirkenden  $AT_{1B}$ -Rezeptors in  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen sein.



**Abbildung 3.8: Pharmakainduzierte Vasokonstriktion an Mesenterialarterien von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten (rote Balken) und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten (schwarze Balken) FVB/N (Bild oben) und C57BL/6J (Bild unten) Mäusen**

Die Pharmaka wurden in folgender Reihenfolge und Endkonzentration appliziert: Angiotensin II (100 nM), Vasopressin (1  $\mu$ M), Phenylephrin (30  $\mu$ M) und Endothelin 1 (200 nM). Die Vasokonstriktion wird als die relative, prozentuale, maximale Verringerung des Gefäßaußendurchmessers nach Applikation eines Pharmakons, bezogen auf den Gefäßaußendurchmesser unter extravaskulärer Perfusion mit PSS, dargestellt. Alle separat auf 37 °C temperierten Pharmakalösungen wurden bei einem im prämyogenen Bereich liegenden intravaskulären Druck von 40 mmHg unter druckkonstanten Bedingungen mittels Peristaltikpumpe appliziert. Die Messungen wurden *in vitro* an nach der 2. und 3. Abzweigung aus der A. mesenterica superior lokalisierten Gefäßabschnitten aus männlichen C57BL/6J und FVB/N Mäusen durchgeführt. Während den Messungen lag kein Gefäßdurchfluss vor. Es wurden 14 bzw. 7 Gefäße von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten und 9 bzw. 12 Gefäße von nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten FVB/N und C57BL/6J Mäusen gemessen.

## 3.5 Verminderung der Genexpression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors

### 3.5.1 In einer stabilen CHO-K1 Zelllinie mittels siRNA

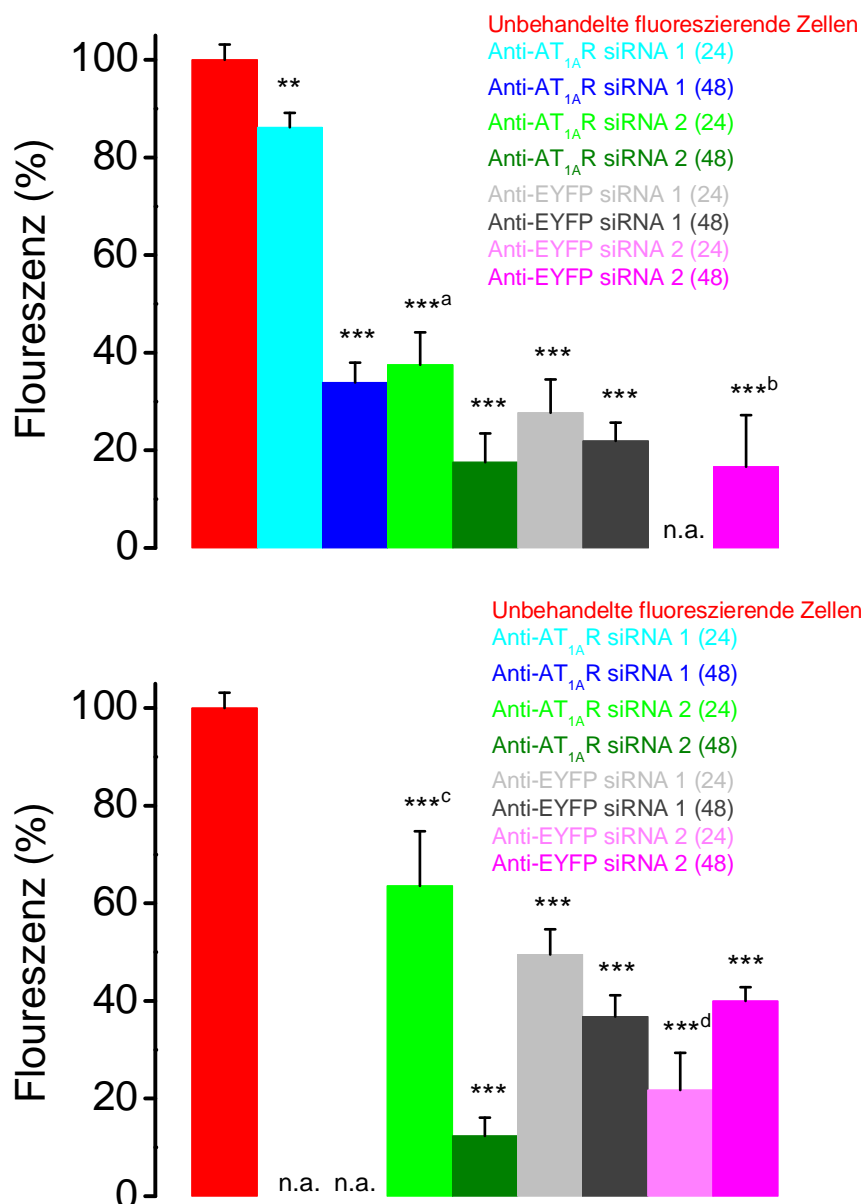
Die Stärke der Verminderung der Genexpression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors durch verschiedene, gegen diesen Rezeptor gerichtete siRNA-Sequenzen wurde auf zellulärer Ebene im Rahmen dieser Arbeit getestet. Als Ausgangsbasis diente eine stabile CHO-K1-Zelllinie, die eine an das fluoreszierende Protein EYFP gekoppelte Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors von Mäusen exprimiert. Da die intrazelluläre Gensequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors physikalisch an die Gensequenz des fluoreszierenden Proteins EYFP gekoppelt war, konnte die gemessene Minderung der EYFP-Fluoreszenz als Maß für die Abnahme der Genexpression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors verwendet werden. Die siRNA wurde mit einer Einwirkdauer von 24 und 48 Stunden sowie in Endkonzentrationen von 50 und 100 nM appliziert. Die relative, prozentuale Minderung der durch das Protein EYFP emittierten Fluoreszenz von mit siRNA behandelten, im Vergleich zu nicht mit siRNA behandelten, den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimierenden Zellen ergab die Wirkstärke der siRNA. Als Vergleich wurden auch gegen das Fluoreszenzmolekül EYFP gerichtete siRNA-Sequenzen in den beschriebenen Konzentrationen getestet.

Bei allen oben genannten siRNA-Sequenzen gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor zeigten sich signifikante durchschnittliche Einzelzell-Fluoreszenz-Minderungen von 13,8% bis 87,6%. Einwirkzeiten von 48 Stunden anstatt 24 Stunden führten bis auf eine Ausnahme bei allen getesteten siRNA-Sequenzen unabhängig von der applizierten Konzentration zu einer Steigerung der Wirkstärke um durchschnittlich 28,59%. Höhere siRNA-Endkonzentrationen von 100 nM anstatt 50 nM wiesen paradoxerweise bis auf eine Ausnahme eine um durchschnittlich 21,3% niedrigere Wirkstärke auf. Die gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichtete siRNA zeigte bis auf eine Ausnahme einen niedrigeren Wirkungsgrad als gegen das Fluoreszenzmolekül EYFP gerichtete siRNA (siehe Abbildung 3.9).

Die gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichtete siRNA 2 erzeugte durchgehend stärkere Fluoreszenzminderungen als die siRNA 1. Die beste Wirkung erreichte

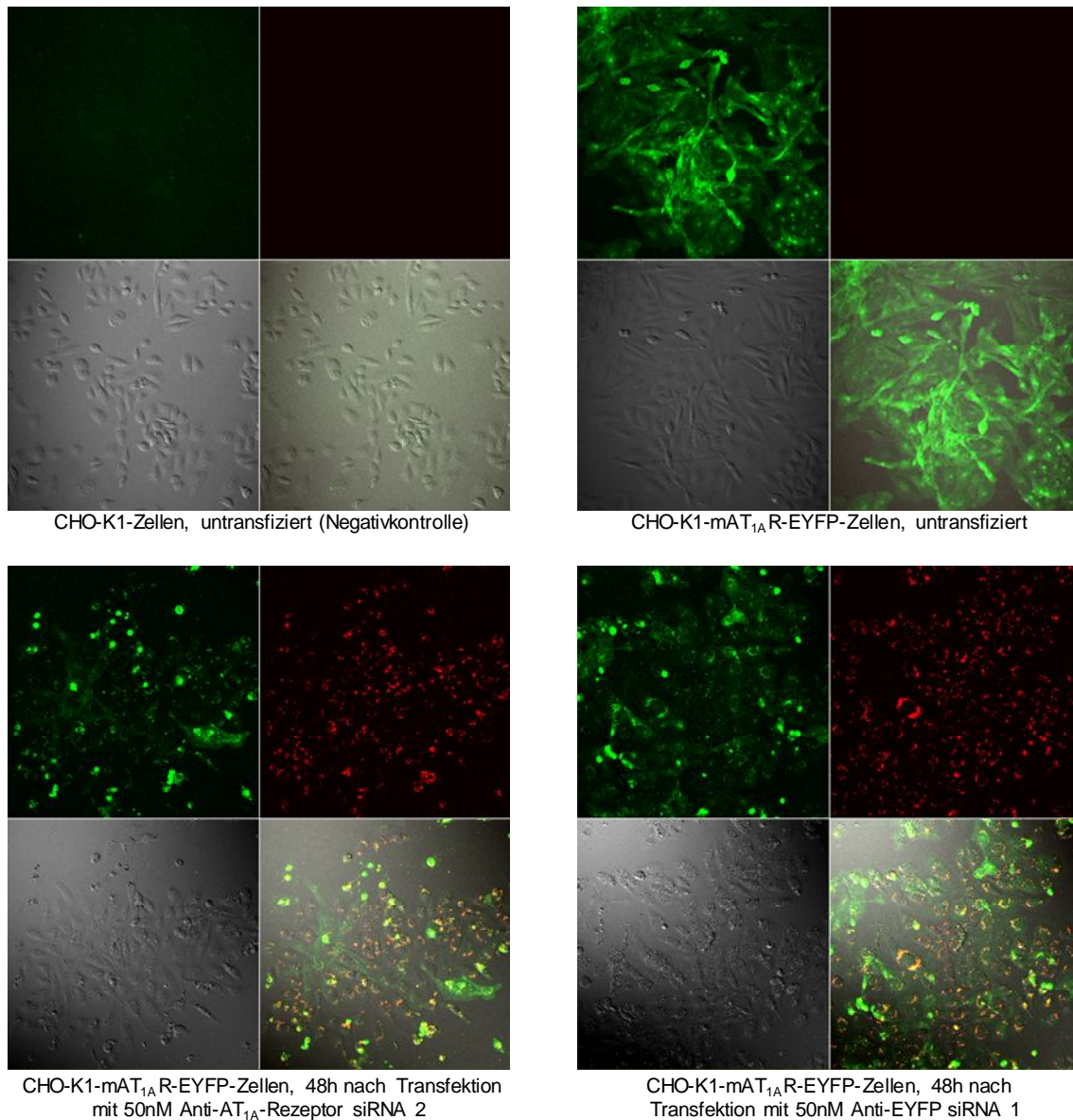


die siRNA 2 mit 87,6% und 82,5% in den Endkonzentrationen 100 nM und 50 nM nach 48 Stunden Einwirkzeit. Die gegen das Fluoreszenzmolekül EYFP gerichtete siRNA 2 erzielte einen etwas höheren Wirkungsgrad als die siRNA 1. Dieser lag bei 83,3% (50 nM Endkonzentration und 48 Stunden Einwirkzeit) und 78,3% (100 nM Endkonzentration und 24 Stunden Einwirkzeit) (siehe Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9: Zelluläre Fluoreszenz nach Applikation von gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor oder gegen EYFP gerichteter siRNA in den Endkonzentrationen 50 nM (Bild oben) und 100 nM (Bild unten)**

Darstellung der relativen prozentualen zellulären Fluoreszenz nach Applikation von siRNA bezogen auf nicht mit siRNA behandelte fluoreszierende CHO-K1-Zellen (roter Balken). Niedrige Fluoreszenzwerte weisen auf eine starke Wirkung der siRNA hin. Da auf einem in die Zellen eingeschleusten Vektor die Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors physikalisch an die Sequenz des Fluoreszenzproteins EYFP gekoppelt ist, dient die gemessene intrazelluläre Fluoreszenz als Maß für die Wirkstärke gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichteter siRNA. Es wurden jeweils zwei unterschiedliche siRNA-Sequenzen (siRNA1 und siRNA2), die gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor oder gegen EYFP gerichtet waren, getestet. In Klammern dahinter steht die Einwirkzeit in Stunden. Die Fluoreszenzwerte basieren auf einem Durchschnittswert von 100 Zellen. Bei folgenden Angaben wurden die Durchschnittswerte aus weniger als 100 Zellen berechnet (64 Zellen<sup>a</sup>, 30 Zellen<sup>b</sup>, 17 Zellen<sup>c</sup>, 56 Zellen<sup>d</sup>). Bei mit n.a. gekennzeichneten Balken lagen nicht genügend Daten zur Auswertung vor. Die gemessene Autofluoreszenz der Zellen wurde von den absoluten Fluoreszenzwerten subtrahiert. Die Messungen wurden an lebenden, mit physiologischer Elektrolytlösung bedeckten Zellen *in vitro* durchgeführt. Die Signifikanzen sind mit \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  angegeben.



**Abbildung 3.10: Zelluläre Fluoreszenz nach Applikation von siRNA gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor und gegen das fluoreszierende Protein EYFP**

Im Bild oben links ist die Autofluoreszenz von untransfizierten CHO-K1-Zellen abgebildet (Negativkontrolle). Das Bild oben rechts zeigt die Fluoreszenz von untransfizierten, den an das fluoreszierende Protein EYFP gekoppelten AT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimierenden Zellen. In den unteren Bildern ist eine Minderung der grünen Fluoreszenz nach 48 Stunden Einwirkung von 50 nM siRNA gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor (Bild unten links) und das Fluoreszenzmolekül EYFP (Bild unten rechts) zu sehen.

Jede der 4 Darstellungen ist in 4 weitere Bilder gegliedert: Oben links ist jeweils die grün dargestellte Fluoreszenz der EYFP-Sequenz zu sehen, während unten links die Zellen in weißem Licht dargestellt werden. Oben rechts ist die rote Fluoreszenz des als Transfektionskontrolle dienenden, an die siRNA-Sequenz gekoppelten Proteins Cy 5 dargestellt, während unten rechts eine Überlagerung der drei Einzelbilder zu sehen ist. Je größer die Minderung der grün dargestellten EYFP-Fluoreszenz ausfällt, desto stärker wirkt die jeweilige siRNA.

## 4.) Diskussion

### 4.1) Einfluss des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors auf die arterielle myogene Vasokonstriktion

Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor ist ein transmembranärer G-Protein-gekoppelter Rezeptor. In vaskulären glatten Muskelzellen von Nagetieren wie Ratten und Mäusen, aber nicht in Menschen, kommen zwei in der Aminosäuresequenz zu ca. 95% identische AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Subtypen (AT<sub>1A</sub> und AT<sub>1B</sub>) vor (Langford et al., 1992). In Arterien von Nagetieren kann der AT<sub>1A</sub>-Rezeptor durch den humoral oder lokal produzierten Agonisten Angiotensin II pharmakologisch aktiviert werden, was zu einer arteriellen Vasokonstriktion führt (de Gasparo et al., 2000; Rush und Aultman, 2008). Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Hypothese, dass der AT<sub>1A</sub>-Rezeptor unabhängig von der pharmakologischen Aktivierung eine Rolle in der druckinduzierten arteriellen myogenen Vasokonstriktion spielt (Hill et al., 2009; Mederos et al., 2010). In den folgenden Absätzen werden molekularbiologische und auf verschiedenen Ebenen durchgeführte physiologische Forschungsergebnisse erläutert, die diese Hypothese bestätigen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten druckmyografischen Messergebnisse werden hierbei im Kontext der aktuellen Forschung diskutiert.

In Widerstandsarterien, die eine ausgeprägte myogene Vasokonstriktion aufweisen, wie beispielsweise mesenteriale, zerebrale und renale Arterien, konnte eine signifikant höhere mRNA- und Proteinkonzentration des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors nachgewiesen werden als in Leitungsarterien wie der Aorta. In isolierten humanen Zerebralarterien wurde eine AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Konzentration von ca. 75 fmol / mg Protein im Vergleich zu ca. 6 fmol / mg Protein in Segmenten der thorakalen Aorta festgestellt (Viswanathan et al., 2000). Auch in isolierten renalen Arterien von Ratten wurde eine hohe Proteinkonzentration des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors von 202±3 fmol / mg Protein nachgewiesen (Ruan et al., 1997). An isolierten Mesenterialarterien von Mäusen und isolierten Zerebralarterien von Ratten konnten hohe mRNA-Konzentrationen des AT<sub>1</sub>-Rezeptors gemessen werden (Zhou et al., 2005). Das Vorkommen des AT<sub>1</sub>-

Rezeptors in hoher Konzentration in Widerstandsarterien weist somit auf eine Beteiligung des Rezeptors an der myogenen Vasokonstriktion hin.

Durch molekularbiologische Methoden konnte in nachfolgend erläuterten Experimenten nachgewiesen werden, dass der  $AT_{1A}$ -Rezeptor unabhängig vom lokal und systemisch gebildeten Agonisten Angiotensin II auch mechanisch durch Dehnung der Zellmembran aktiviert werden kann. In kultivierten glatten Muskelzellen aus der thorakalen Aorta, die eine Überexpression des  $AT_{1A}$ -Rezeptors aufwiesen, wurde elektrophysiologisch eine durch osmotisch-induzierte Dehnung der Zellmembran hervorgerufene Rezeptoraktivierung festgestellt. Durch Anwendung von gegen Angiotensin II gerichteten Antikörpern während den Messungen wurde eine agonistunabhängige Aktivierung des  $AT_{1A}$ -Rezeptors nachgewiesen (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Auch an Kardiomyozyten und HEK 293 Zellen, die eine Überexpression des  $AT_{1A}$ -Rezeptors aufwiesen, konnte eine agonistunabhängige Aktivierung des  $AT_{1A}$ -Rezeptors festgestellt werden (Zou et al., 2004). Ein an der Bindungsstelle von Angiotensin II mutierter (durch Austausch der Aminosäure Lysin durch Glutamin), auf HEK 293 Zellen exprimierter  $AT_1$ -Rezeptor zeigte erwartungsgemäß keine Aktivierung nach Applikation des Agonisten Angiotensin II. Durch Zelldehnung ließ sich jedoch eine starke Rezeptoraktivierung auslösen (Yasuda et al., 2008a; Zou et al., 2004).

Durch folgend beschriebene biochemische Methode konnte nachgewiesen werden, dass die mechanische Aktivierung des  $AT_1$ -Rezeptors durch Zellmembrandehnung zu einer anderen Rezeptorkonformation führt als die pharmakologische Aktivierung des  $AT_1$ -Rezeptors durch Angiotensin II. Mittels einer zur Erfassung von Aminosäureveränderungen in der Struktur von transmembranären Rezeptoren (engl.: „substituted cysteine accessibility method“) geeigneten Methode konnte festgestellt werden, dass eine Aktivierung des  $AT_1$ -Rezeptors durch mechanische Zelldehnung eine Rotation der Transmembrandomäne 7 gegen den Uhrzeigersinn zur Liganden-Bindetasche hin auslöst. Die Bindung von Angiotensin II an den  $AT_1$ -Rezeptor führte hingegen zu einer völlig anderen Rezeptorkonformation. Dies beweist, dass der

AT<sub>1</sub>-Rezeptor je nach Art der Aktivierung mindestens zwei verschiedene aktive Rezeptorkonformationen einnehmen kann.

Mitte der neunziger Jahre gelang es, AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefiziente C57BL/6 Mäuse zu erzeugen (Ito et al., 1995). An gendefizienten Mäusen ließen sich im Gegensatz zu nicht gendefizienten Mäusen erstaunlicherweise makroskopisch keine Organfehlbildungen und kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung und Überlebenszeit nachweisen (Oliverio et al., 1998). AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefiziente Mäuse wiesen allerdings im Vergleich zu nicht gendefizienten Mäusen einen um durchschnittlich 24 mmHg bis 58 mmHg reduzierten systolischen Blutdruck auf (Ito et al., 1995; Matsusaka et al., 1996). Dies weist auf eine Beteiligung des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors an der systemischen Blutdruckregulation hin. Ein Grund für die niedrigeren systolischen Blutdruckwerte in AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen könnte eine Beteiligung des Rezeptors an der myogenen Vasokonstriktion sein. Der AT<sub>1A</sub>-Rezeptor spielt allerdings auch in der Aufrechthaltung des Salzhaushaltes eine Rolle. Deshalb könnte auch ein im Vergleich zu nicht gendefizienten Mäusen größerer Salzverlust für den niedrigeren Blutdruck in AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen verantwortlich sein (Audoly et al., 2000; Oliverio et al., 2000).

Durch physiologische Experimente an isolierten Organen konnte ein Einfluss des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors auf den Blutfluss wie folgend beschrieben nachgewiesen werden. An isolierten Nieren von männlichen Ratten wurde nach Applikation des inversen AT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten Angiotensin II ein signifikant reduzierter Blutfluss gemessen. Eine anschließende selektive AT<sub>1A</sub>-Rezeptorblockade mit Losartan führte zu einer Zunahme des Blutflusses auf den Ausgangswert (Wang et al., 1997). An isolierten Herzen und Nieren von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen konnte allerdings im Vergleich zu nicht gendefizienten Mäusen kein signifikanter Unterschied im Blutfluss nachgewiesen werden (Ruan et al., 1999; van Esch et al., 2010). Dies könnte auf eine Kompensation der vasokonstriktiven Funktion des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors durch andere Rezeptoren hinweisen.

Um die durch molekularbiologische und physiologische Methoden gewonnenen Ergebnisse einer Beteiligung des  $AT_{1A}$ -Rezeptors an der myogenen Vasokonstriktion zu überprüfen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Messung der Stärke der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion an isolierten Arterien von Mäusen bei intravaskulären Drücken von 5-160 mmHg. An Mesenterialarterien von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten, drei Monate alten, männlichen FVB/N Mäusen konnte im Vergleich zu nicht gendefizienten Mäusen bei hohen intravaskulären Drücken von 120-160 mmHg ein signifikanter Unterschied in der myogenen Vasokonstriktion nachgewiesen werden. Dies scheint die Hypothese der Beteiligung des  $AT_{1A}$ -Rezeptors an der myogenen Vasokonstriktion zu bestätigen.

An Gefäßen von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten C57BL/6J Mäusen konnten die oben an Gefäßen von FVB/N Mäusen beschriebenen Ergebnisse nur in abgeschwächter Form reproduziert werden. Hier zeigte sich bei 90, 110 und 120 mmHg intravaskulärem Druck an Mesenterialarterien und bei 50 und 60 mmHg an Zerebralarterien eine signifikante Differenz in der Stärke der myogenen Gefäßantwort von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten und nicht gendefizienten Mäusen. Da für das jeweilige Gefäßgebiet ein identischer Versuchsaufbau verwendet wurde, können messtechnische Fehler weitestgehend ausgeschlossen werden. Die aufgetretenen Unterschiede sind am ehesten durch den fehlenden Abgleich des Mäusealters bei den Mesenterialarterienmessungen und dem fehlenden Abgleich des Mäusealters und -geschlechts bei den Zerebralarterienmessungen von C57BL/6J Mäusen zu erklären. Dies ermöglicht nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit und Aussagefähigkeit der an C57BL/6J Mäusen erhobenen Daten, im Gegensatz zu den ordnungsgemäß alters- und geschlechtsgepaarten Messungen an Mesenterialarterien von FVB/N Mäusen.

Wieso konnte ein signifikanter Unterschied in der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion von Arterien von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen im Vergleich zu nicht gendefizienten Mäusen nur bei hohen intravaskulären Drücken nachgewiesen werden? Eine Erklärung besteht in der (Teil-)Kompensation des vasoregulatorischen Effektes des  $AT_{1A}$ -Rezeptors durch

andere Rezeptoren, wie dem AT<sub>1B</sub>- oder AT<sub>2</sub>-Rezeptor. Ein Einfluss des AT<sub>1B</sub>-Rezeptors auf die myogene Vasokonstriktion wird zwar vermutet, konnte jedoch noch nicht experimentell nachgewiesen werden (Zhou et al., 2003). Folgende pharmakologische und molekularbiologische Experimente sprechen für einen Einfluss des AT<sub>1B</sub>-Rezeptors auf die myogene Vasokonstriktion:

- 1.) Durch molekularbiologische Methoden konnte das Vorhandensein von AT<sub>1B</sub>-Rezeptor Messenger-RNA in Mesenterialarterien von Mäusen mit gendefizientem AT<sub>1A</sub>-Rezeptor nachgewiesen werden (Zhou et al., 2005).
- 2.) In AT<sub>1A</sub>- und AT<sub>1B</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen konnte ein niedrigerer durchschnittlicher systolischer Blutdruck von 72±5 mmHg als in AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen mit 89±2 mmHg nachgewiesen werden (Matsusaka et al., 1996; Tsuchida et al., 1998).
- 3.) In AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen konnte der systolische Blutdruck durch die zweiwöchige Gabe des inversen Agonisten Losartan, der zusätzlich die Funktion des AT<sub>1B</sub>-Rezeptors inhibiert, signifikant von 80±5 auf 72±4 mmHg gesenkt werden (Oliverio et al., 1997).
- 4.) An AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten oder AT<sub>1B</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen konnte makroskopisch keine Abnormalität der Organe festgestellt werden (Audoly et al., 2000; Oliverio et al., 1997). Nur an AT<sub>1A</sub>- und AT<sub>1B</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen wurde ein vermindertes Wachstum der Nieren, des Herzens und eine Verdickung der Wand von Nierenarterien nachgewiesen (Oliverio et al., 1997).

Weitere Erkenntnisse zur Beteiligung und kompensatorischen Funktion des AT<sub>1A</sub>- und AT<sub>1B</sub>-Rezeptors in der myogenen Vasokonstriktion können durch physiologische Messungen der Stärke der myogenen Vasokonstriktion an isolierten Widerstandsarterien oder alternativ durch Messungen des Blutflusses durch das Gefäßbett von isolierten Organen gewonnen werden. Hierzu eignet sich ein Vergleich der myogenen Vasokonstriktion von AT<sub>1A</sub>- und AT<sub>1B</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen mit AT<sub>1A</sub>- oder AT<sub>1B</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen und nicht gendefizienten Mäusen.

Alternativ zur Verwendung von gendefizienten Mäusen kann spezifische, gegen den AT<sub>1A</sub>- und AT<sub>1B</sub>-Rezeptor gerichtete siRNA nach der von Stacey Reading



und Joseph Brayden beschriebenen Methode (Reading und Brayden, 2007) in Mäusen zu einer verminderten Genexpression der jeweiligen Rezeptoren in vaskulären glatten Muskelzellen führen. Diese Methode hat den Vorteil kurzfristig innerhalb von wenigen Tagen eine Wirkung zu erzielen. Nach Applikation von siRNA kann an isolierten Resistenzarterien eine druckmyografische Messung zur Quantifizierung der Stärke der myogenen Vasokonstriktion durchgeführt werden.

Durch molekularbiologische Methoden, wie beispielsweise dem Einsatz von FRET (Förster-Resonanz-Energie-Transfer), können einzelne Rezeptorstrukturen durch Fluorochrome markiert und Rezeptorkonformationsänderungen sichtbar gemacht werden. Diese Methode eignet sich zur weiteren Untersuchung der von Yasuda et al. (2008a) beschriebenen, durch eine mechanische Rezeptoraktivierung ausgelösten  $AT_{1A}$  Rezeptorkonformationsänderung. Der Mechanismus der mechanischen Rezeptoraktivierung und der Zusammenhang mit der myogenen Vasokonstriktion ließe sich hiermit weiter erforschen.

#### 4.2) Angiotensin II-vermittelte Vasokonstriktion an Mesenterial- und Zerebralarterien

Zum Vergleich des pharmakavermittelten vasokonstriktorischen Effektes wurden im Rahmen dieser Arbeit die Pharmaka Angiotensin II, Vasopressin, Endothelin 1 und Phenylephrin in maximalen Wirkkonzentrationen an isolierten Mesenterial- und Zerebralarterien von FVB/N und C57BL/6J Mäusen appliziert. In der Literatur wird das Vorkommen der den vasokonstriktorischen Effekt vermittelnden Rezeptoren dieser Pharmaka sowohl in Resistenzarterien als auch in Leitungsarterien beschrieben.

In isolierten zerebralen und renalen Widerstandsarterien von Ratten konnte eine hohe mRNA- und Proteinkonzentration des (Angiotensin II)  $AT_1$ -Rezeptors und (Vasopressin)  $V_1$ -Rezeptors gemessen werden (Bao et al., 2007; Vagnes et al., 2000). In humanen renalen Arterien wurde eine Proteinkonzentration des

(Phenylephrin)  $\alpha_1$ -Adrenozeptor von  $23 \pm 5,9$  fmol / mg Protein und in Mesenterialarterien  $13 \pm 6,1$  fmol / mg Protein ermittelt (Rudner et al., 1999). In zerebralen und renalen Arterien von Ratten konnte eine hohe mRNA-Konzentration des (Endothelin 1)  $ET_A$ -Rezeptors festgestellt werden (Waldsee et al., 2010; Xie et al., 2010). Mechanosensitive Eigenschaften wurden für in HEK 293 Zellen heterolog exprimierende Angiotensin II ( $AT_{1A}$ -), Vasopressin ( $V_{1A}$ -), Endothelin ( $ET_A$ -) und Histamin ( $H_1$ -) Rezeptoren nachgewiesen (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Dies spricht, neben dem  $AT_{1A}$ -Rezeptor, für eine Beteiligung weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren an der myogenen Vasokonstriktion.

Um eine maximale physiologische Wirkkonzentration und eine Vergleichbarkeit der dosisabhängigen vasokonstriktorischen Wirkung an isolierten Arterien zu ermöglichen, wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven der einzelnen applizierten Pharmaka studiert. An isolierten Nierenarterien von Hasen konnte druckmyografisch die stärkste Vasokonstriktion durch eine Endkonzentration von Angiotensin II von 100 nM erreicht werden (Weihprecht et al., 1991). Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine Endkonzentration von Angiotensin II von 100 nM eingesetzt, um eine starke vasokonstriktorische Wirkung zu gewährleisten. An isolierten Nierenarterien von Hasen und an isolierten Mesenterialarterien von Ratten wurde druckmyografisch die stärkste Vasokonstriktion durch eine Endkonzentration von Vasopressin von  $1 \times 10^{-7}$  mol pro Liter hervorgerufen (Weihprecht et al., 1991; Zhang und Davidge, 1999). Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine Endkonzentration von  $1 \times 10^{-6}$  mol pro Liter eingesetzt.

An isolierten Mesenterial- und Nierenarterien von Ratten und Mesenterialarterien von Mäusen konnte druck- und kraftmyografisch die stärkste vasokonstriktorische Wirkung durch eine Endkonzentration von Phenylephrin von 10  $\mu$ M hervorgerufen werden (Loufrani et al., 2002; Piascik et al., 1994; Zhang und Davidge, 1999). Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Endkonzentration von 30  $\mu$ M eingesetzt. An isolierten Mesenterialarterien von Mäusen wurde druckmyografisch die stärkste Vasokonstriktion durch eine Endkonzentration von Endothelin 1 von 100 nM

erzielt (Loufrani et al., 2002). Für die Versuche dieser Arbeit wurde deshalb eine Endkonzentration von 200 nM eingesetzt.

Bei einem druckmyografisch gemessenen Vergleich der Stärke der Vasokonstriktion an isolierten Mesenterialarterien von Ratten wirkte Endothelin 1 am stärksten vasokonstriktorisch, gefolgt von Vasopressin, Phenylephrin und Angiotensin II (Hermsteiner et al., 2001). Diese Reihenfolge der Stärke der pharmakainduzierten Vasokonstriktion konnte im Rahmen dieser Arbeit druckmyografisch an isolierten Mesenterialarterien von FVB/N und C57BL/6J Mäusen bestätigt werden.

Anders als erwartet konnte kein signifikanter Unterschied in der Wirkstärke der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion an Mesenterialarterien von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen im Gegensatz zu nicht gendefizienten Mäusen festgestellt werden. Auch kraftmyografisch erhobene Daten an isolierten Femoralarterien von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten und nicht gendefizienten C57BL/6J Mäusen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Stärke der durch 100 nM Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion ( $56,1 \pm 2,5\%$  vs.  $59,8 \pm 2,3\%$ ) (Zhou et al., 2005). Eine mögliche Ursache für diese Messergebnisse könnte eine vermehrte kompensatorische Expression des durch Angiotensin II ebenfalls vasokonstriktorisch wirkenden  $AT_{1B}$ -Rezeptors in  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen sein.

Die starke vasokonstriktorische Antwort auf pharmakologische Stimulation von Endothelin ( $ET_A$ )-, Vasopressin ( $V_1$ )- und Angiotensin ( $AT_1$ )-Rezeptoren weist auf eine mögliche Beteiligung dieser Rezeptoren an der myogenen Vasokonstriktion hin. Diese Vermutung wird bekräftigt durch den Nachweis mechanosensitiver Eigenschaften dieser Rezeptoren auf zellulärer Ebene (Mederos y Schnitzler et al., 2008).

### 4.3) Testung des Wirkgrades von siRNA gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor

Die in Mäusen und Ratten vorkommenden AT<sub>1</sub>-Rezeptor Subtypen AT<sub>1A</sub> und AT<sub>1B</sub> können durch Pharmaka nicht selektiv aktiviert werden (de Gasparo et al., 2000; Sasamura et al., 1992). Um die spezifischen Funktionen der einzelnen Rezeptoren erforschen zu können, wurden gendefiziente Mäuse mit mutierten, zu einem Funktionsverlust führenden Genkopien dieser Rezeptoren kreiert (Ito et al., 1995). Eine physiologische Kompensation der Funktionen des genveränderten Rezeptors durch vermehrte Genexpression anderer Rezeptoren kann im Mausmodell jedoch nicht ausgeschlossen werden. Selektiv gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichtete siRNA führt kurzfristig innerhalb von Stunden zu einer starken Minderung der Genexpression des in der Zellmembran lokalisierten Rezeptors. Durch die schnelle Wirkweise von siRNA wird der Einfluss von langfristigen kompensatorischen Effekten des Körpers auf den Funktionsverlust des Rezeptors, ausgelöst durch siRNA, minimiert. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Testung kurzfristig wirkender, gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichteter siRNA für eine spätere Anwendung im Tiermodell zur Erforschung der myogenen Vasokonstriktion durchgeführt.

Eine Standardmethode zur Testung der Wirkung von siRNA auf die Expression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors ist der Nachweis der zellulären Rezeptor-Protein-Konzentration mittels Western-Blot-Analyse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch eine fluoreszenzbasierte Methode zum Nachweis der AT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Expression angewendet, um die Gleichwertigkeit dieser Methode zur Western-Blot-Analyse zu erforschen. Als Ausgangsbasis diente eine stabile CHO-K1-Zelllinie, die eine Gensequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors, gekoppelt an eine Sequenz des Fluoreszenzmoleküls EYFP, exprimiert. Durch die physikalische Verbindung der Gensequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors an die Sequenz des Fluoreszenzmoleküls EYFP kann die Stärke der EYFP-Fluoreszenz als Maß für die Expression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors verwendet werden. Durch gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptors gerichtete siRNA konnte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen eine durchschnittliche prozentuale Einzelzell-Fluoreszenz-Minderung von 13,8% bis 87,6% gemessen werden. Die breite Spanne der

Wirkstärke verdeutlicht den Einfluss der Wirkdauer und Konzentration der applizierten siRNA. Eine um durchschnittlich 28,6% und 21,3% stärkere Wirkung der siRNA konnte durch längere Einwirkzeiten von 48 Stunden anstatt 24 Stunden und durch eine höhere siRNA Endkonzentration von 100 nM anstatt 50 nM erzielt werden. Die hier erzielte maximale Fluoreszenzminderung lag bei 87,6% und 82,5%.

Ähnliche an CHO-K1-Zellen und an Zellen des proximalen renalen Tubulus von Hasen mittels semiquantitativer RT-PCR und Western-Blot-Analyse durchgeführte Untersuchungen ergaben prozentuale Wirkstärken gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichteter RNA von 76% bis 80% (Li und Zhuo, 2007; Vazquez et al., 2005). Durch gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichtete siRNA konnte an glatten Muskelzellen aus Rattengefäßen mittels semi-quantitativer RT-PCR und Western-Blot-Analyse eine Minderung der Rezeptor-Protein-Expression um 69% und eine Minderung der Rezeptor-mRNA-Expression um bis zu 82% erzielt werden (Zhang et al., 2006). Da die Expressionsminderung des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors mittels siRNA keine signifikanten Effekte auf die Bindung von Angiotensin II am AT<sub>1B</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptor zeigt (Vazquez et al., 2005), scheint diese Methode eine effektive, selektive und kurzfristige Verminderung der AT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Expression zu ermöglichen.

Eine methodische Verbesserung in der Bestimmung der Fluoreszenzminderung ließe sich durch die Verwendung eines rot fluoreszierenden Moleküls erzielen, da das rote Fluoreszenzspektrum besser von der zellulären Autofluoreszenz abzugrenzen ist als die gelbe Fluoreszenz von beispielsweise EYFP. Anstelle der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten indirekten Bestimmung der AT<sub>1A</sub> Rezeptorexpression durch die Stärke der Fluoreszenzminderung ließe sich die Testung der Wirkstärke der siRNA auch durch eine direkte Messung der Protein- und mRNA-Konzentration des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors mit Techniken wie Western-Blot-Analyse und semiquantitativer RT-PCR genauer bestimmen.

Die im Rahmen dieser Arbeit als wirksam getestete, gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichtete siRNA kann zur weiteren Erforschung der Rolle dieses Rezeptors in der myogenen Vasokonstriktion verwendet werden. Hierzu eignet sich

beispielsweise die Applikation einer geeigneten Menge der siRNA in das Gefäßsystem von Ratten oder Mäusen mit anschließender Messung der Stärke der arteriellen myogenen Vasokonstriktion (im Vergleich zu Kontrollmessungen). Um eine Wirkung der siRNA an Zerebralarterien zu ermöglichen, eignet sich eine Applikation der siRNA in das zerebrale Ventrikelsystem mittels operativ eingebrachter Mini-Osmo-Pumpen, nach der für Antisense-Oligonukleotide entwickelten Methode von Stacey Reading und Joseph Brayden (2007). Durch die kurze Strecke zwischen dem zerebralen Ventrikelsystem und den Zerebralarterien wird eine effiziente Minderung der Genexpression durch die in das zerebrale Ventrikelsystem infundierte siRNA in Zerebralarterien vermittelt.

#### 4.4) Limitation der Messmethode der myogenen und pharmakavermittelten Vasokonstriktion

Um möglichst physiologische Bedingungen bei den Messungen der myogenen Vasokonstriktion zu ermöglichen, erfolgte eine kontinuierliche Temperierung der das Gefäß umspülenden Lösung auf 37°C und eine Begasung der Badlösung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) zur Einhaltung physiologischer arterieller Blutgaskonzentrationen. Die Aufrechterhaltung des intravaskulären Druckes erfolgte von beiden Seiten des eingespannten Gefäßes, um über die gesamte Gefäßlänge einen möglichst ähnlichen intravaskulären Druck zu erzeugen. Die Perfusion und Umspülung des Gefäßes mit einer elektrolyt-, nährstoff- und kalziumhaltigen Salzlösung (pH 7,4) wurde mit Natriumbikarbonat als physiologisches Puffersystem durchgeführt. Vor jeder Messung wurden im Gefäß verbliebene Blutreste ausgespült, um durch die Blutgerinnung ausgelöste Effekte auf die Vasokonstriktion zu vermeiden. Der physiologischen Salzlösung wurden keine Proteine zugesetzt, da eine hohe Konzentration von Albumin durch deren Bindung von freiem ionisiertem Kalzium einen negativen Effekt auf die myogene Autoregulation der Arterien ausüben kann (Baker et al., 1981).

Zur Verbesserung der physiologischen Bedingungen der myogenen Vasokonstriktion könnte ein Zusatz von niedrigen Konzentrationen von Albumin und zellulären Blutbestandteilen, wie beispielsweise Erythrozyten und Thrombozyten, führen. Dies erfordert allerdings einen hohen labortechnischen Aufwand und eine ausreichende intravaskuläre Perfusion des Gefäßes. Um eine Blutgerinnung der zellulären Blutbestandteile zu vermeiden, ist außerdem ein Zusatz von antikoagulatorisch wirkenden Pharmaka nötig.

Bei einem niedrigen intravaskulären Druck von 5 mmHg kam es aufgrund der mangelnden Gewebstütze häufig zum partiellen Kollabieren des Gefäßes, was eine akkurate Bestimmung des Außendurchmessers mittels Videomikroskopie erschwerte. Die Veränderung der dem Gefäß anliegenden Zugspannung hat einen gravierenden Effekt auf die Stärke der myogenen Vasokonstriktion (Davis und Hill, 1999). Nach jeder Änderung des intravaskulären Druckes sinkt die dem Gefäß anliegende Zugspannung. Nach jeder Änderung des intravaskulären Druckes fand deshalb eine Adjustierung der dem Gefäß anliegenden axialen Zugspannung statt. Die dem Gefäß anliegende Zugspannung befand sich in einem Bereich von ca. 1-5 mN. Hiermit ließ sich die optimale myogene Gefäßantwort erzielen, da die Aufrechterhaltung einer moderaten Zugspannung auf Arterien die stärkste myogene Gefäßantwort ermöglicht (Guo et al., 2007).

Je kleiner der arterielle Gefäßquerdurchmesser ausfällt, desto stärker verläuft die myogene arterielle Vasokonstriktion (Davis und Hill, 1999). Auf Grund präparativer Limitationen konnten Gefäßabschnitte mit minimal 80 µm (an Zerebralarterien) und 115 µm (an Mesenterialarterien) Außendurchmesser isoliert werden. Die Präparation von Gefäßabschnitten mit einem kleineren Gefäßquerdurchmesser könnte eine stärkere myogene Vasokonstriktion ermöglichen. Da isolierte Gefäße *in vitro* gemessen wurden, können Einflüsse des sympathischen Nervensystems auf die myogene Gefäßreaktion ausgeschlossen werden.

Seit Anfang der achtziger Jahre stehen zwei unterschiedliche Methoden zur Erforschung der vasokonstriktorisches Eigenschaften isolierter kleiner Arterien

zur Verfügung: Bei der als „Druck-Myografie“ bekannten Methode wird der dem Gefäß anliegende intravaskuläre Druck eingestellt und die Veränderung des Außendurchmessers des Gefäßes aufgezeichnet. Bei der als „Kraft-Myografie“ bezeichneten Methode wird unter isometrischen Bedingungen die der Gefäßwand anliegende Kraft aufgezeichnet. Verschiedene Gruppen demonstrierten eine höhere Sensitivität und niedrigere Schwelle zum Auslösen der durch konstriktorische Pharmaka-vermittelten Gefäßreaktion unter isometrischen Bedingungen durch Kraft-Myografie (McPherson, 1992; Tanko et al., 2000; VanBavel und Mulvany, 1994). Für die genaue Quantifizierung der myogenen Gefäßantwort scheint jedoch die Druck-Myografie besser geeignet zu sein, da mit dieser Methode Gefäße mit einem wesentlich kleineren Außendurchmesser untersucht werden können.

#### 4.5) Ausblick und weitere Forschungsmöglichkeiten

Verschiedene Strukturen werden aktuell als potenzielle Mechanosensoren in der Vermittlung der agonistunabhängigen myogenen Vasokonstriktion diskutiert. Selektive und unselektive Kationenkanäle (z.B. TRP-Kanäle), Integrine und Zytoskelettelemente, sowie in der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran verankerte Proteine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden hierfür in Betracht gezogen (Hill et al., 2009). Eine Limitation der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche an gendefizienten Mäusen war die nicht sicher ausschließbare Möglichkeit der Kompensation der physiologischen Funktion des ausgeschalteten Rezeptors durch andere Rezeptoren.

Eine Möglichkeit den Einfluss von kompensatorischen Effekten des Organismus zu minimieren ist der Einsatz von siRNA zur Verminderung der Genexpression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors. Selektiv gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichtete siRNA führt kurzfristig innerhalb von Stunden zu einer starken Minderung der Genexpression des Rezeptors auf Zelloberflächen. Durch die schnelle Wirkweise von siRNA wird der Einfluss von langfristigen kompensatorischen Effekten des Körpers auf den Funktionsverlust des Rezeptors, ausgelöst durch



siRNA, minimiert. Ein Ansatz zur weiteren Erforschung der Rolle des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der myogenen Vasokonstriktion könnte durch das Einbringen von siRNA in einen Modellorganismus, wie Mäuse oder Ratten, mit anschließender Isolation von Arterien und Messung der Stärke der myogenen Vasokonstriktion im Vergleich zu Kontrolltieren bewerkstelligt werden.

siRNA wurde schon erfolgreich zur Untersuchung der myogenen Vasokonstriktion in Tieren angewendet. Nach Applikation von gegen den TRPM4 Kanal gerichteter siRNA in das zerebrale Ventrikelsystem von Ratten konnte an isolierten Zerebralarterien im Gegensatz zu Gefäßen von unbehandelten Kontrolltieren eine wesentlich niedrigere myogene Gefäßantwort gemessen werden (Reading und Brayden, 2007). Auch durch Messung der myogenen Vasokonstriktion an isolierten Gefäßen von AT<sub>1A</sub>- und AT<sub>1B</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren könnte die funktionelle Rolle dieser Rezeptoren in der myogenen Gefäßantwort weiter quantifiziert werden.

Eine Alternative zur Messung der myogenen Vasokonstriktion an isolierten Gefäßen ist die Untersuchung des Blutflusses durch das Gefäßbett von isolierten Organen aus Mäusen. Hierzu eignet sich ein Vergleich des Blutflusses beispielsweise durch isolierte Nieren aus AT<sub>1A</sub>- und AT<sub>1B</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen mit AT<sub>1A</sub>- oder AT<sub>1B</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen und nicht gendefizienten Mäusen.

Durch molekularbiologische Methoden, wie beispielsweise dem Einsatz von intramolekularem FRET (Förster-Resonanz-Energie-Transfer), können einzelne Rezeptorstrukturen durch Fluorochrome markiert und Rezeptorkonformationsänderungen sichtbar gemacht werden. Diese Methode eignet sich zur weiteren Untersuchung der von Yasuda et al. (2008a) beschriebenen, durch eine mechanische Rezeptoraktivierung ausgelösten AT<sub>1A</sub>-Rezeptorkonformationsänderung. Der Mechanismus der mechanischen Rezeptoraktivierung und der Zusammenhang mit der myogenen Vasokonstriktion ließe sich hiermit weiter erforschen.

Eine verstärkte myogene Vasokonstriktion konnte druckmyografisch sowohl an isolierten Zerebralarterien von Mäusen und Ratten mit Hypertonie und Diabetes mellitus Typ II, als auch an Koronararterien von kardial hypertrophierten Mäusen nachgewiesen werden (Ahn et al., 2007; Harris et al., 2008; Petersen et al., 2002). An 9131 55-80 Jahre alten Patienten mit mittelgradiger und schwerer essenzieller Hypertonie wurde eine randomisierte, doppelblinde klinische Studie zum Vergleich der antihypertensiven Therapie mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker Losartan oder dem Betablocker Atenolol durchgeführt. Durch die Therapie mit Losartan konnte im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine durchschnittliche Blutdrucksenkung um systolisch 30,2 mmHg (anstatt 29,1 mmHg) erreicht werden und die Inzidenz- und Komplikationsrate von Diabetes mellitus verringert werden (Dahlof et al., 2002). Aufgrund der guten antihypertensiven Eigenschaften werden Angiotensin-Rezeptor-Blocker als Therapie der ersten Wahl zur Behandlung der arteriellen Hypertonie eingesetzt.

Angiotensin-Rezeptor-Blocker reduzieren die Gesamtmortalität von Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz im selben Maße wie eine Therapie mit ACE-Hemmern. Angiotensin-Rezeptor-Blocker führen im Gegensatz zu ACE-Hemmern jedoch nicht zu einem Bradykininanstieg mit häufigen Nebenwirkungen eines Reizhustens oder Angioödems. In einer doppelblinden klinischen Studie an 3152 Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz konnte bei einer Therapie mit dem Angiotensin-Rezeptor-Blocker Losartan oder dem ACE-Hemmer Captopril kein signifikanter Unterschied in der Reduktion der Gesamtmortalität festgestellt werden (Konstam et al., 2005). In einer doppelblinden klinischen Studie an 7601 Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz führte eine Therapie mit dem Angiotensin-Rezeptor-Blocker Candesartan im Gegensatz zur Placebothherapie zu einer signifikanten Reduktion der kardiovaskulär bedingten Mortalität ( $p = 0,012$ ) und der Hospitalisierungsrate ( $p = < 0,0001$ ) (Pfeffer et al., 2003). Angiotensin-Rezeptor-Blocker werden deshalb in der Therapie der Herzinsuffizienz ab Stadium NYHA III bei Patienten mit ACE-Hemmer-Intoleranz eingesetzt.

Die diabetische Nephropathie ist eine Mikroangiopathie der Glomeruli, bei der die Regulation der myogenen Vasokonstriktion gestört ist (Khavandi et al.,

2009). Bei Patienten mit Diabetes mellitus führt eine Monotherapie mit ACE-Hemmern oder Angiotensin-Rezeptor-Blockern gegenüber Placebothherapie zu einer signifikanten Verzögerung der Entwicklung und Progression der diabetischen Nephropathie und reduziert das Risiko für Tod, Dialysepflichtigkeit und Nierentransplantation (Brenner et al., 2001; Lewis et al., 1993; Lewis et al., 2001; Parving et al., 2001). In einer doppelblinden klinischen Studie an 25620 Patienten mit Diabetes mellitus zeigen Angiotensin-Rezeptor-Blocker gegenüber ACE-Hemmern keinen signifikanten Vorteil in Bezug auf Dialysepflichtigkeit, Verdopplung des Serum-Kreatinin-Wertes und Tod (Mann et al., 2008). Eine Kombinationstherapie bei Diabetikern von ACE-Hemmern mit Angiotensin-Rezeptor-Blockern führt im Vergleich zur Monotherapie zu einem erhöhtem Risiko für Tod und Dialysepflichtigkeit (Mann et al., 2008). Deshalb wird als Therapie zur Verzögerung der Inzidenz und Progression der diabetischen Nephropathie weiterhin die Monotherapie mit einem ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Blocker empfohlen.

Auch die Erforschung der Beteiligung von Serotonin (5-HT<sub>B</sub>)-Rezeptoren, die wegen ihres vasokonstriktorisches Effektes an Koronararterien einen Ansatzpunkt der pharmakologischen Therapie der Migräne bilden, an der myogenen Vasokonstriktion könnte neue Therapieoptionen ermöglichen. Neben Angiotensin II spielen weitere Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems eine Rolle in der Blutdruckregulation.

Nach neuen Erkenntnissen kann sowohl die Protease Renin, als auch deren Vorstufe Prorenin, an einen eigenen, in vielen Geweben vorkommenden Rezeptor (dem Proreninrezeptor) binden, was zu einer verstärkten lokalen Bildung von Angiotensin II führt (Nguyen und Muller, 2010). Aliskiren ist ein Medikament, das direkt an die Proteinase Renin bindet und dadurch die Umwandlung von Angiotensinogen in Angiotensin I (und indirekt die Bildung von Angiotensin II) verhindert. Klinisch ist die blutdrucksenkende Wirkung von Aliskiren bei Hypertonikern vergleichbar mit der von Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten und ACE-Hemmern in Monotherapie (Moutzouri et al., 2010). Große Studien zum Risiko der Dialysepflichtigkeit, Mortalität und Nierentransplantation gegenüber der Standardtherapie bei Diabetikern stehen

noch aus. An 599 Patienten mit Diabetes mellitus konnte bei einer Kombinationstherapie von Aliskiren (oder einem Placebo) mit dem Angiotensin-Rezeptor-Blocker Losartan eine verstärkte renoprotektive Wirkung nachgewiesen werden (Parving et al., 2008). Dies verdeutlicht, dass das therapeutische Potenzial zur Behandlung der arteriellen Hypertonie, diabetischen Nephropathie und anderen vaskulären Erkrankungen noch nicht vollständig ausgeschöpft ist. Durch die kontinuierliche Erforschung der pathophysiologischen Zusammenhänge dieser Erkrankungen mit der myogenen Vasokonstriktion können neue Erkenntnisse gewonnen und hoffentlich auch weitere therapeutische Maßnahmen erschlossen werden.

## 5.) Zusammenfassung

Die myogene Vasokonstriktion dient in Säugetieren der Aufrechterhaltung eines konstanten hydrostatischen Kapillardruckes zur Vermeidung von Ödemen. An isolierten Arterien kann die myogene Vasokonstriktion unabhängig von neuronalen und hormonellen Einflüssen durch die Veränderung des intravaskulären Druckes ausgelöst werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des (Angiotensin II)-Rezeptors  $AT_{1A}$  in der arteriellen myogenen Vasokonstriktion. Hohe Proteinkonzentrationen dieses Rezeptors konnten in zerebralen, mesenterialen und renalen Widerstandsarterien nachgewiesen werden. In vorhergehenden Untersuchungen wurde der  $AT_{1A}$ -Rezeptor auf zellulärer Ebene agonistunabhängig mechanisch durch Dehnung der Zellmembran aktiviert. In  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen wurde ein erniedrigter systolischer Blutdruck nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen eine Rolle des  $AT_{1A}$ -Rezeptors in der myogenen Vasokonstriktion vermuten.

Mittels Druck-Myografie wurde im Rahmen dieser Arbeit die myogene Vasokonstriktion isolierter Mesenterial- und Zerebralarterien über einen physiologischen intravaskulären Druckbereich von 5 bis 160 mmHg gemessen. Es erfolgte der Vergleich der Stärke der myogenen Vasokonstriktion von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen im Gegensatz zu Gefäßen von gentechnisch unveränderten Mäusen mit gleichem genetischen Hintergrund. An Mesenterialarterien von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen konnte im Gegensatz zu Gefäßen von nicht gendefizienten Mäusen ein signifikant erniedrigter intravaskulärer Druck im Bereich von 120-160 mmHg nachgewiesen werden. Der größte Unterschied in der Stärke der myogenen Vasokonstriktion zwischen den Vergleichsgruppen lag bei absolut 17,9% (bei 160 mmHg) und relativ 46,6% (bei 150 mmHg). An Zerebralarterien konnte ein signifikant erniedrigter intravaskulärer Druck nur bei 50 und 60 mmHg nachgewiesen werden.

Es erfolgte außerdem der Vergleich der pharmakainduzierten arteriellen Vasokonstriktion an Gefäßen von  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten und nicht gendefizienten Mäusen unter druckkonstanten Bedingungen. An Zerebralarterien aus  $AT_{1A}$ -Rezeptor gendefizienten Mäusen zeigte sich eine

signifikant erniedrigte Stärke der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion. Die pharmakavermittelte Vasokonstriktion konnte an isolierten Zerebralarterien in folgender Reihenfolge absteigender Stärke gemessen werden: Endothelin 1 > Phenylephrin > Angiotensin II > Vasopressin. An Mesenterialarterien konnte kein signifikanter Unterschied in der pharmakainduzierten Vasokonstriktion von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten und nicht AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gendefizienten Mäusen festgestellt werden.

Auch die molekularbiologische Testung von gegen den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor gerichteter siRNA wurde im Rahmen dieser Arbeit für eine spätere Anwendung im Tiermodell durchgeführt. Es erfolgte die Herstellung eines exprimierenden Plasmids, das eine Desoxyribonukleinsäure (DNA) Sequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors, die an ein Fluoreszenzmolekül gekoppelt war, beinhaltete. Durch Einschleusung dieses Plasmids in Zellen und anschließende polyklonale und monoklonale Selektion konnte eine stabile, den AT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimierende Zelllinie hergestellt werden. Da im Plasmid die DNA-Sequenz des Rezeptors direkt mechanisch an die Sequenz des Fluoreszenzproteins gekoppelt war, diente die Abnahme der intrazellulären Fluoreszenz, im Vergleich zu unbehandelten den Rezeptor exprimierenden Zellen, als Maß für die Wirkstärke der siRNA in der Verminderung der Genexpression des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors. Es konnte eine maximale prozentuale Wirkstärke der siRNA von 87,6% erreicht werden. Eine Zunahme der Wirkstärke ließ sich generell durch eine höhere Endkonzentration und eine längere Einwirkdauer der siRNA erzielen.

Die druckmyografisch erhobenen Messungen dieser Arbeit zeigen, dass der AT<sub>1A</sub>-Rezeptor eine Rolle in der arteriellen myogenen Vasokonstriktion spielt. Durch Applikation der hier getesteten siRNA im Tiermodell könnten weitere Erkenntnisse zur Rolle des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in der arteriellen Vasoregulation gewonnen werden.

## Abstract (Englische Zusammenfassung):

In mammals, myogenic vasoconstriction is a key factor for keeping up hydrostatic capillary pressure to prevent the formation of edema. In isolated arteries, myogenic vasoconstriction can be triggered by a rise in intravascular pressure, independent of neural and hormonal stimuli. This dissertation is about the role of the angiotensin II AT<sub>1A</sub>-receptor in myogenic vasoconstriction of arteries. In cerebral, mesenteric and renal arteries high AT<sub>1A</sub>-receptor protein levels could be detected. In previous studies on a cellular level, the AT<sub>1A</sub>-receptor could be activated by mechanically stretching the cell membrane, independently of the agonist angiotensin II. In AT<sub>1A</sub>-receptor knock-out mice a lower systolic blood pressure in comparison with wildtype mice was detected. These findings indicate a role for the AT<sub>1A</sub>-receptor in myogenic vasoconstriction.

In this dissertation pressure-induced myogenic vasoconstriction of isolated cerebral and mesenteric arteries was measured over a physiological intravascular pressure range of 5 to 160 mmHg. The intensity of myogenic vasoconstriction of arteries from AT<sub>1A</sub> receptor knock-out and wildtype mice was compared. A significant difference in the intensity of myogenic vasoconstriction was shown in mesenteric arteries in a pressure range from 120 to 160 mmHg. The biggest absolute difference in intensity of myogenic vasoconstriction between the two groups was 17,9% (at 160 mmHg) and the biggest relative difference in intensity of myogenic vasoconstriction between the two groups was 46,6% (at 150 mmHg). In cerebral arteries a significant difference in the intensity of myogenic vasoconstriction could only be detected at 50 and 60 mmHg intravascular pressure.

Furthermore, the intensity of vasoconstriction after stimulation with pharmaceuticals was compared in mesenteric and cerebral arteries from AT<sub>1A</sub>-receptor knock-out and wildtype mice. A significantly reduced vasoconstriction was shown in cerebral arteries of AT<sub>1A</sub>-receptor knock-out mice. The applied pharmaceuticals showed a vasoconstrictor response in the following order of decreasing intensity: endothelin 1 > phenylephrin > angiotensin II >

vasopressin. No significant difference in intensity of vasoconstriction could be detected in mesenteric arteries of AT<sub>1A</sub>-receptor knock-out and wildtype mice.

For future application in the vasculature of animals, small interfering ribonucleid acid (siRNA) against the AT<sub>1A</sub>-receptor was tested on a cellular level. A plasmid containing the desoxyribonucleid acid (DNA) sequence of the AT<sub>1A</sub>-receptor physically linked to the sequence of a fluorescence protein was created. This plasmid was then transfected into cells, and a stable cell line was created after polyclonal and monoclonal selection. As the DNA sequence of the AT<sub>1A</sub>-receptor was physically linked to the sequence of a fluorescence protein, the reduction of intracellular fluorescence of cells treated with siRNA in comparison to cells not treated with siRNA could be taken as measurement of the intensity of reducing the genetic expression of the AT<sub>1A</sub> receptor. A maximal efficacy in the reduction of fluorescence of 87,6% was shown. Generally, by using a higher siRNA concentration and residence time, an increase in siRNA efficacy could be reached.

The data on pressure-induced myogenic vasoconstriction from this dissertation confirm the thesis, that the AT<sub>1A</sub>-receptor has an influence in myogenic vasoconstriction. Further research on this thesis can be done by the future application of the siRNA against the AT<sub>1A</sub>-receptor in the vasculature of animals.



## Kongressbeiträge

1.) Schneider, H., Blodow, S., **Wizemann, R.**, Storch, U., Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2011). Gq/11-protein-coupled receptors function as mechanosensors in myogenic vasoconstriction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 383, Supplement 1, 224. (Postervortrag in Frankfurt bei der 77. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)).

2.) Schneider, H., Blodow, S., **Wizemann, R.**, Storch, U., Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2011). G-protein-coupled receptors serve as mechanosensory elements to determine arterial myogenic tone. *Acta Physiologica* 201, Supplement 682, P075. (Postervortrag in Regensburg beim 90th Annual Meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG)).

## Abkürzungsverzeichnis:

ACE	Angiotensin-konvertierendes-Enzym
ASO	Antisense-Oligonukleotid (kurze Ribonukleinsäuresequenz)
AT <sub>1A</sub> R	Angiotensin II wirkt an diesem zellmembranständigen Rezeptor als Agonist
bp	Basenpaare (Einheit zur Längenbestimmung von Desoxyribonukleinsäure-Sequenzen)
CHO-K1	Zelllinie, die aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters gewonnen wurde
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Erweitertes grünes Fluoreszenzprotein (engl.: enhanced green fluorescence protein)
EYFP	Erweitertes gelbes Fluoreszenzprotein (engl.: enhanced yellow fluorescence protein)
GMZ	glatte Muskelzellen
ifKK	intrazelluläre Konzentration an freien Kalziumionen
IRAP	insulinregulierte Aminopeptidase
MLK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MLP	Myosin-Leichtketten-Phosphatase
mM	millimolar ( $10^{-3}$ Mol pro Liter)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (in Deutschland gesetzliche Einheit für die Angabe von Drücken von Körperflüssigkeiten)
nM	nanomolar ( $10^{-9}$ Mol pro Liter)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäure-Sequenzen)
PSS	physiologische Salzlösung (engl.: physiological salt solution)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RISC	ribonukleinsäureinduzierter Stillhaltekomplex (Enzym)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)

---

sgKK	spannungsgesteuerter, für Kalziumionen durchlässiger Ionenkanal
siRNA	kleine, interferierende Ribonukleinsäure (engl.: small interfering RNA)
$\mu\text{M}$	micromolar ( $10^{-6}$ Mol pro Liter)

## Literaturverzeichnis:

- AbdAlla, S. Lothar, H. Abdel-tawab, A.M. und Quitterer, U. (2001). The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 276, 39721-39726.
- Agrawal, N. Dasaradhi, P.V. Mohmmmed, A. Malhotra, P. Bhatnagar, R.K. und Mukherjee, S.K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 657-685.
- Ahn, D.S. Choi, S.K. Kim, Y.H. Cho, Y.E. Shin, H.M. Morgan, K.G. und Lee, Y.H. (2007). Enhanced stretch-induced myogenic tone in the basilar artery of spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 44, 182-191.
- Akazawa, H. Yasuda, N. und Komuro, I. (2009). Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol* 302, 140-147.
- Albiston, A.L. Fernando, R.N. Yeatman, H.R. Burns, P. Ng, L. Daswani, D. Diwakarla, S. Pham, V. und Chai, S.Y. (2010). Gene knockout of insulin-regulated aminopeptidase: loss of the specific binding site for angiotensin IV and age-related deficit in spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 93, 19-30.
- Albiston, A.L. McDowall, S.G. Matsacos, D. Sim, P. Clune, E. Mustafa, T. Lee, J. Mendelsohn, F.A. Simpson, R.J. Connolly, L.M., *et al.* (2001). Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 276, 48623-48626.
- Arendshorst, W.J. und Thai, T.L. (2009). Regulation of the renal microcirculation by ryanodine receptors and calcium-induced calcium release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18, 40-49.
- Audoly, L.P. Oliverio, M.I. und Coffman, T.M. (2000). Insights into the functions of type 1 (AT1) angiotensin II receptors provided by gene targeting. *Trends Endocrinol Metab* 11, 263-269.
- Bader, M. und Ganten, D. (2008). Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med* 86, 615-621.
- Bai, N. Moien-Afshari, F. Washio, H. Min, A. und Laher, I. (2004). Pharmacology of the mouse-isolated cerebral artery. *Vascul Pharmacol* 41, 97-106.

- Baker, S., Jr. Cohen, A.J. Fray, J.C. und Laurens, N.J. (1981). Role of calcium and albumin in the autoregulation of renal perfusate flow. *J Physiol* 311, 1-9.
- Bao, J.X. Zhang, L.F. und Ma, J. (2007). Angiotensinogen and AT1R expression in cerebral and femoral arteries during hindlimb unloading in rats. *Aviat Space Environ Med* 78, 852-858.
- Bayliss, W.M. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* 28, 220-231.
- Bertrand, J.R. Pottier, M. Vekris, A. Opolon, P. Maksimenko, A. und Malvy, C. (2002). Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1000-1004.
- Bevan, J.A. und Laher, I. (1991). Pressure and flow-dependent vascular tone. *Faseb J* 5, 2267-2273.
- Bogdarina, I.G. King, P.J. und Clark, A.J. (2009). Characterization of the angiotensin (AT1b) receptor promoter and its regulation by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 43, 73-80.
- Bond, R.A. und Ijzerman, A.P. (2006). Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 27, 92-96.
- Brenner, B.M. Cooper, M.E. de Zeeuw, D. Keane, W.F. Mitch, W.E. Parving, H.H. Remuzzi, G. Snapinn, S.M. Zhang, Z. und Shahinfar, S. (2001). Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 345, 861-869.
- Carmines, P.K. und Fleming, J.T. (1990). Control of the renal microvasculature by vasoactive peptides. *FASEB J* 4, 3300-3309.
- Cassis, L.A. Police, S.B. Yiannikouris, F. und Thatcher, S.E. (2008). Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 10, 93-98.
- Cipolla, M.J. Gokina, N.I. und Osol, G. (2002). Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *Faseb J* 16, 72-76.
- Csikos, T. Chung, O. und Unger, T. (1998). Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT2 receptor. *J Hum Hypertens* 12, 311-318.

- Dahlof, B. Devereux, R.B. Kjeldsen, S.E. Julius, S. Beevers, G. de Faire, U. Fyhrquist, F. Ibsen, H. Kristiansson, K. Lederballe-Pedersen, O., *et al.* (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359, 995-1003.
- Davis, M.J. Davis, A.M. Ku, C.W. und Gashev, A.A. (2009). Myogenic constriction and dilation of isolated lymphatic vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H293-302.
- Davis, M.J. und Hill, M.A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 79, 387-423.
- de Gasparo, M. Catt, K.J. Inagami, T. Wright, J.W. und Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52, 415-472.
- Driscoll, M. und Chalfie, M. (1991). The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* 349, 588-593.
- Evans, M.J. und Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fleming, I. Kohlstedt, K. und Busse, R. (2006). The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15, 8-13.
- Folkow, B. (1952). A study of the factors influencing the tone of denervated blood vessels perfused at various pressures. *Acta Physiol Scand* 27, 99-117.
- Geary, G.G. Buchholz, J.N. und Pearce, W.J. (2003). Maturation depresses mouse cerebrovascular tone through endothelium-dependent mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R734-741.
- Gordon, J.W. Scangos, G.A. Plotkin, D.J. Barbosa, J.A. und Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7380-7384.
- Gros, R. Van Wert, R. You, X. Thorin, E. und Husain, M. (2002). Effects of age, gender, and blood pressure on myogenic responses of mesenteric arteries from C57BL/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H380-388.

- Gschwend, S. Henning, R.H. Pinto, Y.M. de Zeeuw, D. van Gilst, W.H. und Buikema, H. (2003). Myogenic constriction is increased in mesenteric resistance arteries from rats with chronic heart failure: instantaneous counteraction by acute AT1 receptor blockade. *Br J Pharmacol* 139, 1317-1325.
- Guo, H. Humphrey, J.D. und Davis, M.J. (2007). Effects of biaxial stretch on arteriolar function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H2378-2386.
- Guyton, A.C. Coleman, T.G. Fourcade, J.C. und Navar, L.G. (1969). Physiologic control of arterial pressure. *Bull N Y Acad Med* 45, 811-830.
- Harder, D.R. (1984). Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circ Res* 55, 197-202.
- Harris, A.K. Elgebaly, M.M. Li, W. Sachidanandam, K. und Ergul, A. (2008). Effect of chronic endothelin receptor antagonism on cerebrovascular function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R1213-1219.
- Hermsteiner, M. Zoltan, D.R. und Kunzel, W. (2001). The vasoconstrictor response of uterine and mesenteric resistance arteries is differentially altered in the course of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 100, 29-35.
- Hernandez Schulman, I. Zhou, M.S. und Raij, L. (2007). Cross-talk between angiotensin II receptor types 1 and 2: potential role in vascular remodeling in humans. *Hypertension* 49, 270-271.
- Hill, M.A. Meininger, G.A. Davis, M.J. und Laher, I. (2009). Therapeutic potential of pharmacologically targeting arteriolar myogenic tone. *Trends Pharmacol Sci*.
- Hill, M.A. Sun, Z. Martinez-Lemus, L. und Meininger, G.A. (2007). New technologies for dissecting the arteriolar myogenic response. *Trends Pharmacol Sci* 28, 308-315.
- Hirano, K. (2007). Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci* 104, 109-115.

- Holstein, A.F. und Weiss, C. (1967). [On the effect of the smooth musculature in the tunica albuginea in the testes of rabbits; measurement of the interstitial pressure]. *Z Gesamte Exp Med* 142, 334-337.
- Hunyady, L. und Turu, G. (2004). The role of the AT1 angiotensin receptor in cardiac hypertrophy: angiotensin II receptor or stretch sensor? *Trends Endocrinol Metab* 15, 405-408.
- Ikebe, T. Shimada, T. Ina, K. Kitamura, H. und Nakatsuka, K. (2001). The three-dimensional architecture of retinal blood vessels in KK mice, with special reference to the smooth muscle cells and pericytes. *J Electron Microsc (Tokyo)* 50, 125-132.
- Ito, I. Jarajapu, Y.P. Grant, M.B. und Knot, H.J. (2007). Characteristics of myogenic tone in the rat ophthalmic artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H360-368.
- Ito, M. Oliverio, M.I. Mannon, P.J. Best, C.F. Maeda, N. Smithies, O. und Coffman, T.M. (1995). Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3521-3525.
- Jackson, P.A. und Duling, B.R. (1989). Myogenic response and wall mechanics of arterioles. *Am J Physiol* 257, H1147-1155.
- Jarajapu, Y.P. und Knot, H.J. (2002). Role of phospholipase C in development of myogenic tone in rat posterior cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2234-2238.
- Johnson, R.P. El-Yazbi, A.F. Takeya, K. Walsh, E.J. Walsh, M.P. und Cole, W.C. (2009). Ca<sup>2+</sup> sensitization via phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit at threonine-855 by Rho kinase contributes to the arterial myogenic response. *J Physiol* 587, 2537-2553.
- Joyner, M.J. Charkoudian, N. und Wallin, B.G. (2008). A sympathetic view of the sympathetic nervous system and human blood pressure regulation. *Exp Physiol* 93, 715-724.
- Kashihara, T. Goto, K. Sahara, Y. Nakayama, K. und Ishikawa, T. (2009). Differential involvement of alpha1-adrenoceptors in vasoconstrictor responses to cooling in mouse plantar arteries in vitro and in vivo. *J Smooth Muscle Res* 45, 87-95.
- Keeton, T.K. und Campbell, W.B. (1980). The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev* 32, 81-227.



- Khavandi, K. Greenstein, A.S. Sonoyama, K. Withers, S. Price, A. Malik, R.A. und Heagerty, A.M. (2009). Myogenic tone and small artery remodelling: insight into diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 24, 361-369.
- Khromov, A. Choudhury, N. Stevenson, A.S. Somlyo, A.V. und Eto, M. (2009). Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca<sup>2+</sup> sensitization force of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 284, 21569-21579.
- Kim, H.R. Appel, S. Vetterkind, S. Gangopadhyay, S.S. und Morgan, K.G. (2008). Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *J Cell Mol Med* 12, 2165-2180.
- Kizub, I.V. Pavlova, O.O. Johnson, C.D. Soloviev, A.I. und Zholos, A.V. (2010). Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats. *Br J Pharmacol* 159, 1724-1731.
- Knot, H.J. und Nelson, M.T. (1998). Regulation of arterial diameter and wall [Ca<sup>2+</sup>] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol* 508 ( Pt 1), 199-209.
- Konstam, M.A. Neaton, J.D. Poole-Wilson, P.A. Pitt, B. Segal, R. Sharma, D. Dasbach, E.J. Carides, G.W. Dickstein, K. Riegger, G., *et al.* (2005). Comparison of losartan and captopril on heart failure-related outcomes and symptoms from the losartan heart failure survival study (ELITE II). *Am Heart J* 150, 123-131.
- Kuo, L. Davis, M.J. und Chilian, W.M. (1988). Myogenic activity in isolated subepicardial and subendocardial coronary arterioles. *Am J Physiol* 255, H1558-1562.
- Lagaud, G. Gaudreault, N. Moore, E.D. Van Breemen, C. und Laher, I. (2002). Pressure-dependent myogenic constriction of cerebral arteries occurs independently of voltage-dependent activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2187-2195.
- Langford, K. Frenzel, K. Martin, B.M. und Bernstein, K.E. (1992). The genomic organization of the rat AT1 angiotensin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 183, 1025-1032.

- Lavoie, J.L. und Sigmund, C.D. (2003). Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144, 2179-2183.
- Levick, R. (2010). *An Introduction to Cardiovascular Physiology*, 5th Edition edn (Hodder Arnold).
- Lewis, E.J. Hunsicker, L.G. Bain, R.P. und Rohde, R.D. (1993). The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329, 1456-1462.
- Lewis, E.J. Hunsicker, L.G. Clarke, W.R. Berl, T. Pohl, M.A. Lewis, J.B. Ritz, E. Atkins, R.C. Rohde, R. und Raz, I. (2001). Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345, 851-860.
- Li, J. Zhao, H. Dipette, D.J. Supowit, S.C. und Wang, D.H. (1999). Reciprocal role of the AT1 receptor in modulating renal and neuronal AT1 mRNA expression. *J Am Soc Nephrol* 10 *Suppl* 11, S18-22.
- Li, X.C. und Zhuo, J.L. (2007). Selective knockdown of AT1 receptors by RNA interference inhibits Val5-ANG II endocytosis and NHE-3 expression in immortalized rabbit proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C367-378.
- Lohn, M. Kampf, D. Gui-Xuan, C. Haller, H. Luft, F.C. und Gollasch, M. (2002). Regulation of arterial tone by smooth muscle myosin type II. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1383-1389.
- Loufrani, L. Henrion, D. Chansel, D. Ardaillou, R. und Levy, B.I. (1999). Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 291, 583-588.
- Loufrani, L. Matrougui, K. Li, Z. Levy, B.I. Lacolley, P. Paulin, D. und Henrion, D. (2002). Selective microvascular dysfunction in mice lacking the gene encoding for desmin. *Faseb J* 16, 117-119.
- Mann, J.F. Schmieder, R.E. McQueen, M. Dyal, L. Schumacher, H. Pogue, J. Wang, X. Maggioni, A. Budaj, A. Chaithiraphan, S., *et al.* (2008). Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 372, 547-553.

- Martinez-Lemus, L.A. Crow, T. Davis, M.J. und Meininger, G.A. (2005).  $\alpha$ 3- and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of skeletal muscle resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H322-329.
- Matsusaka, T. Nishimura, H. Utsunomiya, H. Kakuchi, J. Niimura, F. Inagami, T. Fogo, A. und Ichikawa, I. (1996). Chimeric mice carrying 'regional' targeted deletion of the angiotensin type 1A receptor gene. Evidence against the role for local angiotensin in the in vivo feedback regulation of renin synthesis in juxtaglomerular cells. *J Clin Invest* 98, 1867-1877.
- McCarron, J.G. Crichton, C.A. Langton, P.D. MacKenzie, A. und Smith, G.L. (1997). Myogenic contraction by modulation of voltage-dependent calcium currents in isolated rat cerebral arteries. *J Physiol* 498 ( Pt 2), 371-379.
- McPherson, G.A. (1992). Assessing vascular reactivity of arteries in the small vessel myograph. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19, 815-825.
- Mederos y Schnitzler, M. Storch, U. Meibers, S. Nurwakagari, P. Breit, A. Essin, K. Gollasch, M. und Gudermann, T. (2008). Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J* 27, 3092-3103.
- Mederos, Y.S.M. Storch, U. und Gudermann, T. (2010). AT(1) receptors as mechanosensors. *Curr Opin Pharmacol*.
- Michel, M.C. und Parra, S. (2008). Similarities and differences in the autonomic control of airway and urinary bladder smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378, 217-224.
- Miller-Wing, A.V. Hanesworth, J.M. Sardinia, M.F. Hall, K.L. Wright, J.W. Speth, R.C. Grove, K.L. und Harding, J.W. (1993). Central angiotensin IV binding sites: distribution and specificity in guinea pig brain. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 1718-1726.
- Milligan, G. (2003). Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 64, 1271-1276.
- Moutzouri, E. Florentin, M. Elisaf, M.S. Mikhailidis, D.P. und Liberopoulos, E.N. (2010). Aliskiren, a direct Renin inhibitor, in clinical practice: a new approach in the treatment of hypertension. *Curr Vasc Pharmacol* 8, 344-362.

- Nguyen, G. und Muller, D.N. (2010). The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol* 21, 18-23.
- O'Connell, M.K. Murthy, S. Phan, S. Xu, C. Buchanan, J. Spilker, R. Dalman, R.L. Zarins, C.K. Denk, W. und Taylor, C.A. (2008). The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. *Matrix Biol* 27, 171-181.
- Oishi, Y. Uezono, Y. Yanagihara, N. Izumi, F. Nakamura, T. und Suzuki, K. (1998). Transmural compression-induced proliferation and DNA synthesis through activation of a tyrosine kinase pathway in rat astrocytoma RCR-1 cells. *Brain Res* 781, 159-166.
- Oliverio, M.I. Best, C.F. Kim, H.S. Arendshorst, W.J. Smithies, O. und Coffman, T.M. (1997). Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *Am J Physiol* 272, F515-520.
- Oliverio, M.I. Best, C.F. Smithies, O. und Coffman, T.M. (2000). Regulation of sodium balance and blood pressure by the AT(1A) receptor for angiotensin II. *Hypertension* 35, 550-554.
- Oliverio, M.I. Madsen, K. Best, C.F. Ito, M. Maeda, N. Smithies, O. und Coffman, T.M. (1998). Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II. *Am J Physiol* 274, F43-50.
- Otsuka, T. Ibuki, C. Suzuki, T. Ishii, K. Yoshida, H. Kodani, E. Kusama, Y. Atarashi, H. Kishida, H. Takano, T., *et al.* (2008). Administration of the Rho-kinase inhibitor, fasudil, following nitroglycerin additionally dilates the site of coronary spasm in patients with vasospastic angina. *Coron Artery Dis* 19, 105-110.
- Parving, H.H. Lehnert, H. Brochner-Mortensen, J. Gomis, R. Andersen, S. und Arner, P. (2001). The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345, 870-878.
- Parving, H.H. Persson, F. Lewis, J.B. Lewis, E.J. und Hollenberg, N.K. (2008). Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 358, 2433-2446.

- Petersen, H.H. Choy, J. Stauffer, B. Moien-Afshari, F. Aalkjaer, C. Leinwand, L. McManus, B.M. und Laher, I. (2002). Coronary artery myogenic response in a genetic model of hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2244-2249.
- Pfeffer, M.A. Swedberg, K. Granger, C.B. Held, P. McMurray, J.J. Michelson, E.L. Olofsson, B. Ostergren, J. Yusuf, S. und Pocock, S. (2003). Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 362, 759-766.
- Piasecki, M.T. Smith, M.S. Soltis, E.E. und Perez, D.M. (1994). Identification of the mRNA for the novel alpha 1D-adrenoceptor and two other alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol* 46, 30-40.
- Qin, Y. Yasuda, N. Akazawa, H. Ito, K. Kudo, Y. Liao, C.H. Yamamoto, R. Miura, S. Saku, K. und Komuro, I. (2009). Multivalent ligand-receptor interactions elicit inverse agonist activity of AT(1) receptor blockers against stretch-induced AT(1) receptor activation. *Hypertens Res* 32, 875-883.
- Raffai, G. Lodi, C. Illyes, G. Nadasy, G. und Monos, E. (2008). Increased diameter and enhanced myogenic response of saphenous vein induced by two-week experimental orthostasis are reversible. *Physiol Res* 57, 175-183.
- Reading, S.A. und Brayden, J.E. (2007). Central role of TRPM4 channels in cerebral blood flow regulation. *Stroke* 38, 2322-2328.
- Reaux, A. Fournie-Zaluski, M.C. und Llorens-Cortes, C. (2001). Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab* 12, 157-162.
- Ruan, X. Oliverio, M.I. Coffman, T.M. und Arendshorst, W.J. (1999). Renal vascular reactivity in mice: AngII-induced vasoconstriction in AT1A receptor null mice. *J Am Soc Nephrol* 10, 2620-2630.
- Ruan, X. Wagner, C. Chatziantoniou, C. Kurtz, A. und Arendshorst, W.J. (1997). Regulation of angiotensin II receptor AT1 subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet. *J Clin Invest* 99, 1072-1081.
- Rudner, X.L. Berkowitz, D.E. Booth, J.V. Funk, B.L. Cozart, K.L. D'Amico, E.B. El-Moalem, H. Page, S.O. Richardson, C.D. Winters, B., *et al.* (1999).

- Subtype specific regulation of human vascular alpha(1)-adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation* 100, 2336-2343.
- Rush, J.W. und Aultman, C.D. (2008). Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl Physiol Nutr Metab* 33, 162-172.
- Sasamura, H. Hein, L. Krieger, J.E. Pratt, R.E. Kobilka, B.K. und Dzau, V.J. (1992). Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun* 185, 253-259.
- Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (1994). Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. *Alcohol Clin Exp Res* 18, 138-143.
- Sun, Y. (2010). Intracardiac renin-angiotensin system and myocardial repair/remodeling following infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48, 483-489.
- Tanko, L.B. Simonsen, U. Frobert, O. Gregersen, H. Bagger, J.P. und Mikkelsen, E.O. (2000). Vascular reactivity to nifedipine and Ca(2+) in vitro: the role of preactivation, wall tension and geometry. *Eur J Pharmacol* 387, 303-312.
- Tracey, W.D., Jr. Wilson, R.I. Laurent, G. und Benzer, S. (2003). painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* 113, 261-273.
- Tsuchida, S. Matsusaka, T. Chen, X. Okubo, S. Niimura, F. Nishimura, H. Fogo, A. Utsunomiya, H. Inagami, T. und Ichikawa, I. (1998). Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 101, 755-760.
- Vagnes, O. Feng, J.J. Iversen, B.M. und Arendshorst, W.J. (2000). Upregulation of V(1) receptors in renal resistance vessels of rats developing genetic hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, F940-948.
- van Esch, J.H. Gembardt, F. Sterner-Kock, A. Heringer-Walther, S. Le, T.H. Lassner, D. Stijnen, T. Coffman, T.M. Schultheiss, H.P. Danser, A.H., et al. (2010). Cardiac phenotype and angiotensin II levels in AT1a, AT1b, and AT2 receptor single, double, and triple knockouts. *Cardiovasc Res* 86, 401-409.

- VanBavel, E. und Mulvany, M.J. (1994). Role of wall tension in the vasoconstrictor response of cannulated rat mesenteric small arteries. *J Physiol* 477 ( Pt 1), 103-115.
- Vanderheyden, P.M. (2009). From angiotensin IV binding site to AT4 receptor. *Mol Cell Endocrinol* 302, 159-166.
- Vazquez, J. Correa de Adjoulian, M.F. Sumners, C. Gonzalez, A. Diez-Freire, C. und Raizada, M.K. (2005). Selective silencing of angiotensin receptor subtype 1a (AT1aR) by RNA interference. *Hypertension* 45, 115-119.
- Villardaga, J.P. Steinmeyer, R. Harms, G.S. und Lohse, M.J. (2005). Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol* 1, 25-28.
- Viswanathan, M. Selby, D.M. und Ray, P.E. (2000). Expression of renal and vascular angiotensin II receptor subtypes in children. *Pediatr Nephrol* 14, 1030-1036.
- Waldsee, R. Ahnstedt, H. Eftekhari, S. und Edvinsson, L. (2010). Involvement of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II in endothelin receptor expression in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298, H823-832.
- Wang, C.T. Zou, L.X. und Navar, L.G. (1997). Renal responses to AT1 blockade in angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 8, 535-542.
- Waterston, R.H. Lindblad-Toh, K. Birney, E. Rogers, J. Abril, J.F. Agarwal, P. Agarwala, R. Ainscough, R. Alexandersson, M. An, P., *et al.* (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.
- Weihprecht, H. Lorenz, J.N. Briggs, J.P. und Schnermann, J. (1991). Vasoconstrictor effect of angiotensin and vasopressin in isolated rabbit afferent arterioles. *Am J Physiol* 261, F273-282.
- Welsh, D.G. Morielli, A.D. Nelson, M.T. und Brayden, J.E. (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 90, 248-250.
- Wesselman, J.P. VanBavel, E. Pfaffendorf, M. und Spaan, J.A. (1996). Voltage-operated calcium channels are essential for the myogenic

- responsiveness of cannulated rat mesenteric small arteries. *J Vasc Res* 33, 32-41.
- Wichi, R.B. Farah, V. Chen, Y. Irigoyen, M.C. und Morris, M. (2007). Deficiency in angiotensin AT1a receptors prevents diabetes-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R1184-1189.
- Wolf, G. (2008). Novel aspects of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Front Biosci* 13, 4993-5005.
- Wu, X. Davis, G.E. Meininger, G.A. Wilson, E. und Davis, M.J. (2001). Regulation of the L-type calcium channel by alpha 5beta 1 integrin requires signaling between focal adhesion proteins. *J Biol Chem* 276, 30285-30292.
- Xie, Y.H. Wang, S.W. Zhang, Y. Edvinsson, L. und Xu, C.B. (2010). Up-regulation of G-protein-coupled receptors for endothelin and thromboxane by lipid-soluble smoke particles in renal artery of rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 107, 803-812.
- Yasuda, N. Akazawa, H. Qin, Y. Zou, Y. und Komuro, I. (2008a). A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type 1-receptor activation without the involvement of angiotensin II. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 393-399.
- Yasuda, N. Miura, S. Akazawa, H. Tanaka, T. Qin, Y. Kiya, Y. Imaizumi, S. Fujino, M. Ito, K. Zou, Y., *et al.* (2008b). Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep* 9, 179-186.
- Zamore, P.D. und Haley, B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* 309, 1519-1524.
- Zhang, J.Q. Ma, Y.X. Wang, D.W. und Xiao, J.M. (2006). [Selective knockdown of Angiotensin II receptor subtype 1a in rat vascular smooth muscle cells by RNA interference]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 34, 54-59.
- Zhang, Y. und Davidge, S.T. (1999). Effect of estrogen replacement on vasoconstrictor responses in rat mesenteric arteries. *Hypertension* 34, 1117-1122.
- Zhou, Y. Chen, Y. Dirksen, W.P. Morris, M. und Periasamy, M. (2003). AT1b receptor predominantly mediates contractions in major mouse blood vessels. *Circ Res* 93, 1089-1094.



- Zhou, Y. Dirksen, W.P. Chen, Y. Morris, M. Zweier, J.L. und Periasamy, M. (2005). A major role for AT1b receptor in mouse mesenteric resistance vessels and its distribution in heart and neuroendocrine tissues. *J Mol Cell Cardiol* 38, 693-696.
- Zhu, F. Liao, Y.H. Li, L.D. Cheng, M. Wei, F. Wei, Y.M. und Wang, M. (2006). Target organ protection from a novel angiotensin II receptor (AT1) vaccine ATR12181 in spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Immunol* 3, 107-114.
- Zou, Y. Akazawa, H. Qin, Y. Sano, M. Takano, H. Minamino, T. Makita, N. Iwanaga, K. Zhu, W. Kudoh, S., *et al.* (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* 6, 499-506.

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Basler	Moll
Baum	Mueller
Daut	Neubauer
Feuser	Neumüller
Gerdes	Plant
Grundmann	Renz
Grzeschik	Richter
Gudermann	Riße
Hertl	Schade
Holst	Schäfer
Kim-Berger	Schofer
Koolman	Schrader
Kroll	Sönnichsen
Lohoff	Vogelmeier
Maier	Wagner
Mandrek	Werner
Martin	Westermann

Meine akademischen Lehrer in Kassel waren die Herren:

Faß	Schuppert
-----	-----------

Mein akademischer Lehrer in Berlin war Herr:

Fobbe

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg und am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Betreuung von Prof. Dr. Gudermann und PD Dr. Mederos y Schnitzler angefertigt.

Prof. Dr. Gudermann danke ich für die kritische Beurteilung und Ermöglichung der im Rahmen dieser Arbeit geleisteten Forschung. Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Mederos y Schnitzler, der mir während des experimentellen Teiles der Arbeit und beim Anfertigen der Dissertation immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Durch seine konstruktive Kritik konnte ich nicht nur einen Einblick in wissenschaftliche Handlungsweisen erlangen, sondern auch in die Technik des sauberen wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt werden.

Weiterhin möchte ich Dr. Storch danken, die mir unermüdlich mit Ratschlägen zur Seite stand. Anna-Lena Forst danke ich für die Hilfe beim Anfertigen der Abbildungen der Vektoren. Weiterhin möchte ich den hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern und Kollegen sowie Eva Braun, Renate Heilmair, Dr. Hofmann und Dr. Chubanov für die Unterstützung beim experimentellen Teil meiner Arbeit danken.