

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der pharmakologischen Wirkung einer direkten Angiotensin AT2  
Rezeptor Stimulation mittels Genexpressionsanalyse auf hypertoniebedingte  
Organschäden in einem L-NAME Hypertoniemodell bei Ratten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sophie Thea Ruth Becker

aus Wiesbaden

Datum der Promotion: 10. März 2017

**Prolog**

**„Was Du ererbt von Deinen Vätern hast, erwirb es um es zu besitzen.“**

*Johann Wolfgang von Goethe*



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
1.1 Hypertonie	8
1.2 Prävalenz und Risikofaktoren der Hypertonie	8
1.2.1 Pathophysiologie der Hypertonie	9
1.2.2 Organschäden	10
1.3 Arteriell <span>es</span> Remodeling	10
1.4 Pulswellengeschwindigkeit	12
1.5 Oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion	13
1.5.1 Inflammation	15
1.5.2 Proliferation und Fibrose	16
1.5.3 Apoptose	17
1.6 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	19
1.6.1 Angiotensin II Typ 1 Rezeptor	21
1.6.2 Angiotensin II Typ 2 Rezeptor	21
1.7 Compound 21	22
<b>2 ZIELSETZUNG</b>	<b>25</b>
<b>3 MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>27</b>
3.1 Materialien	27
3.2 Methoden	27
3.2.1 Gewebep <span>ro</span> ben	27
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	28
3.2.2.1 Trizol RNA-Isolierung	28
3.2.2.2 Photometrische Analyse der RNA	29
3.2.2.3 Reverse Transkription - <i>SYBR<sup>TM</sup> green</i>	29

3.2.2.4	Analyse der Genexpression durch qRT-PCR - <i>SYBR™ green</i>	30
3.2.2.5	Oligonukleotide	32
3.2.2.6	<i>Primer-Optimierung - qRT-PCR - SYBR™ green</i>	33
3.2.2.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	34
3.2.2.8	qRT-PCR <i>Primer-Liste - SYBR™ green</i>	35
3.2.2.9	Analyse der Genexpression durch qRT-PCR - <i>TaqMan®</i> Sonden	39
3.2.2.10	Reverse Transkription - <i>TaqMan®</i> -Sonden	39
3.2.2.11	Prä-Amplifikationsreaktion – <i>TaqMan®</i> Sonden	40
3.2.2.12	qRT-PCR - <i>TaqMan® Microfluidic Cards</i>	40
3.2.2.13	qRT-PCR <i>Primer-Liste - TaqMan®</i>	42
3.3	Statistische Analyse	44
3.3.1	Relativer Expressionsunterschied	44
3.3.2	Deskriptive Statistik	45
3.3.3	Schliessende Statistik	45
3.3.4	Hauptkomponentenanalyse	46
3.4	Literaturrecherche	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Untersuchung der Expression ausgewählter Gene in Herz- und Aortagewebeproben L-NAME hypertoner Ratten	47
4.1.1	Genexpressionsanalyse im Herzgewebe mittels qRT-PCR - <i>SYBR™ green</i>	48
4.1.2	Genexpressionsanalyse im Herzgewebe mittels qRT-PCR - <i>TaqMan®</i> -Sonden	53
4.1.3	Hauptkomponentenanalyse für die mittels qRT-PCT - <i>TaqMan®</i> -Sonden ermittelte relative Genexpression im Herzgewebe	58
4.1.4	Genexpressionsanalyse im Aortagewebe mittels qRT-PCR - <i>SYBR™ green</i>	59
4.1.5	Genexpressionsanalyse im Aortagewebe mittels qRT-PCR – <i>TaqMan®</i> -Sonden	64

4.1.6	Hauptkomponentenanalyse für die mittels qRT-PCT - <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> -Sonden ermittelte relative Genexpression im Aortagewebe	69
5	DISKUSSION	70
5.1	Versuchsdurchführung	70
5.2	Ergebnisdiskussion	71
5.2.1	BNP, AT1R und AT2R	71
5.2.2	Inflammation - Interleukine - IL 1, IL 2, IL 6, IL 10, und TGFB 1	72
5.2.3	Proliferation - Kollagenumbau - COL1 A1, COL3 A1, MMP 1, MMP 2, MMP 9, MMP 13 und TIMP 1	75
5.2.4	Inflammation - Cyclooxygenasen COX 1 und COX 2	78
5.2.5	Inflammation - NO Synthasen iNOS und eNOS	80
5.2.6	Apoptose - BAX, BCL 2, CASP 3 und CASP 9	81
5.3	Limitierungen	82
6	ZUSAMMENFASSUNG	84
7	LITERATURVERZEICHNIS	86
8	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	96
9	ANTEILSERKLÄRUNG AN PUBLIKATIONEN	97
10	LEBENS LAUF	99
11	DANKSAGUNG	101
12	ANHÄNGE	102
12.1	Geräteliste	102
12.2	Chemikalienliste	102
12.2.1	Puffer	103
12.2.2	Kits	103
12.3	Datenblätter	104
12.4	Vergleiche qRT-PCR - <i>SYBR</i> <sup>™</sup> <i>green</i> versus <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> -Sonden	106

## ABSTRACT

### EINLEITUNG

Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp 2 (AT2R) Stimulation durch den ersten selektiven nicht-peptidischen Agonisten Compound 21 (C21) beugt partiell den Folgen einer L-NAME (N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine-methylester) induzierten Hypertonie in Ratten vor, ohne den Blutdruck zu beeinflussen.

Untersucht wurde die Wirkung von AT2R-Stimulation auf das *Remodeling* von Herz und Aorta anhand der mRNA-Expression ausgewählter Gene bei L-NAME induzierter Hypertonie. Von Interesse waren Gene, die den Inflammationsstatus widerspiegeln (IL 1, IL 2, IL 6, IL 10, TGFB 1, COX 1, COX 2, iNOS, eNOS), Bildung und Abbau der extrazellulären Matrix regulieren (COL1 A1, COL3 A1, MMP 1, MMP 2, MMP 9, MMP 13, TIMP 1), bei der Apoptose aktiviert sind (BAX, BCL 2, CASP 3, CASP 9, und die mRNA-Expression beider AT-Rezeptor Subtypen, AT1R und AT2R, sowie des *natriuretic peptide B* (BNP).

### METHODIK

Gewebeproben waren von Ratten gewonnen worden, die Vehikel behandelt, oder mit L-NAME hypertonisiert, oder zugleich mit C21, oder dem AT1R-Blocker Olmesartan (OLME), oder beiden behandelt worden waren.

Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion anhand der Fluoreszenz mit *SYBR<sup>TM</sup> green* und *TaqMan<sup>®</sup>*-Sonden. Die statistische Auswertung wurde als Rank-Summenanalyse mit nachfolgenden paarweisen Vergleichen durchgeführt.

### ERGEBNISSE

Auf mRNA-Ebene konnte eine Expression von AT1R und AT2R in Herz- und Aortagewebe gezeigt werden, die durch AT1R-Blockade oder AT2R-Stimulation nicht beeinflussbar war. Die mRNA-Expression von BNP im Herzgewebe war unter L-NAME erhöht, unter Zusatz von C21, OLME und deren Kombination aber auf Kontrolltierniveau reguliert.

Die relativ zu Kontrolltieren numerisch erhöhte IL 6 und TGFB 1 mRNA-Expression unter L-NAME in Aortagewebe war unter Zusatz von C21, OLME und deren Kombination numerisch

geringer; unter der Kombination war die Expression von IL 6 statistisch signifikant geringer als unter L-NAME allein.

Unter der Kombinationstherapie war die Kollagenisierung der Aorta stärker gehemmt und die mRNA-Expression von MMP 2 stärker als unter C21 und OLME allein, ohne dass dies jedoch mit einer Regulierung der mRNA-Expression von COL1 A1, COL3 A1 oder TIMP 1 verbunden war, während im Herzgewebe dagegen die mRNA-Expression von COL1 A1, COL1 A3 und TIMP 1 erhöht war.

Im Herzgewebe war die mRNA-Expression des Apoptosemarkers CASP 3 unter L-NAME am geringsten, unter der Kombinationsbehandlung aber erhöht, und im Aortagewebe behandlungsunabhängig.

## **SCHLUSSFOLGERUNG**

Die Ergebnisse sprechen für eine unterschiedliche Regulation des RAAS-assoziierten Remodeling in Herz- und Aortagewebe.

Unter Berücksichtigung versuchsbedingter Einschränkungen unterstützen die mRNA-Expressionsbefunde die These, dass die Folgen einer L-NAME induzierten Hypertonie auf das Herz-Remodeling blutdruckunabhängig durch die durch AT2R-Stimulation mit Compound 21 induzierten anti-inflammatorischen und pro-apoptischen Wirkungen teilweise abgeschwächt werden.

## **INTRODUCTION**

Stimulation of the angiotensin II-receptor subtype 2 (AT2R) with the first selective non-peptidic agonist Compound 21 (C21) partially prevents effects of L-NAME (N $\omega$ -nitro-L-arginine-methyl-ester) induced hypertension in rats without affecting blood pressure.

Aim of this study was to substantiate the effects of AT2R-stimulation on cardiac and aortic remodeling by investigating the mRNA-expression of selected genes in L-NAME induced hypertension. The focus was on genes reflecting inflammation (IL 1, IL 2, IL 6, IL 10, TGFB 1, COX 1, COX 2, iNOS, eNOS), production and degradation of extracellular matrix (COL1 A1, COL3 A1, MMP 1, MMP 2, MMP 9, MMP 13, TIMP 1) and apoptosis (BAX, BCL 2, CASP 3, CASP 9). The expression of AT-receptor subtypes, AT1R and AT2R, and *natriuretic peptide B* (BNP) was also studied.

## **METHODS**

Tissue samples were gained from rats which have either been vehicle-treated, or with L-NAME only, or concomitantly with the AT2R-agonist C21, the AT1R-blocker Olmesartan (OLME), or both.

Analysis of mRNA-expression was performed by quantitative polymerase chain reaction via fluorescence with both *SYBR™ green* and *TaqMan®*-probes. Rank-sum analysis with *post-hoc* pairwise comparison was used for statistical analysis.

## **RESULTS**

Both AT1R- and AT2R-mRNA were expressed in heart and aorta, although this was not modified by AT1R-blockade or AT2R-stimulation.

Increased BNP-mRNA levels in hearts from hypertensive L-NAME animals were down-regulated to control levels by treatment with C21 and OLME alone or combined.

In aortic tissue, mRNA-expressions of pro-inflammatory genes IL 6 and TGFβ 1 were numerically higher in the L-NAME group as compared to controls and were lower on C21 and OLME treatment, which combined significantly decreased IL 6 mRNA-expression compared to the L-NAME group.

In aorta, treatment with C21 and OLME alone, and more prominent combined, prevented an increase in collagen content. This was associated with increased MMP 2 mRNA-expression, while genes COL1 A1, COL1 A3 and TIMP 1 were not regulated. In cardiac tissue, in contrast, mRNA-expression of these genes was elevated under combined therapy.

mRNA-expression of an apoptotic marker, CASP 3, was lower in L-NAME samples of heart but up-regulated under the combination, while it was not altered in aortic samples.

## **CONCLUSION**

The results suggest different gene regulation of RAAS associated remodeling in heart and aorta. Considering study related limitations, the results on mRNA-expression support the thesis that consequences of L-NAME induced hypertension on the heart remodeling can partially be alleviated by selective AT2R stimulation with C21 through anti-inflammatory and pro-apoptotic effects, without impacting blood pressure.

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 HYPERTONIE

Nach den Richtlinien der European Society of Hypertension/Cardiology ESH/ESC aus 2013 wird ab einem systolischen Blutdruck von über 140 mmHg und/oder ab einem diastolischen Blutdruck von über 90 mmHg von Hypertonie gesprochen [1].

Formen des hohen Blutdrucks sind zum einen die essentielle Hypertonie, deren Entstehung als multifaktoriell mit genetischen Komponenten und Umweltfaktoren gesehen wird, und die sekundäre Hypertonie als Folge definierter Grunderkrankungen unterschiedlicher Genese.

Laut Richtlinie der ESH [1] wird der Blutdruck in Abhängigkeit von seinem Risiko für Herz- und Kreislauferkrankungen wie in Tabelle 1.1 ausgeführt als normal bis pathologisch klassifiziert.

**TABELLE 1.1 EINTEILUNG DES BLUTDRUCKS NACH ESH**

Kategorie	Systolisch mmHg	Diastolisch mmHg
<b>Optimal</b>	<b>&lt; 120</b>	<b>&lt; 80</b>
<b>Normal</b>	<b>120 -129 und/oder</b>	<b>80 - 84</b>
<b>Hochnormal</b>	<b>130 -139 und/oder</b>	<b>85 - 89</b>
<b>Hypertonie</b>		
<b>Grad 1</b>	<b>140 -159 und/oder</b>	<b>90 - 99</b>
<b>Grad 2</b>	<b>160 -179 und/oder</b>	<b>100 - 109</b>
<b>Grad 3</b>	<b>&gt; 180 und/oder</b>	<b>&gt; 110</b>
<b>Isoliert systolisch</b>	<b>&gt; 140</b>	<b>&lt; 90</b>

Klinische Studien belegen, dass die Therapie der so definierten Hypertonie die Entwicklung von Herz-Kreislauferkrankungen hemmt [1].

### 1.2 PRÄVALENZ UND RISIKOFAKTOREN DER HYPERTONIE

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind in Deutschland ebenso wie in anderen Ländern der industrialisierten westlichen Welt die häufigste dokumentierte Todesursache. Deren

wichtigster beeinflussbarer Risikofaktor ist der Bluthochdruck mit einer Prävalenz von ca. 30% [1, 2]. Zu hoher Blutdruck liegt der Hälfte der ischämischen Herzkrankheiten und Schlaganfälle zugrunde [3, 4, 5], wobei das Risiko zu erkranken, exponentiell zunehmend mit seiner Höhe steigt.

Hypertonie wird häufig ohne Leidensdruck erlebt. Sie ist ebenfalls sehr häufig nur eine von weiteren Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Adipositas, Rauchen, mangelnde Bewegung, Alkoholkonsum und erkrankungsförderndes Ernährungsverhalten [2, 6]. Wegen seiner Häufigkeit und damit seiner großen Auswirkung auf den Gesundheitszustand einer Sozialgemeinschaft sind Prävention und Therapie der Hypertonie durch Änderung der Lebensführung und zielgerichteten Arzneimittelgebrauch von hohem, nicht nur individuellem Nutzen [7].

### 1.2.1 PATHOPHYSIOLOGIE DER HYPERTONIE

Der Blutdruck ist von zwei Faktoren abhängig, dem Gefäßwiderstand und dem Herzzeitvolumen. Bei Hypertonie ist daher das Herzzeitvolumen oder der Gefäßwiderstand erhöht oder beide zugleich [8, 9]. Erhöhung des Herzzeitvolumen bewirkt den Volumenhochdruck, Erhöhung des Gefäßwiderstandes den Widerstandshochdruck [8].

Unter die weiteren Anpassungsvorgänge, die den Bluthochdruck unterhalten, fallen Endothelschäden, die den peripheren Widerstand erhöhen [10, 11]. Erst bei pathologisch hohen Drucken dilatieren die arteriellen Gefäße zur Kompensation des erhöhten Blutdrucks und wird die Ausscheidung von Natrium und Wasser als Ausdruck der Verschiebung der Druck-Natriurese gesteigert [8].

Dauerhaft erhöhter Blutdruck führt zu Endorganschäden [12]. Wie in Tabelle 1.2.1 beschrieben, teilt die WHO die Hypertonie nach ihrem klinischen Bild in Stadien anhand von Organschäden ein.

**TABELLE 1.2.1 EINTEILUNG DER HYPERTONIE NACH WHO-RICHTLINIEN**

<b>Stadium</b>	<b>Pathophysiologische Einordnung</b>
I	Keine Schäden
II	Gefäßschädigung, leichte Organschäden
III	Schwere Organschäden, Organversagen

### 1.2.2 ORGANSCHÄDEN

Endorganschäden der Hypertonie werden als Umstrukturierung der Gefäße und des Myokards gesehen, wobei sich die Gefäßschädigung als *Remodeling* und endotheliale Dysfunktion zeigt [12]. Das *Remodeling* führt am Herzen zu Linksherzhypertrophie und Rhythmusstörungen, die wiederum das Entstehen von Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz erhöhen. Zudem begünstigt Hypertonie die Entwicklung der Atherosklerose (Arteriosklerose), was die Entwicklung der koronaren Herzkrankheit fördert [12]. Der Bluthochdruck führt auch zu strukturellen Veränderungen der Niere, die letztlich zur Niereninsuffizienz führen. Für die Entwicklung zerebrovaskulärer Schäden, wie dem ischämischen Infarkt, ist die Hypertonie der größte Risikofaktor [1].

Trotz der einfachen Diagnosestellung der Hypertonie und der gesicherten Erkenntnis, dass durch therapeutische Senkung des Bluthochdrucks die Morbidität und Mortalität von Herz- und Kreislauferkrankungen verringert werden kann, ist die Behandlung der Hypertonie unzureichend [7]. Es bedarf daher weiterer wissenschaftlicher und gesellschaftlicher Anstrengungen, adäquate, klinisch gesicherte Behandlungen der Hypertonie zu entwickeln, als auch deren Prävention zu fördern.

### 1.3 ARTERIELLES REMODELING

Die Gefäßwand der Arterien wird unterteilt in *Tunica intima* als innerster Schicht, *Tunica media* als mittlerer Schicht und *Tunica adventitia*, als äußerer Schicht. Während Endothelzellen und Bindegewebe die *Tunica intima* bilden, überwiegen glatten Muskelzellen, elastische Fasern und Kollagen in der *Tunica media*. Elastische Fasern und Kollagen und darin eingebettet *Vasa vasorum*, bilden die *Tunica adventitia* [13, 14].

Arteriell *Remodeling* bei Hypertonie bezeichnet die strukturelle Anpassung der Blutgefäße an erhöhten Blut- und Pulsdruck. Zu Beginn des Prozesses adaptieren sich die Gefäße an die geänderten Umstände, jedoch führt dies dauerhaft zur Maladaptation und trägt zu kardiovaskulären Folgeerkrankungen und Endorganschaden bei [15, 16, 17].

Arterielle Blutgefäße reagieren auf dauerhaft gesteigerten systolischen Blutdruck und erhöhte Pulswellen mit Umbauprozessen der Gefäßwand als kompensatorische Maßnahme [15, 18]. Diese Umbauprozesse äußern sich als Abnahme der Elastizität und somit Zunahme der Gefäßsteifigkeit [10].

Zwei Parameter beschreiben das *Remodeling*, das Verhältnis von Wanddicke (WT) zum Gefäßlumen (ID, innerer Durchmesser), welches die Fähigkeit eines Gefäßes beschreibt, sich gegen intravaskulären Druck zu kontrahieren, und der Wandquerschnitt (WQ), der Informationen über Wachstumsprozesse beinhaltet [16, 19].

Letztlich verändert arterielles *Remodeling* die Gefäßgeometrie, die Wanddicke nimmt zu und das Gefäßlumen verengt sich, was zu einer Steigerung des Quotienten von Wanddicke zu innerem Durchmesser [WT/ID] führt, während sich der Wandquerschnitt nicht oder nur gering verändert [16, 20, 21]. Ergänzend steigt das Elastizitätsmodul, das die elastische Eigenschaft der Gefäßwand beschreibt [19, 20] und erhöht sich die Pulswellengeschwindigkeit (PWV, 1.4), die ein eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor ist [1, 21].

Beim Umbau der Gefäße sind verschiedene biochemische Prozesse beteiligt, wie Inflammation, Proliferation und Fibrose, und Apoptose [16, 22, 23].

Im Tierversuch kann das *Remodeling* durch eine L-NAME (N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine-methylester) induzierte Hypertonie an normotonen Ratten nachgestellt werden [21]. Die Gabe von L-NAME erzeugt eine Hypertonie durch Hemmung der NO-Synthase, wodurch die permanente NO-vermittelte Vasodilatation entfällt und vasokonstriktive Reize überwiegen [24, 25, 26]. Ausdruck der dadurch bedingten Erhöhung des peripheren Widerstandes unter L-NAME ist eine Herzbelastung, die unter anderem zu einer kompensatorischen vermehrten Ausschüttung des vasodilatatorischen und natriuretischen Hormons BNP (*natriuretic peptide B*) aus dem Herzgewebe führt [27, 28, 29].

Hypertonie und *Remodeling* lassen sich durch gezielte pharmakologische Interventionen beeinflussen. In dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuch waren 65 männliche erwachsene Wistar-Ratten randomisiert 5 Behandlungs-Gruppen zugeteilt worden [3.2]. Über einen Zeitraum von 6 Wochen erhielt die Kontrollgruppe eine Vehikelbehandlung ohne Medikation (Gruppe K), alle anderen Gruppen 50 mg.kg<sup>-1</sup>.Tag<sup>-1</sup> L-NAME und keine weitere Medikation (Gruppe L), oder zusätzlich 0.3 mg.kg<sup>-1</sup>.Tag<sup>-1</sup> Compound 21 (Gruppe LC) [1.7], oder 10 mg.kg<sup>-1</sup>.Tag<sup>-1</sup> Olmesartan-Medoxomil (Gruppe LO), oder 0.3 mg.kg<sup>-1</sup>.Tag<sup>-1</sup> Compound 21 und 10 mg.kg<sup>-1</sup>.Tag<sup>-1</sup> Olmesartan-Medoxomil (Gruppe LOC).

Nach 6 Wochen wurde in der Kontrollgruppe (Gruppe K) mit Hilfe der Schwanzplethysmographie ein mittlerer arterieller Blutdruck [Mittelwert mit (SE)] von 91 (4) mmHg, in der Gruppe L von 122 (9) mmHg, in der Gruppe LC von 126 (10) mmHg, in der Gruppe LO von 92 (9) mmHg und in der Gruppe LOC von 91 (8) mmHg gemessen. Die Blutdrücke der Gruppen

LO und LOC waren statistisch signifikant geringer als die der Gruppen L und LC und unterschieden sich nicht von dem der Kontrollgruppe K [21].

Die Behandlung mit L-NAME allein führte nicht nur zur Steigerung des Blutdrucks, sondern auch zu erhöhter PWV und Wanddicke, Versteifung der Aorta und vermehrter Akkumulation von Kollagen [21]. Während unter Olmesartan (OLME) das *Remodeling* mit einer Verhinderung des Blutdruckanstieges einherging, bewirkte dies Compound 21 (C21) ohne Blutdruckwirkung. Die Kombination beider Medikationen bewirkte eine stärkere Reduzierung des *Remodeling* (Kollagenablagerung) ohne eine zusätzliche Abschwächung des Blutdruckanstieges [21].

#### 1.4 PULSWELLENGESCHWINDIGKEIT

Hypertension führt durch chronische Überbelastung der Arterien zu deren Umstrukturierung und Versteifung. Eine Folge der Schädigung ist die Erhöhung der Geschwindigkeit mit der sich die vom Herzen ausgelöste Pulswelle ausbreitet. Die Pulswellengeschwindigkeit (PWV) ist somit ein Marker für die Elastizität der Arterien [30]. Sie korreliert mit dem Kaliber der Gefäße. Die höchste Elastizität haben die großen, zentral gelegenen Arterien und hier ist die PWV am geringsten. Entsprechend geringer ist dagegen die Elastizität in peripheren Arterien, in denen sich die höchste PWV einstellt. Dieses Phänomen wird Pulsdruckamplifikation genannt [23, 31].

Die Elastizität der herznahen Gefäße ist von großer Bedeutung für deren Windkesselfunktion, die für einen Ausgleich zwischen dem systolischen und diastolischen arteriellen Blutdruck sorgt. In der Systole werden die Gefäße gedehnt und nehmen die Spannung auf, die sie in der Diastole wieder abgeben. Infolge ihrer Elastizität dämpfen daher die großen Gefäße den Druck auf die Gefäßwände der distalen kleineren, weniger elastischen Gefäße. Insbesondere die Arteriolen werden so vor zu großem Pulsdruck geschützt [32].

Durch die Umbauprozesse der Arterien, wie Hypertrophie der Tunica Media und Fibrosierung, steigt nicht nur der periphere Widerstand, sondern es nimmt auch die Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Druckverhältnisse ab und es steigt die PWV auch in den großen Gefäßen. Entlang des Gefäßsystems gibt es Punkte, an denen die Welle reflektiert und zu den zentralen Gefäßen zurückgeworfen wird [23, 33, 34]. Ein physiologisch intaktes Gefäßsystem lässt die Reflexionswelle in der Aorta in der Diastole auflaufen. Die Abnahme der Elastizität bei Hypertonie bedingt, dass die PWV sich erhöht und die reflektierte Pulswelle die zentralen Gefäße daher vorzeitig, in der späten Systole erreicht. Da zu diesem Zeitpunkt die Aortenklappe noch nicht geschlossen ist, muss der linke Ventrikel das Blut gegen einen durch die frühzeitig reflek-

tierte Welle erhöhten Druck auswerfen. Da durch die erhöhte Rigidität nicht nur die Reflexionswelle frühzeitig zurückgeworfen wird, sondern sich der periphere Widerstand erhöht hat, können diese Symptome der Hypertonie zur dauerhaften Überlastung des linken Ventrikels führen [35, 36, 37] Durch die dauerhafte Überlastung des linken Ventrikels wiederum wird der Sauerstoffbedarf des Myokards erhöht. Da der systolische Druck sich durch die Versteifung und durch die verfrühte Reflexionswelle erhöht während der für die Versorgung des Herzens in der Diastole wichtige diastolische Druck abnimmt, kann der Bedarf an Sauerstoff nicht gedeckt werden, was zu einer subendothelialen Ischämie führt [33, 38, 39].

Die durch den Bluthochdruck verursachten Schäden des arteriellen Gefäßsystems wirken sich neben dem Herz vor allem an Gehirn und Nieren aus. Durch die verringerte Elastizität werden der erhöhte Druck und die höhere PWV ohne Abfederung bis in die Mikrovaskularisation der Niere und des Gehirns weitergeleitet [38, 39]. Beide Gefäßsysteme sind nicht auf eine Anpassung solcher gestiegenen Druckverhältnisse ausgelegt, was in letzter Konsequenz einen Schlaganfall oder eine Niereninsuffizienz zur Folge haben kann [23, 33, 40].

Eine erhöhte PWV, als Folge der Abnahme der Elastizität, ist Ausdruck erhöhter Gefäßsteifigkeit und lässt auf den daraus resultierenden Endorganschaden schließen [1, 21]. Die Steifigkeit der Aorta ist ein unabhängiger Marker für das Auftreten von kardiovaskulären Komplikationen [1, 41].

## **1.5 OXIDATIVER STRESS UND ENDOTHELIALE DYSFUNKTION**

Hypertonie und andere vaskuläre Erkrankungen sind mit erhöhtem oxidativen Stress und endothelialer Dysfunktion verbunden. Der erhöhte oxidative Stress fördert die strukturellen Änderungen, die mit Hypertonie einhergehen. Dazu gehören Hypertrophie, Proliferation der glatten Muskelzellen und verstärkte Ablagerung von Kollagen [42, 43].

Ein intaktes Endothel und das Gleichgewicht der durch das Endothel vermittelten Wirkungen sind für die Regulation des Blutflusses und des Kreislaufes von großer Bedeutung [15]. Es besitzt die Fähigkeit Signale zu empfangen und auf diese zu reagieren. Es reguliert als Barriere für den Transport von Molekülen deren Durchtritt [44]. Bei der Entwicklung der Hypertonie sind die auf das Endothel auf molekularer Ebene einwirkenden pro-inflammatorischen Zytokine und Wachstumsfaktoren ebenso wichtig, wie die Wandspannung und die Scherkräfte auf hämodynamischer Seite. Es gibt vasodilatatorische Agentien, wie Stickstoffmonoxid (NO) und vaso-

konstriktorische Agentien, wie Angiotensin II (ANG II), Zytokine und Prostaglandine, deren Bildung durch Cyclooxygenase (COX) katalysiert wird [45, 46, 47].

Man unterscheidet zwei Isoformen der Cyclooxygenase, COX 1 und COX 2. COX 1 wird konstitutiv in allen Geweben exprimiert, weshalb angenommen wird, dass die durch COX 1 vermittelte Prostaglandin-Synthese für die Homöostase von Funktionen wie Regulation der Thrombozytenfunktion, renaler Blutfluss und Gefäßtonus wichtig ist [45, 47]. COX 2 stellt hingegen die induzierbare Form dar, deren Expression vor allem durch pro-inflammatorische und proliferative Stimuli aktiviert wird [47, 48]. Erhöhte Scherkräfte, die bei der Hypertonie eine wichtige Rolle spielen, führen auch zur Induktion der COX 2 [11, 45]. Ein weiterer interessanter Unterschied ist, dass COX 1 in gesunden Gefäßen und COX 2 in entzündlich proliferierenden Gefäßen exprimiert wird [48].

Um die Funktion des Endothels zu gewährleisten, muss zwischen den vasokonstriktorisches und vasodilatierenden Faktoren ein Gleichgewicht herrschen [44]. Kommt es zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts, führt dies zu einer endothelialen Dysfunktion. Diese Störung äußert sich in einer gesteigerten Permeabilität, wie sie bei inflammatorischen Prozessen typisch ist [42, 46, 49]. Zudem tritt ein Ungleichgewicht zwischen Hämostase und Fibrinolyse auf, wodurch es zu Thrombenbildung kommen kann. Ein weiterer für die Entwicklung der Hypertonie wichtiger Aspekt ist die gestörte endothelabhängige Vasodilatation [50], die mit erhöhter vaskulärer Kontraktionsbereitschaft verbunden ist [10, 11, 48]. Man nimmt an, dass deren Ursache in der verminderten Verfügbarkeit von NO liegt [11, 44], das im Endothel über das Enzym endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) produziert wird [51].

Es gibt drei Isoformen der NO-Synthase, nNOS, eNOS und iNOS [43]. eNOS ist die endothelständige NOS und die für den Gefäßtonus relevante Form [51]. iNOS stellt die induzierbare Form dar und kann durch pro-inflammatorische Zytokine exzessiv aktiviert werden, so dass sich toxische NO Konzentrationen bilden können [43]. Der neuronalen Form nNOS kommen unterschiedliche Aufgaben zu, deren Schilderung den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

Der Abfall der Verfügbarkeit von NO könnte durch eine zu geringe Expression oder inadäquate Aktivierung von eNOS bedingt sein [52]. Der Prozess der Entkopplung tritt auf, wenn anstelle von NO Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) entsteht [46, 52]. Ist das Enzym nur teilweise entkoppelt, kommt es zur gleichzeitigen Bildung von NO und  $O_2^{\cdot-}$ . Beide Produkte können wiederum miteinander reagieren und so zur Bildung weiterer ROS führen [46, 52].

Unter physiologischen Bedingungen entstehen ROS als Nebenprodukt bei Stoffwechselprozessen in aeroben Zellen, aber auch bei entzündlichen Prozessen [42, 43, 52]. Der Körper besitzt antioxidative Mechanismen, um die Bildung von ROS zu neutralisieren. Sind diese Mechanismen gestört oder überlastet, entsteht pathogener oxidativer Stress [43]. Die mitochondriale Atmungskette und die Enzyme NOS und COX stellen potentielle Quellen für ROS dar [45, 46, 49]. Übersteigt die Konzentration der ROS einen bestimmten Wert, führt dies nicht nur zur Schädigung der umliegenden Struktur, sondern auch zur Aktivierung endothelialer Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine [11, 42, 53]. Ein weiterer Faktor ist, dass ROS und NO miteinander reagieren. So wird einerseits mehr NO gebunden und dadurch die Verfügbarkeit verringert und zum anderen entsteht durch diese Verbindung ein weiteres ROS, was wiederum zur Steigerung des oxidativen Stresses beiträgt [43, 54, 55]. Der gesteigerte oxidative Stress und der dadurch erschöpfte Kompensationsmechanismus tragen so zur Entwicklung der Hypertonie bei [43].

---

### 1.5.1 INFLAMMATION

Inflammatorische Zytokine können oxidativen Stress triggern, der wiederum die inflammatorische Reaktion verstärken kann [56]. Ob nun die Inflammation zur Entwicklung der Hypertonie führt oder ob eine Inflammationsreaktion erst durch Hypertonie entsteht, ist dabei nicht eindeutig zu beurteilen.

Inflammatorische Prozesse sollen sowohl durch das angeborene als auch das erworbene Immunsystem ausgelöst werden [56, 57, 58]. Der Gedanke, dass dem Immunsystem bei Hypertonie eine Bedeutung zukommt, kam durch die Beobachtung, dass bei hypertensiven Patienten erhöhte Plasmakonzentrationen inflammatorischer Marker gemessen wurden [42, 59, 60].

Das angeborene Immunsystem vermittelt die unmittelbare inflammatorische Reaktion auf Gewebeschäden [57, 61]. Zu diesem gehören unter anderem Makrophagen und natürliche Killerzellen [56, 58]. Sie setzen pro-inflammatorische Zytokine frei. In Biopsien von großen und mittleren Arterien konnte man eine Akkumulation dieser Zellen in der Gefäßwand bei Hypertonie feststellen, was auch auf Biopsien der Niere zutrifft [53, 56, 58, 62, 63]. In Aorta und Nieren fand sich Akkumulation von T-Lymphozyten [62, 64]. Ein weiterer Hinweis, war der Nachweis von agonistischen Rezeptor-Antikörpern [65, 66] bei essentieller Hypertonie und somit ein Nachweis der Beteiligung von B-Lymphozyten, die möglicherweise Rezeptoren, wie den AT1R stimulieren und damit zur Vasokonstriktion und Inflammation beitragen [58]. In

anderen Studien konnte bei Gabe von Immunsuppressiva eine Reduzierung des Blutdrucks und/oder eine verringerte Lymphozytenablagerung nachgewiesen werden [62, 63, 67]

ANG II kommt nicht nur eine wichtige Rolle in der Regulierung der Hypertonie zu, sondern auch bei der Inflammation, da es nicht nur den Gefäßtonus reguliert, sondern auch die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine fördert. ANG II unterstützt auch die Produktion von ROS, kann den oxidativen Stress erhöhen und somit wiederum die Inflammationsreaktion fördern [16, 46, 49].

Zusammengefasst bewirken inflammatorische Prozesse ein pathologisches Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, so dass sich strukturelle Veränderungen der Gefäßwand und auch anderer Organe ausbilden können.

---

### **1.5.2 PROLIFERATION UND FIBROSE**

Als Proliferation von Zellen wird deren quantitatives Wachstum bezeichnet, das unter dem Einfluss stimulierender und hemmender Faktoren steht. Wird das Gleichgewicht bei Gefäßmuskelzellen zugunsten wachstumsfördernder Faktoren durch zum Beispiel Hochdruck gestört, kommt es zu einer Vermehrung und Einwanderung von glatten Muskelzellen in das Endothel und in dessen Folge zur Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten und Fibrose [14].

Fibrose ist somit ein entscheidender Prozess in der Pathologie des *Remodeling*. Blutgefäße fibrosieren durch übermäßige Akkumulation von Kollagen und Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix bei gleichzeitiger relativer Abnahme von Elastin [10, 14, 16]. In gesunden Gefäßen besteht eine Balance zwischen dem Anteil an Elastin und Kollagen. Durch Inflammation, Hypertonie oder Alter kommt es zu einer Abnahme des Elastin und damit einem größeren Anteil an Kollagen, was zur Versteifung der Gefäße führt [10, 13]. Die elastische Eigenschaft der Gefäße ist auf Elastin zurückzuführen, das bei niedrigen Blutdrücken für die Dämpfung der Pulsation sorgt. Das steifere Kollagen verhindert die Deformation der Gefäßwand und übernimmt bei der Anpassung des Gefäßes an höhere Drücke die Funktion als Widerstand. Nimmt Elastin ab, wirkt Kollagen als Druckaufnehmer schon bei niedrigeren Drücken, wobei die Gefäße deutlich weniger dehnbar sind [10, 13, 68]. Da Kollagen den Hauptbestandteil der Matrix ausmacht, wird als Auslöser der Fibrosierung ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau des Kollagens gesehen.

Der Erhöhung der Gefäßsteifigkeit liegt nicht nur eine Zellvermehrung, sondern auch eine anteilige Verschiebung des Kollagentyps zugrunde [14, 37]. Vor allem die Akkumulation von

Kollagen 1 ist bei fibrotischen Erkrankungen ausgeprägt [15, 37, 69]. Eine Hypothese besagt, dass die Transkription von Kollagen in gereiften Zellen unterdrückt ist und im Gewebe unter Stress oder bei Schäden reaktiviert wird [70]. Kollagen 3 ist neben Kollagen 1 das zweithäufigste Kollagen in der extrazellulären Matrix. Bei Wundheilungsprozessen soll zunächst vermehrt weicher Kollagen 3 produziert werden, welches dann später durch das stabilere und festere Kollagen 1 ausgetauscht wird. Narbengewebe wird dadurch weniger dehnbar und rigider, was zur Versteifung des Gewebes beiträgt [69, 71]. Im physiologischen Zustand sind Synthese- und Abbaurate des Kollagens gering. Die Gefäßsteifigkeit nimmt erst mit zunehmendem Alter durch Vernetzung von Kollagen zu [14].

Eine wichtige Funktion in diesem Prozess kommt den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) zu, da sie am Abbau und der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix beteiligt sind [15, 70], sowie ihren natürlichen Inhibitoren, den *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) [37, 72].

MMP sind eine Gruppe von Enzymen, die in der extrazellulären Matrix lokalisiert sind und auch an ihrem Umbau beteiligt sind [73]. MMP werden unterteilt in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und sonstige. Kollagenasen spalten Kollagen, wodurch charakteristische Fragmente entstehen. Diese, auch Gelatine genannt, werden dann weiter durch Gelatinasen abgebaut. Zu diesen Gelatinasen gehören MMP 2 und MMP 9 [10]. MMP können von verschiedenen Zellen produziert werden, unter anderem Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Bei Schäden im Gewebe, die durch Hypertonie auftreten, wandern Fibroblasten als auch vaskuläre glatte Muskelzellen in den geschädigten Bereich ein, woraufhin MMP, wie MMP 2 und MMP 9, freigesetzt werden [74]. Sie dienen dem Abbau des geschädigten Gewebes [75].

TIMP sind die endogenen Inhibitoren der MMP und werden unterteilt in TIMP 1, 2, 3 und 4. TIMP werden vom Bindegewebe produziert, um lokal die Aktivität von MMP zu kontrollieren [72].

Es wurde beobachtet, dass sowohl veränderte mechanische Kräfte, die auf die Gefäßwand einwirken, als auch inflammatorische Prozesse die Expression von MMP steigern und es deshalb zu einer Imbalance zwischen TIMP und MMP kommt [72, 76]. Dieses Ungleichgewicht wird als wichtiger Faktor der Pathogenese der Hypertonie gesehen [73].

---

### 1.5.3 APOPTOSE

Neben den verschiedenen Umbauprozessen ereignet sich weiterhin der physiologische Vorgang des programmierten Zelltodes, der Apoptose. Die ANG II-vermittelte Apoptose könnte zur

Kompensation der durch pathologische Prozesse angeregten Proliferation dienen, wobei die Aufgabe der Apoptose im *Remodeling* noch nicht klar definiert ist [16].

Als Apoptose oder programmierter Zelltod wird der physiologische Abbau nicht mehr benötigter oder unerwünschter Zellen bezeichnet. Dieser Prozess ist ein wichtiges Geschehen für die Entwicklung und Homöostase des Gewebes [77]. Verschiedene Stimuli, wie oxidativer Stress, Hypoxie, mechanische Überlastung und Stickstoffmonoxid Exposition, die mit der Entstehung der Hypertonie und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen verbunden sind, können die Apoptose aktivieren [78].

Die Apoptose verläuft in zwei Phasen, der Initiatorphase und der Ausführungsphase. Die Initiatorphase kann in einen intrinsischen, mitochondrial vermittelten, und einen extrinsischen, über den Todesrezeptor vermittelten, Vorgang eingeteilt werden [77, 79]. Beide Wege münden in der Ausführungsphase. Während der Apoptose wird die chromosomale DNA fragmentiert [80], danach verdichtet sich das Chromatin und zerbricht in kleine Stücke. Die Zelle schrumpft und zerbricht schließlich in membrangehüllte Körper [79], die Apoptosekörper. Sie werden von Makrophagen phagozytiert und somit aus dem Gewebe entfernt [77]. Wichtig für sowohl die Einleitung als auch die Ausführung der Apoptose sind Caspasen (CASP), Cystein-Aspartylspezifische-Proteasen [80]. Sie besitzen in ihrem Zentrum Cystein und spalten ihre Zielproteine an einer Peptidbindung nach Aspartat. Weitere Komponenten der Apoptose sind die Mitglieder der *B cell lymphoma 2* (BCL 2) Familie. Zu ihnen zählen sowohl pro-apoptotische Proteine, wie BAX (*BCL 2 associated X protein*), als auch anti-apoptotische, wie BCL 2 [77, 80].

Wie zuvor erwähnt kann die Initiationsphase über den mitochondrialen Weg ablaufen, wobei es zu einer Störung des mitochondrialen Transmembranpotentials kommt. Dies erhöht die Permeabilität der Mitochondrien, wodurch apoptotische Faktoren, vor allem Cytochrom C, ins Zytosol gelangen [77, 78]. Als pro-apoptotischer Faktor liegt BAX frei im Zytosol vor und unterstützt als Reaktion auf apoptotische Stimuli die Freisetzung von Cytochrome C [80].

BCL 2 ist teilweise an die Mitochondrienmembran gebunden und stabilisiert wahrscheinlich das Membranpotential wodurch es die Apoptose verhindern kann [77, 78].

Cytochrom C unterstützt die Aktivierung von CASP 9, einer Initiator-Caspase, die dann Effektor-Caspasen wie CASP 3 aktiviert, die schließlich den Zelltod herbeiführt [77, 78].

Ein weiterer Weg zur Einleitung der Apoptose geht über die Bindung von Liganden an den Todesrezeptor. Ausgelöst durch die Bindung eines Liganden wird sowohl die Rekrutierung als

auch die Aktivierung von Initiator-Caspase 8 bewirkt. Die aktivierte CASP 8 kann nun den Komplex verlassen und wiederum Effektor-Caspasen wie CASP 3 aktivieren [77, 79, 80]. Durch die Interaktion mit einem BCL 2 Familienmitglied kann die CASP 8 in manchen Zellen zur Aktivierung des mitochondrialen Weges führen. Schließlich führen beide Initiationswege über die Aktivierung der Effektor-Caspasen zum Tod der Zelle [77, 80].

## 1.6 RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM

Als Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird das Zusammenspiel von Angiotensin II (ANG II) und Aldosteron auf den arteriellen Blutdruck, die Gewebedurchblutung und den Wasser- und Salzhaushalt bezeichnet. Zugleich beschreibt es eine Kaskade biochemischer Reaktionen, die zur Bildung von ANG II führt [81, 82]. Zu Beginn der Kaskade steht die Synthese von Renin. Renin entstammt dem juxta-glomerulären Apparat der Niere, wo es als Pro-Renin gebildet, gespeichert und auf Reiz enzymatisch gespalten, als Renin sezerniert wird [9, 83]. Die juxta-glomerulären Zellen liegen entlang der Gefäßwand des *Vas afferens* des Glomerulums.

Die Sekretion von Renin wird über verschiedene Mechanismen aktiviert. Bei verminderter Perfusion des Nephrons, wird dies in das *Vas afferens* des Glomerulums durch Barorezeptoren registriert, was wiederum zur Ausschüttung von Renin führt. Ein weiterer Reizweg führt über die *Macula densa* des juxta-glomerulären Apparates, der die Natrium- und Chlorid-Konzentration im distalen Tubulus erfasst. Zugleich stehen die Epithelzellen des distalen Tubulus mit dem *Vas afferens* in Kontakt. Nimmt die Natrium- Konzentration ab, führt dies zur Vasodilatation der afferenten Arteriole und zur Renin-Sekretion aus den juxtaglomerulären Zellen, beides mit dem Ziel, den Nieren-Perfusionsdruck zu erhöhen. Auch direkte Stimulation durch Katecholamine auf  $\beta$  1-adrenerge Rezeptoren der juxtaglomerulären Zellen führt zur Sekretion von Renin. Nur eine kleine Menge verbleibt in der Niere [9].

Das Enzym Renin, führt zur Konversion des in der Leber hergestellten Angiotensinogen, zu Angiotensin I (ANG I). Renin verbleibt bis zu einer Stunde im Kreislauf und bewirkt kontinuierlich die Bildung von ANG I. Der nächste Aktivierungsschritt der RAAS-Kaskade erfolgt durch das endothelständige Enzym *Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)* in dem es die Konversion von ANG I zu ANG II katalysiert [81, 84].

ANG II ist das primäre, aktive Produkt der Kaskade. Es ist ein Peptidhormon und besitzt starke vasokonstriktorische Eigenschaften. Es bindet vorwiegend an zwei Rezeptoren, den AT1R und den AT2R [auf die Rezeptoren wird in einem nächsten Abschnitt genauer eingegangen] [82]. Die

physiologischen Mechanismen des RAAS zur Erhaltung des Blutdruckes werden überwiegend über ANG II vermittelt [81, 85].

ANG II erhöht im Wesentlichen über zwei Mechanismen den Blutdruck [81], es bewirkt eine direkte Vasokonstriktion der Arteriolen, steigert dadurch den peripheren Widerstand und erhöht so den arteriellen Blutdruck. Die ebenfalls erfolgende, wenn auch wesentlich schwächer ausgeprägte, Konstriktion der Venen führt zu einem erhöhten venösen Rückfluss. Dadurch steht dem Herz mehr Blutvolumen zur Verfügung, um Blut gegen den erhöhten peripheren Widerstand auszuwerfen [8, 44].

ANG II bewirkt auch die Konstriktion der renalen Arteriolen, wobei es vorwiegend den efferenten arteriellen Widerstand und damit den Filtrationsdruck und die Filtrationsrate im Glomerulum (GFR) erhöht. Dieser Mechanismus ermöglicht eine konstante Filtration des Blutes auch bei verminderter Nierendurchblutung. Der erhöhte Druck im Glomerulum führt gleichzeitig zu einem geringeren hydrostatischen aber steigenden onkotischen Druck in den peritubulären Gefäßen. Die Änderung der Druckverhältnisse begünstigen die Reabsorption von Natrium und Wasser. Gleichzeitig stimuliert ANG II die Natrium-Reabsorption im proximalen Tubulus. Beide Effekte führen zum Anstieg des extrazellulären Volumens und damit auch zu einer Steigerung des Blutdrucks [884].

ANG II bewirkt darüber hinaus die Sekretion von Aldosteron aus der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde. Aldosteron wirkt am distalen Tubulus und im Sammelrohr die Aktivierung von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Kanälen und von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen. Dadurch wird die Reabsorption von  $\text{Na}^+$  und somit auch Wasser gefördert. Gleichzeitig werden  $\text{K}^+$  und  $\text{H}^+$  (Protonen) ausgeschieden. Durch diesen Mechanismus kommt es zum Anstieg des extrazellulären Volumens und somit auch zum Anstieg des Blutdrucks [8, 84].

Nach Erreichen der angestrebten Homöostase hemmt ANG II über einen negativen Rückkopplungsmechanismus (negatives *short-loop feedback*) die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen und damit auch die Bildung von ANG II, um einen exzessiven Anstieg der GFR und somit auch des Blutdruckes vorzubeugen [82, 86]. Neben diesen schnell ansprechenden Reaktionen wird die Reninsekretion auch durch erhöhten Blutdruck oder Hypervolämie selbst im Sinne eines weiteren, über einen längeren Zeitraum wirkenden negativen Rückkopplungsmechanismus gehemmt (negatives *long-loop feedback*) [81].

---

### 1.6.1 ANGIOTENSIN II TYP 1 REZEPTOR

Das Gen, das den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT1R) kodiert, liegt auf Chromosom 3. Der AT1R gehört zur Gruppe G-Protein gekoppelter Rezeptoren [87, 88]. Die meisten bekannten physiologischen Wirkungen des ANG II werden durch den AT1R vermittelt. Dazu gehören wie beschrieben die Regulation der Nierenfunktion und des Blutdrucks, sowie der Wasser- und Natrium-Homöostase [82, 85].

AT1R-Stimulation durch ANG II führt zu Prozessen, die die Zellproliferation und das *Remodeling* fördern. Dazu gehören die Synthese und Akkumulation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, sowie Proliferation von Fibroblasten und vaskulären glatten Muskelzellen [81, 82]. Beide Prozesse führen unter pathologischen Bedingungen zur Fibrosierung und Hypertrophie des Gewebes [81, 82]. Darüber hinaus vermittelt der AT1R inflammatorische Prozesse und erhöht die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [81, 87]. Unter gesunden Bedingungen werden die Wirkungen wie Vasokonstriktion, Proliferation und Fibrose, und Inflammation durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert [84]; fällt dieser jedoch durch pathologische Mechanismen aus, können die ANG II vermittelten Wirkungen zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen führen [81].

---

### 1.6.2 ANGIOTENSIN II TYP 2 REZEPTOR

Das Gen, das den Angiotensin II Typ 2 Rezeptor (AT2R) kodiert liegt auf dem X-Chromosom und gehört zur Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren [89]. Obwohl die Homologie der Sequenzen zwischen AT1R und AT2R nur 32% beträgt, bindet ANG II mit gleicher Affinität an beide Rezeptoren [87, 90]. Der AT2R wird vorwiegend in fötalem Gewebe exprimiert und wird daher kaum im adulten Gewebe gefunden. Jedoch scheint es, dass unter pathologischen Bedingungen, wie Herzinfarkt, vaskulären Schäden, Herz- und Nierenversagen und Wundheilung, die Expression des AT2R wieder auflebt [86, 87, 91]. Aufgrund der hohen Expression im fötalen Gewebe und der Re-expression während traumatischer Situationen wird gefolgert, dass der AT2R an Prozessen wie Zelldifferenzierung und Zellentwicklung beteiligt ist [85, 91].

Eine Stimulation des AT2R scheint die durch AT1R-vermittelten Wirkungen auszugleichen, wie in verschiedenen Studien angedeutet wurde [86, 87, 91].

Die Stimulation des AT2R führt zur Aktivierung von Bradykinin und erhöhter Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). NO führt nicht nur zur Vasodilatation, sondern besitzt vasoprotektive Eigenschaften [86, 90]. Eine weitere Wirkung des AT2R scheint die Inhibierung der Zell-

proliferation zu sein. In Studien wurde beobachtet, dass sowohl die Proliferation von endothelialen glatten Muskelzellen als auch von Fibroblasten verhindert wurde. Zudem wirkt die Stimulation des Rezeptors hemmend auf die Synthese der extrazellulären Matrix und wirkt daher der Hypertrophie und Fibrosierung, sowie der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix entgegen [84, 86, 92]. Auch anti-inflammatorische Wirkungen sollen über den AT2R vermittelt werden, da dessen Stimulation die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine hemmt [93]. Oxidativer Stress, ausgelöst durch endotheliale Dysfunktion oder Ischämie, wie beim Myokardinfarkt, wird reduziert, indem die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) abnimmt [94, 95].

Die Apoptose ist ein weiterer Prozess, der vermutlich ebenfalls über den AT2R vermittelt wird. Jedoch ist anzunehmen, dass beide AT-Rezeptor-Subtypen an der Vermittlung beteiligt sind, da Apoptose eine extreme Form der Inhibierung der Zellproliferation ist und reaktiv auf die wachstumsstimulierende Wirkung des AT1R geschieht. Der Apoptose kommt eine Rolle bei der Zellentwicklung und Differenzierung zu [85, 86, 87].

Zusammenfassend werden der Stimulation des AT2R antiproliferative, vasodilatative und proapoptische Wirkungen und somit positive Effekte auf das kardiovaskuläre System und den Blutdruck zugeschrieben [84, 87, 93, 96].

## 1.7 COMPOUND 21

Nachdem entdeckt worden war, dass ANG II über zwei Rezeptoren, AT1R und AT2R, mit unterschiedlichen Funktionen wirkt, ergab sich das Problem diesen Unterschied pharmakologisch zu charakterisieren. Neben der unterschiedlichen Ausprägung der Rezeptoren im Laufe der Entwicklung von Geweben, fötale versus adulte Phase, gab es zunächst keine geeigneten chemischen Verbindungen, um die Rezeptoren selektiv zu stimulieren oder zu hemmen [87]. Während, wie erwähnt, ANG II beide Rezeptoren mit gleicher Affinität anspricht, stimulieren oder hemmen peptidische und nicht-peptidische Verbindungen sie mit unterschiedlicher Affinität [97, 98, 99].

In Versuchen an Mäusen versuchte man die Wirkungen einerseits durch AT2R Überexpression andererseits in AT2R-defizienten Tieren getrennt zu erfassen [100]. Erste pharmakologische Ansätze mittels Blockade des AT2R durch den AT-Antagonisten PD123319 waren problematisch, da letztlich die Selektivität gegenüber dem AT2R nicht gegeben war [101]. Beide Ansätze zielten auf eine Hemmung der durch AT2R vermittelten Wirkungen ab. Mit dem Agonisten

CGP42112A wurde erstmals die Stimulation des AT2R möglich, jedoch erwies sich CGP42112A in hohen Konzentration als AT1R antagonistisch und hat somit auch einen hemmenden Einfluss [101, 97]. Darüber hinaus ist CGP42112A *in vivo* wegen seiner peptidischen Zusammensetzung nur parenteral einzusetzen [100, 102].

Im Jahr 2004 wurde mit Compound 21 (C21) erstmals ein selektiver nicht-peptidischer AT2R-Agonist beschrieben [99]. Da C21 nicht nutritiv metabolisiert wird, ist er oral verfügbar und eignet sich daher gut, um in *in vivo* Studien verwendet zu werden [93, 100]. In vorausgehenden Studien konnte eine anti-inflammatorische und anti-proliferative Wirkung unter C21 beobachtet werden. Während die ungehemmte Einwirkung von TNF-alpha auf dermale Fibroblasten *in vitro* zu einem signifikanten Anstieg der Expression des Inflammationsmarkers Interleukin-6 (IL 6) führt, fällt er in Gegenwart von C21 deutlich geringer aus [95]. Auch in einem *in vivo* Tiermodell-Versuch, in dem durch Bleomycin eine kutane Inflammation verursacht wurde, konnte durch C21 eine deutliche Verringerung der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen beobachtet werden [95]. In einem weiteren Tiermodell wurde die Wirkung von C21 auf die Herzfunktion nach Myokardinfarkt untersucht. Es konnte neben der Verbesserung der Herzfunktion nach Myokardinfarkt unter C21 eine Reduzierung der Infarktnarbe gesehen werden. Auch in diesem Versuch wurde eine Verringerung der pro-inflammatorischen Zytokinexpression festgestellt [93, 98].

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden hämodynamischen und histologischen Teilen des L-NAME Versuchs sowie einem weiteren Versuch an spontan hypertensiven Ratten (SHR, *spontaneously hypertensive rats*) wurde zudem gezeigt, dass die Stimulation des AT2R durch C21, nicht nur anti-proliferativ und anti-inflammatorisch wirkt, sondern auch das vaskuläre *Remodeling* positiv beeinflusst [21, 103].

In beiden Versuchen wurde eine Hypertonie generiert und festgestellt, dass durch C21, die Ablagerung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix in der Gefäßwand deutlich zurückging. Zudem wurde eine Abnahme der Gefäßsteifigkeit festgestellt. Diese Effekte durch C21 wurden jedoch nicht von einer Reduktion des erhöhten Blutdruckes begleitet. Auch in anderen Studien konnte keine anti-hypertensive Wirkung von C21 festgestellt werden [93, 104, 105].

Mittels C21 als selektivem Agonisten des AT2R lässt sich daher schließen, dass sich AT2R vermittelte Wirkungen günstig auf hypertonie- und myokardinfarktbedingte Schäden am Herz-Kreislaufsystem auswirken und dass diese Wirkungen blutdruckunabhängig sind [104].

Durch seine anti-inflammatorische und anti-proliferative Wirkung, als auch durch seinen positiven Einfluss auf das vaskuläre *Remodeling* könnte C21 ein potenzieller therapeutischer Wirkstoff in der Behandlung durch Hypertonie verursachter Endorganschäden sein [106, 107, 108].



## 2 ZIELSETZUNG

Die chronische Überlastung des arteriellen Gefäßsystems bedingt deren strukturellen Umbau, der sich als Versteifung der Arterien in einer Erhöhung der Pulswellengeschwindigkeit zeigt.

Der endokrin hormonalen Blutdruckregulation liegt das Renin-Angiotensin-System zugrunde. Neuere Ergebnisse haben gezeigt, dass es Subtypen des Angiotensin-Rezeptors mit zum Teil antagonistischen Wirkungen gibt. Während der Subtyp AT1R neben der Vasokonstriktion als Vermittler von Inflammation und Zellproliferation fungiert, sollen der Stimulation des Subtyps AT2R anti-inflammatorische und anti-proliferative Wirkungen zukommen [82, 87].

Die Bestimmung der durch AT2R vermittelten Wirkungen auf den Organismus und im Besonderen auf das kardiovaskuläre System ist schwierig, da der AT2R im adulten Organismus nur sehr gering exprimiert wird. Da ANG II mit der gleichen Affinität sowohl an den AT1R als auch an den AT2R bindet, war es schwierig zu klären, welcher Rezeptor welche Effekte vermittelt [87]. Mit der Einführung des selektiven, nicht-peptidischen AT2R-Agonisten C21 steht nun ein direkter Stimulator des AT2R zur Verfügung, mit dessen Hilfe die funktionale Bedeutung dieses Rezeptors auf hypertonierelevante Gene anhand von Genexpressionsanalysen untersucht werden kann [99].

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung im Institut für Pharmakologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Center for Cardiovascular Research (CCR), war, die im L-NAME Hypertonieversuch mit C21 erhobenen hämodynamischen und histologischen Befunde um Genexpressionsmuster auf mRNA Ebene zu ergänzen [21].

In diesem Versuch waren Wistar-Ratten randomisiert 5 Behandlungs-Gruppen zugeteilt worden. Über einen Zeitraum von 6 Wochen hatte Gruppe K keine Medikation erhalten, Gruppe L L-NAME, Gruppe LC L-NAME+C21, Gruppe LO L-NAME+Olmesartan, und Gruppe LOC L-NAME+C21+Olmesartan. Die Behandlung mit L-NAME führte nicht nur zur Steigerung des Blutdrucks, sondern auch zu erhöhter PWV und Wanddicke, Versteifung der Aorta mit vermehrter Akkumulation von Kollagen [21].

Die Analysen zeigten, dass unter C21, diese pathologischen Veränderungen zum Teil verhindert werden konnten. Zudem zeigte die Kombination von C21 und Olmesartan eine stärkere Reduzierung der erhöhten Kollagenablagerung, als unter jeweiliger Einzelbehandlung [21].

Aufgrund dieser Beobachtungen war es von Interesse zu sehen, ob sich die Wirkungen der direkten AT2R-Stimulation auf die Hämodynamik auch in der Genexpression kardiovaskulär relevanter Gewebe widerspiegeln.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Aorten und Herzen der bereits hämodynamisch charakterisierten Ratten mit molekular-biologischen Methoden auf die Expression von Genen mit Bezug zu Inflammation, Proliferation und Fibrose, und Apoptose auf deren Beeinflussung durch C21 untersucht.



## 3 MATERIALIEN UND METHODEN

### 3.1 MATERIALIEN

Die verwendeten Materialien und Geräte sind im Anhang unter 12.1 und 12.2 gelistet.

### 3.2 METHODEN

Die Experimente wurden im Institut für Pharmakologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Center for Cardiovascular Research (CCR), durchgeführt. Die Genexpression wurde durch quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) unter Verwendung von *SYBR™ green*<sup>1</sup> analysiert (3.2.2.3). Eine weitere Genexpressionsanalyse im Institut für Pharmakologie der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH verwendete *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden<sup>2</sup> (3.2.2.9).

#### 3.2.1 GEWEBEPROBEN

Die Herz- und Aortagewebeproben waren männlichen adulten Wistar-Ratten [Janvier, Le-Genest-St.-Isle, Frankreich] des Versuches TVA G-0335-09 entnommen worden [21].

**TABELLE 3.2.1 EINTEILUNG DER BEHANDLUNGSGRUPPEN**

GRUPPE	BEHANDLUNG	MEDIKATION	PROBEN
<b>1 (K)</b> <b>n 15</b>	KONTROLLE	- 0,3 mg/kg pro Tag oral per Pipette	<b>7</b>
<b>2 (L)</b> <b>n 15</b>	L-NAME	50 mg/kg pro Tag im Trinkwasser -	<b>6</b>
<b>3 (LC)</b> <b>n 15</b>	L-NAME + COMPOUND 21	50 mg/kg pro Tag im Trinkwasser 0,3 mg/kg pro Tag oral per Pipette	<b>9</b>
<b>4 (LO)</b> <b>n 10</b>	L-NAME + OLMESARTAN- MEDOXOMIL	50 mg/kg pro Tag im Trinkwasser 10 mg/kg pro Tag oral per Pipette	<b>10</b>
<b>5 (LOC)</b> <b>n 10</b>	L-NAME + OLMESARTAN- MEDOXOMIL + COMPOUND 21	50 mg/kg pro Tag im Trinkwasser 10 mg/kg pro Tag + 0,3 mg/kg pro Tag oral per Pipette	<b>10</b>

<sup>1</sup> Cyanin-Farbstoff für sequenzspezifische qRT-PCR. N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene) methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine.

<sup>2</sup> Fluoreszenzmarkierte Sonde für sequenzspezifische qRT-PCR mittels thermostabiler DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq)

Über einen Zeitraum von 6 Wochen waren die Tiere auf 5 Gruppen randomisiert in einem L-NAME Hochdruckexperiment wie folgt behandelt worden [Dr. Ludovit Paulis - CCR Berlin] (Tabelle 3.2.1).

Die Medikation wurde einmal täglich morgens zwischen 8:30 und 10:00 verabreicht. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen bei 23°C und 12 Stunden Tag- und Nachtrhythmus in Gruppen bei freiem Zugang zu Trinkwasser und Pelletnahrung (1% NaCl) gehalten.

Nach Abschluss der Blutdruckmessungen wurden die Tiere in Inhalationsnarkose (Isofluran) entblutet und ihnen Gewebeproben des linken Herz-Ventrikels und der thorakalen Aorta entnommen, in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Proben nochmals mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Stößel pulverisiert.

---

## **3.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN**

---

### **3.2.2.1 TRIZOL RNA-ISOLIERUNG**

Zur quantitativen Bestimmung der Gesamt-RNA wurde diese zunächst unter Verwendung von Trizol (siehe Anhang 12.2) aus den Aorta- und Herzgewebeproben isoliert. Die Verwendung und Reinigung der Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellerangaben<sup>3</sup>.

Im Detail, in einem ersten Schritt wurde dem Gewebe 1 ml Trizol hinzugegeben, danach wurde das Gewebe durch einen Homogenisierer aufgeschlossen. Hierzu wurde das homogenisierte Material für fünf Minuten bei Raumtemperatur belassen, wodurch eine vollständige Auftrennung des Nukleoproteinkomplexes erreicht wurde. In einem nächsten Schritt erfolgte die Phasen-Trennung des Homogenisats. Dazu wurden 200 µl Chloroform der Probe hinzugefügt und die Lösung 15 Sekunden lang stark geschüttelt und für weitere 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Im folgenden Schritt wurde die Lösung mit 12 000 g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zentrifugieren vervollständigte die Phasentrennung. Die oberste, farblose wässrige Phase, die ca. die Hälfte des Gesamtvolumens einnimmt, enthielt nur die RNA. Sie wurde abpipettiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Auf diesen Schritt folgte eine Reinigung der isolierten RNA. Der wässrigen Lösung wurden 500 µl Isopropanol zugefügt, sie wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen und erneut mit 12 000 g für 10 Minuten bei 4°C

---

<sup>3</sup> <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizolreagent.pdf>

zentrifugiert. Die RNA fiel als gelartiges Pellet aus. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 75% Ethanol suspendiert, die Suspension maschinell feinst durchmischt (Vortex) und anschließend erneut bei 7 500 g für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Auch der neue Überstand wurde verworfen und das Pellet bis auf eine Restfeuchte luftgetrocknet. Das RNA-Pellet wurde daraufhin in reinstem, RNase freiem Wasser resuspendiert und durch Inkubation in einem Hitzeblock bei 55-60°C innerhalb von 10-15 Minuten vollständig gelöst. Die so aufbereiteten RNA-Lösungen wurden entweder unmittelbar zur Erzeugung von cDNA (komplementäre DNA) mittels reverser Transkription verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

---

### 3.2.2.2 PHOTOMETRISCHE ANALYSE DER RNA

Die Bestimmung der RNA-Konzentration als auch der Reinheit der Probe wurde spektroskopisch vorgenommen, da Nukleinsäuren UV-Licht absorbieren. Die Probe wurde UV-Licht einer Wellenlänge von 260 nm ausgesetzt. Entsprechend der RNA-Konzentration der Probe wurde das UV-Licht absorbiert und die Absorption mittels eines Photodetektors festgestellt. Der Extinktionskoeffizient für einzelsträngige RNA lag bei einer Wellenlänge von 260 nm bei  $0,025 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Proben mit  $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  RNA haben eine optische Dichte (Absorption) von 1.

Zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Lösung wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen und die Absorption beider Wellenlängen verglichen. Die Absorption bei 260 nm sollte mindestens das Doppelte der bei 280 nm betragen. Geringere Unterschiede deuten auf Verunreinigungen mit Protein (nach Hersteller <http://www.nanodrop.com/nucleicacid.aspx>).

---

### 3.2.2.3 REVERSE TRANSKRIPTION - SYBR™ GREEN

Nachdem mittels Trizol-Isolierung die RNA aus dem Gewebe gewonnen worden war, wurde sie auf ihre cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase umgeschrieben. Zur reversen Transkription der RNA wurde das *SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT)* Kit nach Angaben des Herstellers verwendet<sup>4</sup>.

Als Bindungsstelle für die DNA-Polymerase wurden *Random Primer* verwendet, die aus 6 zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen. Durch die entstehende cDNA kann mittels qRT-PCR, 3.2.2.4, das Expressionsverhalten der jeweiligen RNA untersucht werden.

---

<sup>4</sup> [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/superscriptII\\_pps.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/superscriptII_pps.pdf)

In einem nukleasefreien Zentrifugenröhrchen wurden 1  $\mu\text{L}$  500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  *Random Primer*, 1  $\mu\text{L}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP Mischung mit 1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA zusammengefügt und mit reinstem destilliertem Wasser auf 12  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Zur optimalen Mischung der Komponenten wurde die Lösung in einem zweiten Schritt in einem Thermocycler für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, schnell abgekühlt, und dann auf Eis gelegt. In einem nächsten Schritt wurde die Lösung kurz zentrifugiert und anschließend 4  $\mu\text{L}$  5 x *first strand buffer*, 2  $\mu\text{L}$  0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Dithiothreitol und 1  $\mu\text{L}$  40  $\text{units}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  *RNaseOUT™* zugefügt. Der Inhalt wurde durch das Auf- und Abpipettieren vorsichtig vermischt, für 2 Minuten bei 25°C inkubiert. Zur Transkriptionsreaktion wurden 1  $\mu\text{L}$  200  $\text{units}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  *Super-Script II RT* hinzugefügt, wieder zunächst für diesmal 10 Minuten bei 25°C und dann für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten beendet. Die somit durch Transkription entstandene cDNA wurde nun für die qRT-PCR (3.2.2.4) verwendet.

#### 3.2.2.4 ANALYSE DER GENEXPRESSION DURCH QRT-PCR - SYBR™ GREEN

Die qRT-PCR ermöglicht die Berechnung der Ausgangskonzentration der eingesetzten DNA über die Änderung der Fluoreszenz des Farbstoffs *SYBR™ green*. Er bindet an die entstandene doppelsträngige DNA [109, 110, 111, 112, 113].

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung einer DNA-Sequenz. Die Reaktion läuft in drei aufeinanderfolgenden Zyklen ab. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung durch Auftrennen der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge. Im darauffolgenden Schritt erfolgt die Hybridisierung. Hierbei lagern sich *Primer* an die Einzelstrang-DNA an. *Primer* sind Oligonukleotide die sich spezifisch an eine bestimmte Sequenz anheften und welche der DNA-Polymerase als Bindungsstelle dienen. Je nach Ausrichtung der DNA bindet sich ein *forward/sense* oder ein *reverse/antisense Primer*. Im letzten Schritt erfolgt die Elongation, bei der die DNA-Polymerase weitere Nukleotide an den bereits gebundenen *Primer* anheftet. Die Reaktionslösung enthält bereits die Nukleotide, die komplementär zur Einzelstrang-DNA gebunden werden. Die Polymerase setzt am 3'-Ende des *Primer* an und verknüpft die Nukleotide entlang der DNA-Vorlage. Dieser Vorgang ermöglicht ein exponentielles Wachstum der Menge.

Die Vervielfältigung einer DNA unterliegt einer Sättigungsdynamik. Zu Beginn verläuft das Wachstum exponentiell, schwächt sich aber im weiteren Verlauf mit zunehmendem Verbrauch der Reaktionsteilnehmer ab und das Wachstum geht in eine lineare Phase über, bevor es sich als gesättigt in einer Plateauphase zeigt. Da letztlich alle Reaktionen in einer Plateauphase enden, reflektiert die Messung der Fluoreszenz am Ende der Reaktion nicht die Menge an eingesetzter

DNA, weshalb die Änderung der Fluoreszenz während der Reaktion, insbesondere während der exponentiellen Phase, zu betrachten ist. Wird die Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen, erhält man durch Vergleich mit einem Standard eine Aussage über die in jeweiligen Schritt erzeugte Menge an entstandenem Produkt.

*Ct (cycle threshold)* bezeichnet den Zyklus bei dem das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert übertrifft. Je weniger Zyklen erforderlich sind, desto größer war die ursprünglich vorhandene Menge an DNA. Diese *Ct*-Werte werden für jede Probe bestimmt, anhand derer das Expressionsverhalten der gemessenen Gene darstellbar wird [114]. Die Quantifizierung der PCR-Ergebnisse ist unter 3.3 beschrieben.

Nach Ablauf des letzten PCR-Schritts wurde zur Analyse der PCR-Produkte eine Schmelzkurve erstellt, um Nebenprodukte aufzufinden. Ist bei der PCR nur ein Produkt entstanden, weist die Schmelzkurve nur ein charakteristisches Maximum (*peak*) auf, bei Neben-Produkten werden weitere, uncharakteristische Maxima gesehen. Zusätzlich wurde eine NTC-Probe (*non-template-control*) verwendet, die anstelle der Probe Wasser enthielt, um die Produktspezifität zu untersuchen.

**TABELLE 3.2.2.4**

**TEMPERATURZEITPROFIL DER QRT-PCR - SYBR™ GREEN**

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur - °C</i>	<i>Zeit - min</i>	<i>Wiederholungen</i>
<b>Aktivierung der Taq-P.</b> <i>Taq-Polymerase</i>	<b>95</b>	<b>10</b>	
<b>Denaturierung</b>	<b>95</b>	<b>0,5</b>	
<b>Primer-annealing</b>	<b>60</b>	<b>0,5</b>	<b>40</b>
<b>Primer-elongation</b>	<b>72</b>	<b>0,5</b>	
<b>Schmelzpunktbestimmung des PCR-Produkts</b>	<b>55-95</b>	<b>0,5</b>	

Bei den vorliegenden Experimenten wurden als Reagenzien zu einem Gesamtvolumen von 25 µl, 40 ng cDNA und 15 µl *Master Mix* auf eine 96-well-Platte pipettiert. Die Messungen wurden als Triplets durchgeführt; jede Probe wurde somit pro Gen dreifach gemessen. Der *Master Mix* bestand pro well aus 12.5 µL SYBR™ green, 0,6 µL 10 µmol.L<sup>-1</sup> *sense Primer*, 0,6 µL 10 µmol.L<sup>-1</sup> *antisense Primer* und 1.3 µL Wasser. Die Proben wurden zusammen mit der

Reaktionslösung in die *wells* pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und kurz zentrifugiert. Die qRT-PCR wurde in einem Mx3000P-Gerät (Anhang 12.1) durchgeführt. Das Temperaturzeitprofil ist in der Tabelle 3.2.2.4 aufgeführt.

---

### 3.2.2.5 OLIGONUKLEOTIDE

Für die qRT-PCR unter Verwendung von *SYBR™ green* wurden die in 3.2.2.8 gelisteten Oligonukleotide verwendet.

Für den Entwurf der *Primer* wurde das *Primer-BLAST* Programm der NCBI Webseite verwendet<sup>5</sup>. Das Programm generiert Vorschläge für *Primer*-Paare anhand eines in der NCBI-Gendatenbank gewählten Gen-Abschnitts. Bei der Erstellung der Vorschläge waren bestimmte Auflagen zu erfüllen. Unter anderem waren nicht mehr als 5 Fehlpaarungen zwischen *Primer* und DNA-Abschnitt erlaubt und es sollte zumindest ein *Primer* eines Paares einen *Exon/Intron* Übergang überspannen. Dadurch sollte gewährleistet sein, dass keine genomische DNA sondern nur die entstandene cDNA amplifiziert wurde. Genomische DNA beschreibt dabei die DNA, die im Zellkern eines Organismus vorhanden ist. Ist diese in der Reaktionslösung noch vorhanden und enthält der *Primer* keinen *Exon/Intron* Übergang, kann es zur Amplifikation von unspezifischen Sequenzen kommen.

Bei der Auswahl der generierten *Primer* wiederum waren weitere Punkte wie in den *primerdesign guidelines* ausgeführt zu berücksichtigen. Die *Primer* durften eine Länge von 18-22 bp (Basenpaare) nicht überschreiten, die Schmelztemperaturen beider *Primer* eines Paares sollten innerhalb einer Temperaturbreite von 3°C liegen und der Gehalt an GC-Basen sollte bei 40-60% liegen. Ausgeschlossen wurden *Primer*, die mehr als vier Wiederholungen einer einzelnen Base oder eines Dinukleotids aufwiesen.

Die *Primer*, die diese Voraussetzungen am weitesten erfüllten, wurden ausgewählt. Anschließend wurden die *Primer* mittels des Oligo-Analyzers<sup>6</sup> auf ihre Neigung zur Bildung von Sekundärstrukturen hin untersucht. Die Neigung zur Bildung wird als Änderung der thermodynamischen Größe Freie Energie  $\Delta G$  (nach Gibbs) ausgedrückt, um die die Freie Energie der Sekundärstruktur geringer ist als die der Primärstruktur. Je größer die Differenz der Energien der Strukturen ist, desto größer ist die Neigung zur Bildung der energetisch günstigeren Struktur. Die

---

<sup>5</sup> [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)

<sup>6</sup> <http://eu.idtdna.com/calc/analyser>

Bildung von Sekundärstrukturen ist zu vermeiden, weil durch sie die Bindung von *Primer* an die DNA-Vorlage behindert und somit die Menge an Amplifikationsprodukt verringert wird. Die *Primer* wurden daher in einer ersten Beurteilung auf die Bildung von Haarnadelstrukturen untersucht. Haarnadelstrukturen entstehen aufgrund einer intramolekularen Bindung, wobei ein Energieunterschied von  $-2/-3 \text{ kcal.mol}^{-1}$  toleriert wurde. Als zweites wurden die *Primer* auf Bildung von Selbstdimeren untersucht. Selbstdimere entstehen, wenn *Primer* in die gleiche Richtung hybridisieren, somit homolog zu sich selbst sind und sich aneinander legen. Als letztes wurde auf *Primer-Primer*-Dimere untersucht. Hierbei kommt es zu intermolekularen Verbindungen zwischen *sense Primer* und *antisense Primer*. Für beide Strukturen, die etwas geringeren Einfluss auf die *Primer*-DNA Bindung haben als Haarnadelstrukturen, wurden Differenzwerte von  $-5$  bis  $-6 \text{ kcal.mol}^{-1}$  toleriert.

Zusätzlich zu der Untersuchung auf Sekundärstrukturen wurde zudem mittels des BLAST-Programms der NCBI-Webseite geprüft, wie spezifisch sich der *Primer* an die gewählte DNA-Sequenz bindet. Eine hohe Spezifität vermeidet die unerwünschte Amplifikation der Produkte nicht gewählter DNA-Sequenzen [115, 116, 117].

### 3.2.2.6 PRIMER-OPTIMIERUNG - QRT-PCR - SYBR™ GREEN

Die Bestimmung der optimalen "Schmelztemperatur" eines *Primer* kann sowohl berechnet als auch experimentell ermittelt werden. Für die *Primer*-Optimierung des SYBR™ green Verfahrens wurde eine experimentelle Methode gewählt, bei der *Primer*-Paare bei verschiedenen Temperaturen die PCR durchlaufen und danach durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

**TABELLE 3.2.2.6 TEMPERATURZEITPROFIL DER QUALITATIVEN PCR**

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur - °C</i>	<i>Zeit - min</i>	<i>Wiederholungen</i>
<b>Aktivierung Taq-P.</b> <i>Taq-Polymerase</i>	<b>95</b>	<b>10</b>	
<b>Denaturierung</b>	<b>95</b>	<b>0,15</b>	
<b><i>Primer-annealing</i></b>	<b>X</b>	<b>1</b>	<b>40</b>
<b><i>Primer-elongation</i></b>	<b>72</b>	<b>0,5</b>	
<b>Abschluss-elongation</b>	<b>72</b>	<b>10</b>	

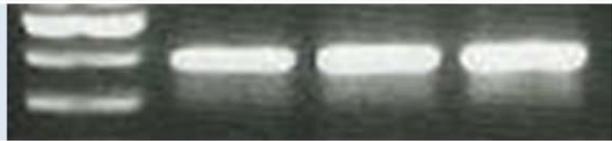
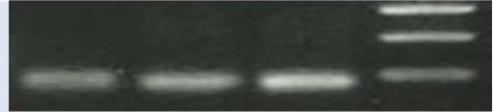
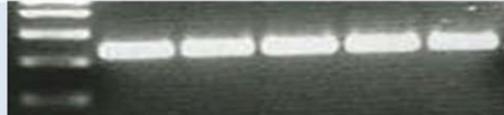
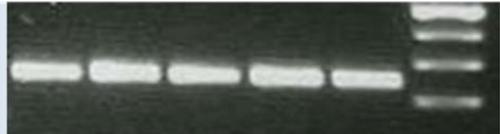
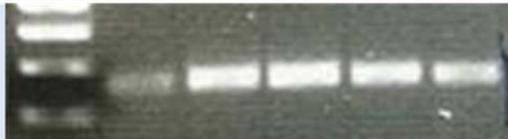
Zur Analyse wurden 12,5  $\mu\text{L}$  *SYBR*<sup>TM</sup> *green*, 0,6  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  *sense Primer*, 0,6  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  *antisense Primer*, 40 ng aus Hela-Zellen gewonnene cDNA und destilliertes, steriles Wasser ad 15  $\mu\text{L}$  eingesetzt. Danach wurde ein *Primer*-Paar auf insgesamt fünf Analyse-Röhrchen (*tubes*) aufgeteilt und in einer definierten Reihenfolge in einen Hitzeblock eingesetzt. Hierbei wurde das in Tabelle 3.2.2.6 gelistete Temperaturzeitprofil durchlaufen. Die durch x gekennzeichneten Schmelztemperaturen lagen bei [1]: 55,1°C, [2]: 56,3°C, [3]: 57,2°C, [4]: 59,4°C, und [5]: 61,5°C.

### 3.2.2.7 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Die replizierten *Primer* wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Qualität der *Primer* zu beurteilen.

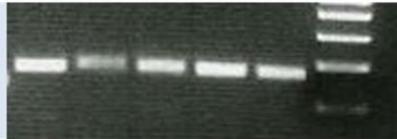
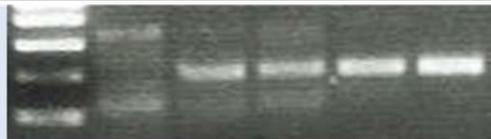
Zur Herstellung des 2%-tigen Agarosegels wurde das Agarosepulver mit 1xTAE-Puffer verwendet. Es wurden 10  $\mu\text{L}$  0,5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  Ethidiumbromid hinzugefügt. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. Die Proben wurden nach dem PCR-Durchlauf zunächst mit 1  $\mu\text{L}$  Probenpuffer (Orange G) gemischt. Der Probenpuffer (Orange G) dient dazu den pH-Wert auf einem Niveau zu halten und zudem die Dichte der Probe zu erhöhen, so dass die Probe auf den Boden der Kammern sinkt. In die Kammern wurden die Proben pipettiert, wobei die erste und die letzte Kammer mit 100 bp DNA *ladder* als Marker beladen wurden. Durch diesen konnte die Größe des Produktes bestimmt werden. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde mit einer Spannung von 150 V für 30-45 Minuten durchgeführt. Da das Ethidiumbromid mit der doppelsträngigen DNA interkaliert, wird diese unter UV-Licht sichtbar. Anschließend wurde das Gel fotografiert und die *Primer* anhand der Amplifikationsprodukte ausgewählt [118, 119, 120].

## 3.2.2.8 QRT-PCR PRIMER-LISTE - SYBR™ GREEN

Primer-Liste rattus norvegicus		Zyklen: 40			
Gen		Sequenz	TM	Größe bp	Temperatur °C: 55.1 – 56.3 – 57.2 – 59.4 – 61.5
<b>β-Aktin</b> <b>HKG</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3' 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'  β-actin	58/59	393	500 400 300 
<b>B2M</b> <b>HKG</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'-CCGTCACCTGGGACCGAGACA-3' 5'-CCGGATCTGGAGTTAAACTGGTCCA-3'  beta-2-microglobulin	66/64	78	300 200 100 
<b>SDHA</b> <b>HKG</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'-ACGTTTGACAGGGGAATGGT-3' 5'-GGTGTGCTTCTCCAGTGTT-3'  succinate dehydrogenase complex, subunit A	59/60	228	300 200 100 
<b>COL1 A1</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'-TGACTGGAAGAGCGGAGAGT-3' 5'-GATAGCGACATCGGCAGGAT-3'  collagen, type I, alpha 1	49/49	250	400 300 200 
<b>COL3 A1</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'-AGAGGCTTTGATGGACGCAA-3' 5'-GGTCCAACCTCACCCCTTAGC-3'  collagen, type III, alpha 1	47/51	263	400 300 200 
<b>MMP 2</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'-CACTTTCTATGGCTGCCCA-3' 5'-GGTCAAGGTCACCTGTCTGG-3'  matrix metalloproteinase 2	60/60	107	300 200 100 

<i>Primer-Liste rattus norvegicus</i>		Zyklen: 40				
Gen		Sequenz	TM	Größe bp	Temperatur °C: 55.1 – 56.3 – 57.2 – 59.4 – 61.5	
<b>MMP 9</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'-GATCCCCAGAGCGTACTCG-3' 5'-GTTGTGGAAACTCACACGCC-3'	60/60	132	200 100 50	
<b>TIMP 1</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'-AGAGCAGATACCACGATGGC-3' 5'-GCCCTTATAACCAGGTCCGA-3'	49/49	146	400 300 200	
<b>IL 6</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'-ATATGTTCTCAGGGAGATCTTGGAA-3' 5'-AGTGCATCATCGCTGTTCATACA-3'	60/61	81	300 200 100	
<b>IL 10</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'- CCTGGTAGAAGTGATGCCCC-3' 5'- GGGAGAAATCGATGACAGCGT-3'	51/49	123	300 200 100	
<b>TGFB 1</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'- GACCGCAACAACGCAATCTA-3' 5'- GTATCAGTGGGGTCAGCAG-3'	47/51	233	400 300 200	
<b>COX 1</b>	<i>fwd</i> <i>rev</i>	5'- CTGGCGTTGCTCATCCATCT-3' 5'- AGGGAATGACTGGTGAGGGT-3'	49/49	144	300 200 100	

<i>Primer-Liste rattus norvegicus</i>		Zyklen: 40				
Gen		Sequenz	TM	Größe bp	Temperatur °C: 55.1 – 56.3 – 57.2 – 59.4 – 61.5	
<b>COX 2</b>	fwd rev	5'-ACTACGCCTGAGTTTCTGACA-3' 5'-GGCCCTGGTGTAGTAGGAGA-3'	47/51	249	400 300 200	
		cyclooxygenase 3				
<b>iNOS</b>	fwd rev	5'-AGGCTTGGGTCTTGTAGCC-3' 5'-TGTTGGGCTGGGAATAGCAC-3'	49/49	198	300 200 100	
		Nitric oxide synthase, cytokine inducible				
<b>eNOS</b>	fwd rev	5'-GCAAGACCGATTACACGACA-3' 5'-GTCCTCAGGTCTTGACAC-3'	53/49	204	400 300 200	
		Nitric oxide synthase, endothelial				
<b>BAX</b>	fwd rev	5'-TGAGCGAGTGTCTCCGGCGA-3' 5'-ACGTCAGCAATCATCCTCTGCAGC-3'	60/60	73	300 200 100	
		Bcl2-associated X protein				
<b>BCL 2</b>	fwd rev	5'-GCCACCTGTGGTCCACCTGA-3' 5'-GGCCACAATCCTCCCCCAGT-3'	64/64	181	300 200 100	
		B-cell CLL/lymphoma 2				
<b>CASP 3</b>	fwd rev	5'-CGGAGCTTGAACGCGAAGAA-3' 5'-TCCAGAGTCCATCGACTTGCTTCC-3'	58/58	119	300 200 100	
		caspase 3				

<i>Primer-Liste rattus norvegicus</i>		Zyklen: 40			Temperatur °C: 55.1 – 56.3 – 57.2 – 59.4 – 61.5	
Gen		Sequenz	TM	Größe bp		
<b>CASP 9</b>	fwd rev	5'-GAACCAGGGGTCCAGCAATC-3' 5'-CCTGCCCCGCTGAATATCCTC-3'	51/51	168	400 300 200	
<b>BDNF</b>	fwd rev	5'-AGCAGGCTCTGGAATGATGT-3' 5'-AGCTGCTCCAGGTTAATCCA-3'	53/53	170	300 200 100	
<b>BNP</b>	fwd rev	5'-AGCTCTCAAAGGACCAAGGC-3' 5'-AAAACAACCTCAGCCCGTCA-3'	60/60	189	300 200 100	

### 3.2.2.9 ANALYSE DER GENEXPRESSION DURCH QRT-PCR - *TAQMAN*<sup>®</sup> SONDEN

Die Untersuchungen mit *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden<sup>7</sup> wurden im Institut für Pharmakologie der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH in Frankfurt am Main im Labor Dr. Paulus Wohlfahrt durchgeführt.

Das *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden Verfahren der qRT-PCR ermöglicht die Berechnung der Ausgangskonzentration der eingesetzten DNA über die Änderung der Fluoreszenz eines Farbstoffs unter Nutzung des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers [121].

### 3.2.2.10 REVERSE TRANSKRIPTION - *TAQMAN*<sup>®</sup>-SONDEN

Nach der RNA-Isolierung durch das Trizol-Verfahren (3.2.2.1) wurde die vorhandene RNA durch reverse Transkription als Einzelstrang-cDNA abgebildet. Es wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Anhang 12.2.2) nach Herstellerangaben verwendet<sup>8</sup>.

**TABELLE 3.2.2.10**

#### **TEMPERATURZEITPROFIL *HIGH CAPACITY CDNA REVERSE TRANSCRIPTION***

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur - °C</i>	<i>Zeit - min</i>	<i>Wiederholungen</i>
<b>Primer-annealing</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	
<b>Reverse Transkription</b> <i>MultiScribe™ reverse transcriptase</i> <sup>9</sup>	<b>37</b>	<b>120</b>	
<b>Inaktivierung</b>	<b>85</b>	<b>5</b>	
<b>Kühlung</b>	<b>4</b>	∞	

Hierfür wurde in einem ersten Schritt 10 µL 2XRT *Master Mix* auf Eis hergestellt. Zur Herstellung wurden 2 µL 10XRT Puffer, 0,8 µL 25X dNTP Mix, 2 µL 10XRT *Random Primer*, 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transkriptase (rMoMuLV)*<sup>9</sup>, 1 µL RNase-Inhibitor und nukleasefreies Wasser ad 10 µL vermischt. Nach Erstellung des *Master Mix* wurden 10 µl davon mit 1 µg Gesamt-RNA in eine 96-well-Platte pipettiert. Nach der Versiegelung der Platte wurde sie kurz zentrifugiert, bevor sie im *Thermocycler* dem in Tabelle 3.2.2.10 definierten Temperaturzeitprofil unterworfen wurde.

<sup>7</sup> Fluoreszenzmarkierte Sonde für sequenzspezifische qRT-PCR mittels thermostabiler DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq)

<sup>8</sup> [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042557.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042557.pdf)

<sup>9</sup> recombinant Moloney murine leukemia viruses (rMoMuLV)

### 3.2.2.11 PRÄ-AMPLIFIKATIONSREAKTION – TAQMAN® SONDEN

Für die Präamplifikationsreaktionen wurde wie vom Hersteller empfohlen (Applied Biosystems, USA) 100 ng cDNA pro Reaktion eingesetzt. Hierbei wurde dieselbe Menge an cDNA für jede Reaktion eingesetzt<sup>10</sup>.

*Custom TaqMan® PreAmp Pool*, *TaqMan® PreAmp Master Mix* und cDNA, wurden vermischt und auf eine 96-Wellplatte pipettiert. Die Platte wurde versiegelt, kurz zentrifugiert und in einem *Thermocycler* dem in Tabelle 3.2.2.11 definierten Temperaturzeitprofil unterworfen wurde [121].

**TABELLE 3.2.2.11**

**TEMPERATURZEITPROFIL DER PRÄ-AMPLIFIKATIONSREAKTION**

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur °C</i>	<i>Zeit - min</i>	<i>Wiederholungen</i>
<b>Aktivierung (Enzym)</b> <i>AmpliTaq Gold® DNA Polymerase</i>	<b>95</b>	<b>10</b>	
<b>Denaturierung</b>	<b>95</b>	<b>0,25</b>	<b>14</b>
<i>annealing/elongation</i>	<b>60</b>	<b>4</b>	
<b>Inaktivierung (Enzym)</b>	99,9	10	

### 3.2.2.12 QRT-PCR - TAQMAN® MICROFLUIDIC CARDS

Um die Expression mehrerer Gene anhand der cDNA gleichzeitig zu erfassen, wurden die *TaqMan® Microfluidic Cards*- nach Herstellerangaben (Applied Biosystems, USA) verwendet<sup>11</sup>. Die 384 *wells* der *Microfluidic Cards*, in die *TaqMan® Primer* bereits integriert sind, erlauben die gleichzeitige Messung von 24 Genen von 8 Proben. Eine Auflistung der verwendeten *TaqMan® Primer* findet sich in Tabelle 3.2.2.13. Die Karten enthalten 8 trichterförmige Reservoirs, jedes Reservoir wurde jeweils mit einer Probe befüllt.

Eine Probe enthielt 3 µl *PreAmp* Produkt (3.2.2.11), 52 µl nukleasefreies Wasser und 55 µl *TaqMan® Gene Expression Master Mix* in einem Gesamtvolumen von 110 µl.

<sup>10</sup> [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_088987.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_088987.pdf),

<sup>11</sup> [https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_062836.pdf](https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_062836.pdf)

Die *Microfluidic Cards* wurden für ca. 15 Minuten, wie vom Hersteller empfohlen, bei Raumtemperatur belassen, bevor sie mit den Proben beladen wurden. Nach der Beladung wurden sie zur sauberen Abgrenzung der *wells* für jeweils eine Minute mit 12 000 g zwei Mal nacheinander zentrifugiert und im Anschluss versiegelt.

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde der *Vii A Cyclor* (life technologies, USA) verwendet und das in Tabelle 3.2.2.12 aufgeführte Temperaturzeitprofil gefahren.

Die Reservoirs wurden entfernt und die Karte in den *Vii A Cyclor* zur quantitativen Bestimmung der cDNA eingelegt. In einem initialen Schritt wurde die Karte auf 95°C erhitzt, wobei folgende Unterschritte erfolgten; 1°C pro Sekunde bis 50°C, für zwei Minuten gehalten, 1°C pro Sekunde auf 95°C, für 10 Minuten gehalten. Anschließend wurde die qRT-PCR mit einem Maximum an 40 Zyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus in zwei Unterschritten erfolgte<sup>12</sup>.

**TABELLE 3.2.2.12**

**TEMPERATURZEITPROFIL DER QRT-PCR - *TAQMAN*<sup>®</sup> *MICROFLUIDIC CARDS***

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur - °C</i>	<i>Zeit - min</i>	<i>Wiederholungen</i>
<b>Aktivierung der UNG</b> <i>Uracil-DNA-Glycosylase</i>	<b>50</b>	<b>2</b>	
<b>Aktivierung der Taq-P.</b> <i>Taq-Polymerase</i>	<b>95</b>	<b>10</b>	
<b>Denaturierung</b>	<b>95</b>	<b>0,25</b>	<b>40</b>
<b><i>annealing</i>/Elongation</b>	<b>60</b>	<b>1</b>	

<sup>12</sup> <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4453536>

**3.2.2.13 QRT-PCR PRIMER-LISTE - TAQMAN®**

<b>Gen Symbol</b>		<b>Assay ID</b>	<b>Gen Name</b>	<b>Referenz Sequenz ID</b>	<b>Amplicon Länge</b>	<b>Exon-Boundary</b>
<b>AGTR 1a</b>	6	Agtr1a- Rn00578456_m1	angiotensin II receptor, type 1a	NM_030985.4	98	2_3
<b>AGTR 1b</b>	7	Agtr1b- Rn02132799_s1	angiotensin II receptor, type 1b	NM_031009.2	150	
<b>AGTR 2</b>	8	Agtr2- Rn00560677_s1	angiotensin II receptor, type 2	NM_012494.3	71	1_1
<b>BAX</b>	9	Bax- Rn02532082_g1	Bcl2-associated X protein	NM_017059.1	57	3_3
<b>BCL 2</b>	10	Bcl2- Rn99999125_m1	B-cell CLL/lymphoma 2	NM_016993.1	104	1_2
<b>NPPB</b>	12	Nppb- Rn00676450_g1	natriuretic peptide B	NM_031545.1	77	1_2
<b>CASP 3</b>	13	Casp3- Rn00563902_m1	caspase 3	NM_012922.2	93	3_4
<b>CASP 9</b>	14	Casp9- Rn00581212_m1	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_031632.1	68	1_2
<b>COL1 A1</b>	15	Col1a1- Rn01463869_g1	collagen, type I, alpha 1	NM_053304.1	64	50_51
<b>COL3 A1</b>	16	Col3a1- Rn01437650_g1	collagen, type III, alpha 1	NM_032085.1	59	10_11
<b>IL 1b</b>	20	Il1b- Rn00676333_g1	interleukin 1 beta	NM_031512.2	66	4_5
<b>IL 10</b>	21	Il10- Rn00563409_m1	interleukin 10	NM_012854.2	70	4_5
<b>IL 2</b>	22	Il2- Rn99999181_m1	interleukin 2	NM_053836.1	78	2_3

<b>IL 6</b>	23	Il6- Rn99999011_m1	interleukin 6	NM_012589.1	90	2_3
<b>MMP 1a</b>	26	Mmp1a- Rn01486634_m1	matrix metallopeptidase 1a	NM_001134530.1	88	7_8
<b>MMP 13</b>	25	Mmp13- Rn01448194_m1	matrix metallopeptidase 13	NM_133530.1	65	4_5
<b>MMP 2</b>	27	Mmp2- Rn01538170_m1	matrix metallopeptidase 2	NM_031054.2	63	2_3
<b>MMP 8</b>	28	Mmp8- Rn00573646_m1	matrix metallopeptidase 8	NM_022221.1	92	1_2
<b>MMP 9</b>	29	Mmp9- Rn00579162_m1	matrix metallopeptidase 9	NM_031055.1	72	12_13
<b>TGFB 1</b>	30	Tgfb1- Rn00572010_m1	transforming growth factor, beta 1	NM_021578.2	65	1_2
<b>TIMP 1</b>	31	Timp1- Rn01430875_g1	TIMP metallopeptidase inhibitor 1	NM_053819.1	79	5_6
<b>B2M</b>	3	B2m- Rn00560865_m1	beta-2 microglobulin	NM_012512.2	58	1_2
<b>GUSB</b>	4	Gusb- Rn00566655_m1	glucuronidase, beta	NM_017015.2	63	single exon
<b>18S</b>	1	18S- Hs99999901_s1	eukaryotic ribosomal 18S RNA	HSRRN18S	187	single exon

### 3.3 STATISTISCHE ANALYSE

Die Zahl der unter Berücksichtigung der Streuung der Daten zur statistischen Sicherung signifikanter Effekte auf die Genexpression mindestens benötigten Tiere beziehungsweise Proben war mangels eines Pilotexperimentes nicht abzuschätzen, so dass die vorliegende Arbeit als explorativ zu betrachten ist.

Die Gruppengröße war auf einen signifikanten Blutdruckunterschied zwischen Kontrolltieren und mit L-NAME behandelten Tieren ausgelegt und konnte daher abgestimmt mit dem hierfür zuständigen Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin und unter Berücksichtigung einer Mortalität von 2 – 3 Tieren pro Gruppe während des Versuches auf 10 – 15 Tiere pro Gruppe begrenzt werden [21].

Nur makroskopisch intakte Gewebeproben wurden für die morphometrischen und histochemischen Untersuchungen verwendet [21], und nur die letztlich verbliebenen Proben, wie in den Tabellen 3.2.1 und 4.1 gelistet, standen für diese Arbeit zur Verfügung.

#### 3.3.1 RELATIVER EXPRESSIONSUNTERSCHIED

Die Quantifizierung der PCR-Ergebnisse der Zielgene (*Gene of Interest*, GOI) erfolgte relativ zu einem *Housekeeper Gene Index* (HKG).

Der statistische Analyseplan der vorliegenden Arbeit sah vor, die als Ausdruck der Genexpression beobachteten absoluten Zahl der Zyklen ( $Ct$ ) der Echtzeit-Polymerasereaktion, und die absoluten und relativen  $Ct$  Differenzen ( $\Delta Ct$  und  $\Delta\Delta Ct$ ) zu *House-* bzw. *Bestkeeper* Genen als Referenzsubstrat sowie die Angabe als Vielfaches des relativen Unterschiedes ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) statistisch zu beschreiben, abzubilden und in einem zweiten Schritt auf Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu prüfen.

In einem ersten Schritt wird die Differenz,  $\Delta Ct$ , der  $Ct$  Werte zwischen einem GOI und dem HKG gebildet. In einem nächsten Schritt wird die Differenz der Differenzen,  $\Delta\Delta Ct$ , zwischen dem  $\Delta Ct$  einer Probe und dem  $\Delta Ct$  einer unbehandelten Kontrolle berechnet und dann exponentiell als relativer Expressionsunterschied,  $2 \cdot \exp[-\Delta\Delta Ct]$  oder  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , dargestellt. Die Berechnung ist beispielhaft in den Datenblättern des Anhangs 12.3 wiedergegeben.

Eine Genexpression, die den Fluoreszenzschwellenwert innerhalb von 40 Zyklen nicht erreicht, war mit dem Wert 40 zu führen.

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{Zielgen})} - Ct_{(\text{Bestkeeper})}$$

$$\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{(\text{Zielgen})} - \Delta Ct_{(\text{Bestkeeper})}]_{\text{Probe}} - [\Delta Ct_{(\text{Zielgen})} - \Delta Ct_{(\text{Bestkeeper})}]_{\text{Kontrolle}}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{relativer Expressionsunterschied}$$

Die Effizienz der Replikation wird hierbei für beide Vergleichspartner als gleich angenommen. Die Effizienz der in dem vorliegenden Experiment verwendeten *Primer* wurde mittels einer Verdünnungsreihe berechnet und als gleich gefunden. Als Referenz wurden drei *Housekeeper* Gene ausgewählt, die ein konstantes vom Gewebetyp und äußeren Einflüssen unabhängiges Expressionsverhalten aufweisen, und mittels des *Bestkeeper* Verfahrens zu einem HKG zusammengefasst wurden [122, 123].

---

### 3.3.2 DESKRIPTIVE STATISTIK

Zur Erfassung und Berechnung von  $\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct$  und  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  waren Datenblätter zu entwickeln, die die Ermittlung der relativen Genexpression wegen der Dreifachmessung pro Tier und Gen mittels *SYBR<sup>TM</sup> green* und der Zweifachmessung mittels *TaqMan<sup>®</sup>* Sonden sowohl auf Mittelwertbasis als auch auf Medianbasis ermöglichen (Beispiel Anhang 12.3). Die gewählte deskriptive Statistik umfasst die Wiedergabe der Mediane der Mehrfachmessungen pro Tier und Gen als auch der Mediane pro Gen und Gruppe.

Als Abbildungsformate wurden *density strips* zur Lokalisation des gesamten Datenbereiches pro Versuch (*SYBR<sup>TM</sup> green*, *TaqMan<sup>®</sup>*) und Gewebe (Herz, Aorta), pro Versuch, Gewebe und Gruppe, so wie pro Gen und Gruppe, wegen der starken Streuung über mehrere Potenzen auf logarithmischer Basis, und *Box-Whisker-Plots* nach Cleveland (SYSTAT 13) auf nicht transformierter Basis gewählt. Letztere sind mit dem 25 – 75% Bereich (*innerquartile range*, IQR) und Maxima und Minima abgebildet.

Zum optischen Vergleich sind die Ergebnisse gleicher Gene der *SYBR<sup>TM</sup> green* und *TaqMan<sup>®</sup>* Bestimmung im Anhang F und G pro Gen und Gewebe gegenübergestellt.

---

### 3.3.3 SCHLIESSENDE STATISTIK

Zur Prüfung auf Kontraste zwischen den Gruppen wurde als nicht-parametrisches, verteilungsunabhängiges Verfahren die Rank-Summenanalyse nach *Kruskal-Wallis* mit nachfolgenden paarweisen Vergleichen nach *Conover-Inman* gewählt. Als Signifikanzschwelle wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von weniger als 5 % ( $p < 0.5$ ) angenommen (SYSTAT 13).

Als Abbildungsformat der statistischen Prüfung wurden gekerbte *Box-Whisker-Plots* nach Tukey (*notched box plots*) gewählt, da sie aus der Nicht-Überlappung des 95% Vertrauensbereiches (*confidence interval*) der zu vergleichenden Gruppenwerte unmittelbar auf statistisch signifikante Unterschiede schließen lassen (SYSTAT 13).

### 3.3.4 HAUPTKOMPONENTENANALYSE

Für die Auswertung der *TaqMan<sup>®</sup> Microfluidic Cards* PCR Ergebnisse wurde ergänzend eine exploratorische Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA) zum Auffinden von Ausreißern und zur Mustererkennung vorgeschaltet [124, 125] und im Anschluss eine Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgenden paarweisen Vergleichen mit dem *Array Studio Omnicsoft* (Version 6.1) [<http://www.omicsoft.com/array-studio/>] durchgeführt.

Die Hauptkomponentenanalyse, strukturiert und vereinfacht durch eine mathematische Hauptachsentransformation umfangreiche Datensätze in Richtung ihrer größten Varianz. Als Ergebnis liefert sie für jede gemessene Probe eine Anzahl von Hauptkomponenten, die deutlich geringer ist als die Anzahl der gemessenen Variablen. Die erste Hauptkomponente bildet dabei die größte Varianz über alle gemessenen Variablen ab, die zweite Hauptkomponente die zweitgrößte Varianz. Oft reichen wenige Hauptkomponentenfaktoren aus, die Varianz fast vollständig abzudecken. Die Grundannahme für die Verwendung der Hauptkomponente ist immer, dass in Richtung der größten Varianz auch der größte Informationsgehalt der gemessenen Information liegt. Die Hauptkomponentenanalyse wird auch häufig in der Clusteranalyse und zur Reduzierung der Dimension des Parameterraums verwendet, insbesondere dann, wenn man noch keinerlei Vorstellung (Modell) von der Struktur der Daten hat. Als zusätzliche Ergebnisse werden Ausreißer und experimentelle Artefakte identifizierbar [126].

## 3.4 LITERATURERECHERCHE

Die für diese Arbeit relevante wissenschaftliche Literatur, siehe Literaturverzeichnis, wurde über das Internetportal PubMed der US National Library of Medicine National Institute of Health [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>] und über MEDLINE [<http://www.nlm.nih.gov/bsd/pmresources.html>]. bezogen. Es wurde Literatur von 1960 bis 2015 recherchiert. Als weiteres Portal für Hypertonie-literatur wurde das Journal für Hypertonie - Austrian Journal of Hypertension in Anspruch genommen [<http://www.kup.at/journals/hypertonie/>]. Die statistische Literatur [125, 127] wurde über JSTOR bezogen [<http://www.JSTOR.org>].

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION AUSGEWÄHLTER GENE IN HERZ- UND AORTAGEWEBEPROBEN L-NAME HYPERTONER RATTEN

Zur Untersuchung der Wirkung einer direkten AT2R Stimulation durch Compound 21 (C21) wurden Genexpressionsanalysen mittels zweier qRT-PCR Methoden durchgeführt. Die hier verwendeten Herz- und Aortagewebebeobproben entstammten männlichen Wistar-Ratten, die je nach Behandlungsgruppe entweder keine Behandlung erhielten (Kontrolltiere, K), oder mit L-NAME behandelt wurden (L) oder mit L-NAME und Olmesartan-Medoxomil (LO) oder mit L-NAME und C21 (LC) oder mit L-NAME und Olmesartan-Medoxomil und C21 behandelt wurden (LOC), (siehe Tabelle 4.1).

Die Zahl der behandelten Tiere und die Zahl der Gewebeprouben sind experimentell bedingt unterschiedlich [3.3].

**TABELLE 4.1**

#### **ZAHLE UNTERSUCHTER HERZ- UND AORTAGEWEBEPROBEN PRO GRUPPE**

BEHANDLUNG	GRUPPE	AORTA	HERZ	<i>identisch</i>
KONTROLLE	<b>K</b> <b>n: 15</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
L-NAME	<b>L</b> <b>n: 15</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
L-NAME + COMPOUND 21	<b>LC</b> <b>n: 15</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>3</b>
L-NAME + OLMESARTAN-MEDOXOMIL	<b>LO</b> <b>n: 10</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>7</b>
L-NAME + OLMESARTAN-MEDOXOMIL + COMPOUND 21	<b>LOC</b> <b>n: 10</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>9</b>

Im Rahmen dieser Arbeit, konnte die Gesamt-RNA aus den Herz- und Aortagewebebeobproben der Wistar-Ratten erfolgreich isoliert werden. Die RNA-Pruben dienten als Ausgangsmaterial der Expressionsanalyse repräsentativer Gene für Inflammations-, Proliferations- und Apoptoseprozesse. Die Analyse erfolgte mittels qRT-PCR unter Verwendung von SYBR™ *green* und in einem parallelen Ansatz mittels *TaqMan*®-Sonden.

Die gemessene Genexpression relativ zu *Bestkeeper*-Genen sowohl im Herzen als auch in der Aorta überstreckt in beiden Versuchen einen Bereich von  $> 1 \times 10^6$ , so dass die logarithmische Darstellung zur Wiedergabe gewählt wurde. Zur vergleichenden statistischen Prüfung wurde wegen der starken Verzerrung der Verteilung ein verteilungsfreies Verfahren nach *Kruskal-Wallis* auf Basis der Ranksummen gewählt.

---

#### **4.1.1 GENEXPRESSIONSANALYSE IM HERZGEWEBE MITTELS QRT-PCR - SYBR™ GREEN**

Die Genexpressionswerte relativ zu *Bestkeeper*-Genen im Herzen überstrecken einen Bereich von ca.  $1 \times 10^6$ . Die Verteilung der Daten weist einen Mittelwert von 2.77 (SD 6.5) und einen Median von 1.02 (IQR 0.53 - 1.89) aus. Sie ist somit stark durch hohe Extremwerte verzerrt.

Innerhalb der Gruppe LOC zeigen sich bei einigen Genen starke Unterschiede in den Genexpressionen zwischen den Tieren (CASP 9, COL1 A1, COL3 A1, eNOS und TIMP 1). Infolge der schiefen Verteilung unterscheiden sich daher Mittelwerte und Mediane der Genexpression dieser Gruppen deutlich.

Es ergibt sich nur für das Gen BNP ein Unterschied zwischen den Gruppen K und L, unbehandelte Kontrolle und L-NAME behandelte Tiere.

Für die Gene BNP, CASP 3, CASP 9, COL1 A1, COL3 A1, eNOS und TIMP 1 werden signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen berechnet, wobei insbesondere höhere Expressionen in der Gruppe LOC auffallen.

Im Detail, die relative mRNA Expression von BNP war in Gruppe L stärker exprimiert als in allen anderen Gruppen, CASP 3 in Gruppen LO und LOC stärker exprimiert als in L und K, CASP 9 in Gruppe L stärker exprimiert als in K und LO, COL1 A1 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in LO, COL3 A1 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in K und LO, eNOS in Gruppen LO und LOC stärker exprimiert als in L, und in LO stärker als in K, und TIMP 1 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in LO.

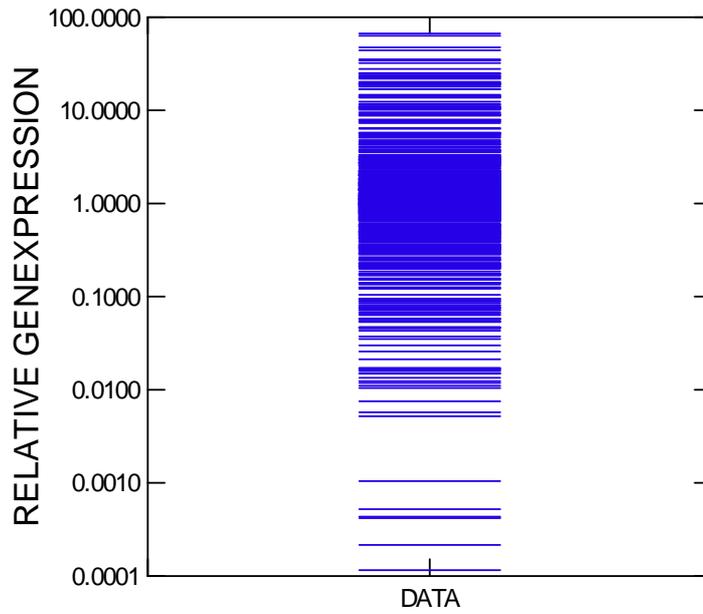


Abbildung 4.1.1.1

Relative Genexpression im Herzgewebe mittels qRT-PCR - *SYBR<sup>TM</sup> green*. Gesamtübersicht der erhobenen Daten in logarithmischem Maßstab. Bereich  $1 \cdot 10^{-4}$  bis  $7 \cdot 10^1$ .

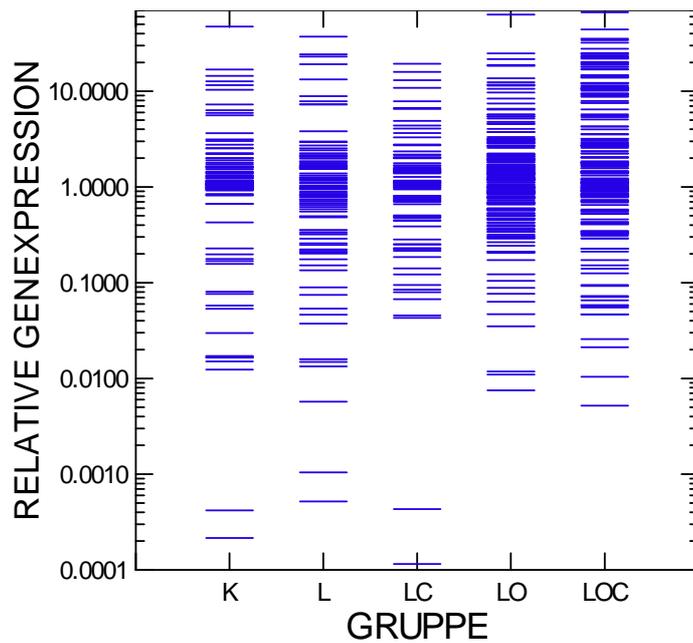


Abbildung 4.1.1.2

Relative Genexpression im Herzgewebe mittels qRT-PCR - *SYBR<sup>TM</sup> green*.

Gesamtübersicht der erhobenen Daten pro Gruppe in logarithmischem Maßstab. Legende siehe Tabelle 4.1.

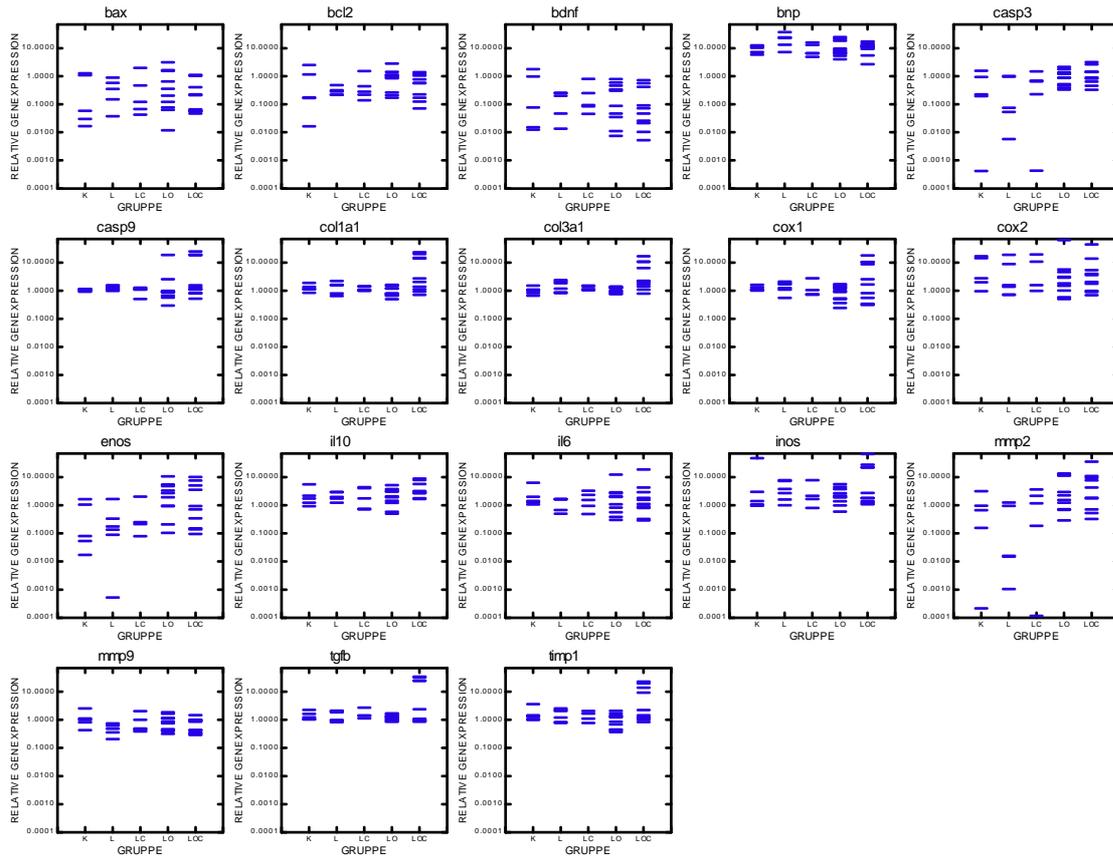


Abbildung 4.1.1.3

Relative Genexpression im Herzgewebe mittels qRT-PCR - SYBR™ green.

Gesamtübersicht der erhobenen Daten pro Gen und Gruppe in logarithmischem Maßstab.

Legende siehe Tabelle 4.1.

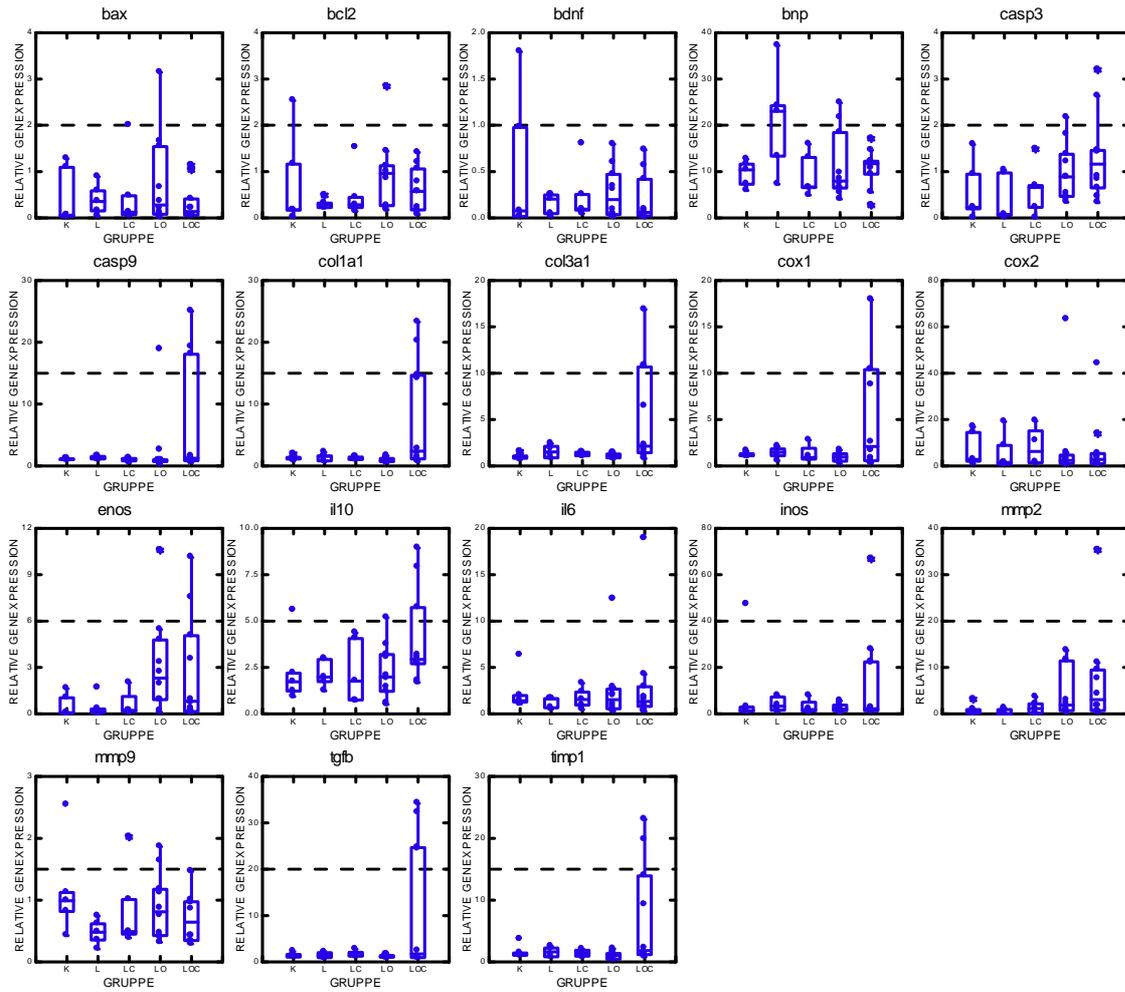
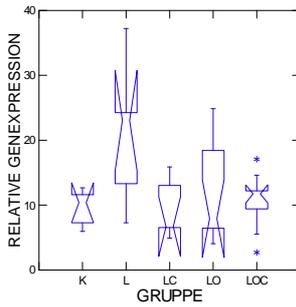
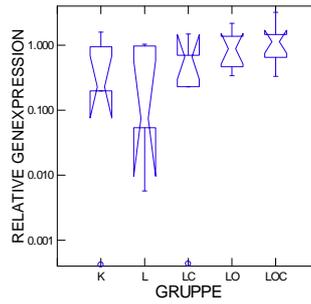


Abbildung 4.1.1.4

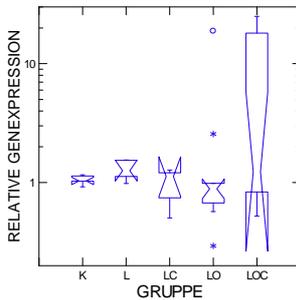
Relative Genexpression im Herzgewebe mittels qRT-PCR - *SYBR™ green* in Box-Whisker-Plots nach Cleveland. Legende siehe Tabelle 4.1.



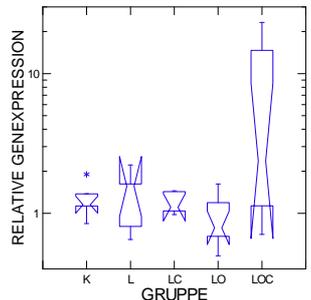
A: BNP in Gruppe L stärker exprimiert als in K, LC, LO und LOC.



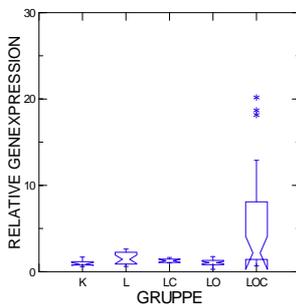
B: CASP 3 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in L (log-Darstellung)



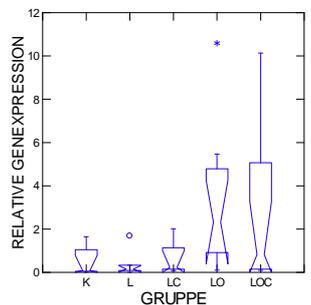
C: CASP 9 in Gruppe L stärker exprimiert als in LO und K (log-Darstellung)



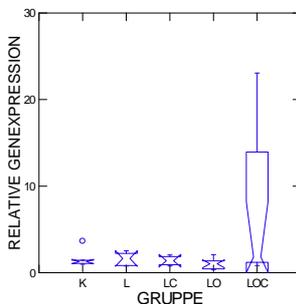
D: COL1 A1 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in LO (log-Darstellung)



E: COL3 A1 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in K und LO



F: eNOS in Gruppen LO und LOC stärker exprimiert als in L, und in LO stärker als in K



G: TIMP 1 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in LO

**Abbildung 4.1.1.5 A-G**

**Im Kruskal-Wallis Test als statistisch signifikant unterschiedlich zwischen Gruppen mittels qRT-PCR - SYBR™ green ermittelte Genexpressionen im Herzgewebe in Box-Whisker-Plots mit Kerbung nach Tukey. Legende siehe Tabelle 4.1.**

---

#### 4.1.2 GENEXPRESSIONSANALYSE IM HERZGEWEBE MITTELS QRT-PCR - *TAQMAN*<sup>®</sup>-SONDEN

Die Genexpression relativ zu *Bestkeeper*-Genen im Herzen überstreckt einen Bereich von  $1 \times 10^8$ . Die Verteilung der Daten weist einen Mittelwert von 0.74 (SD 1.9) und einen Median von 0.023 (IQR 0.001 - 0.276) aus. Sie ist somit stark durch hohe Extremwerte verzerrt.

Es ergeben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen K und L, unbehandelte Kontrolle und L-NAME behandelte Tiere.

Nur für die Gene MMP 8 und CASP 3 werden signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen berechnet (gleiches Ergebnis wie mit ANOVA der Hauptkomponentenanalyse).

Im Detail, MMP 8 war in Gruppe LO stärker exprimiert als in K, L, und LOC, und CASP 3 war in Gruppe LOC stärker exprimiert als in K, L, LC und LO.

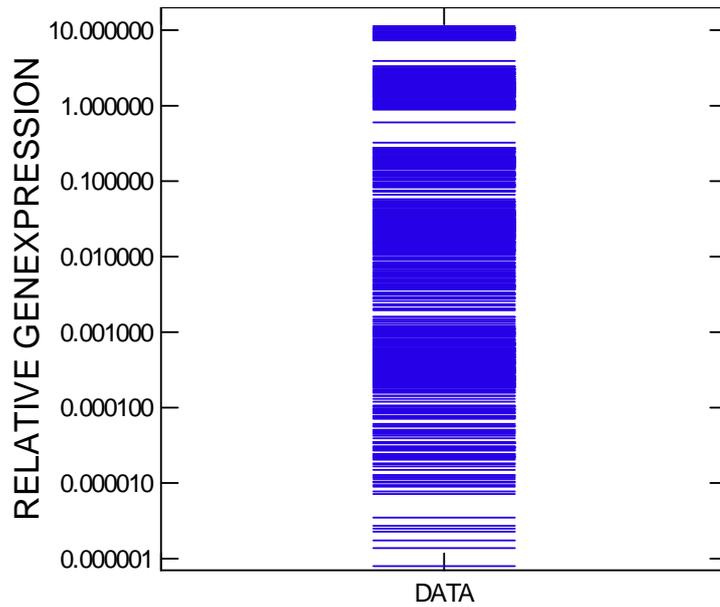


Abbildung 4.1.2.1

Relative Genexpression im Herzgewebe mittels qRT-PCR - *TaqMan*<sup>®</sup>. Gesamtübersicht der erhobenen Daten in logarithmischem Maßstab. Bereich  $8 \cdot 10^{-7}$  bis  $1.2 \cdot 10^1$ .

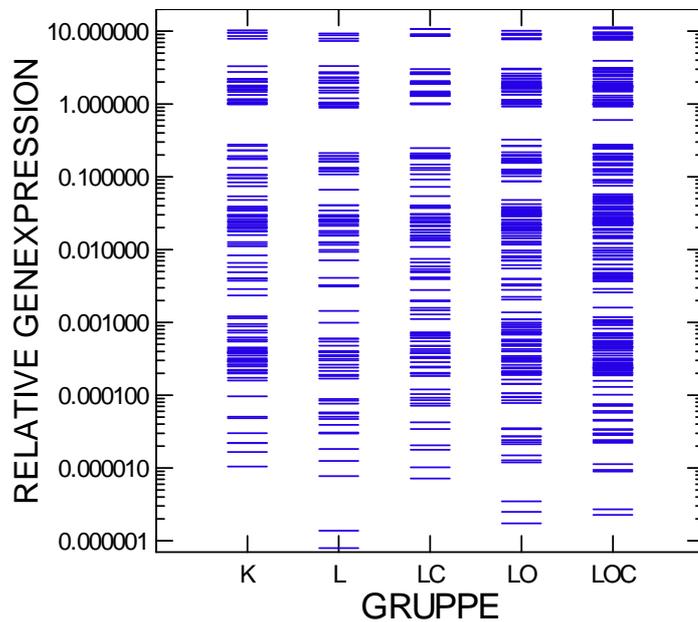


Abbildung 4.1.2.2

Relative Genexpression im Herzgewebe mittels qRT-PCR - *TaqMan*<sup>®</sup>. Gesamtübersicht der erhobenen Daten pro Gruppe in logarithmischem Maßstab. Legende siehe Tabelle 4.1.

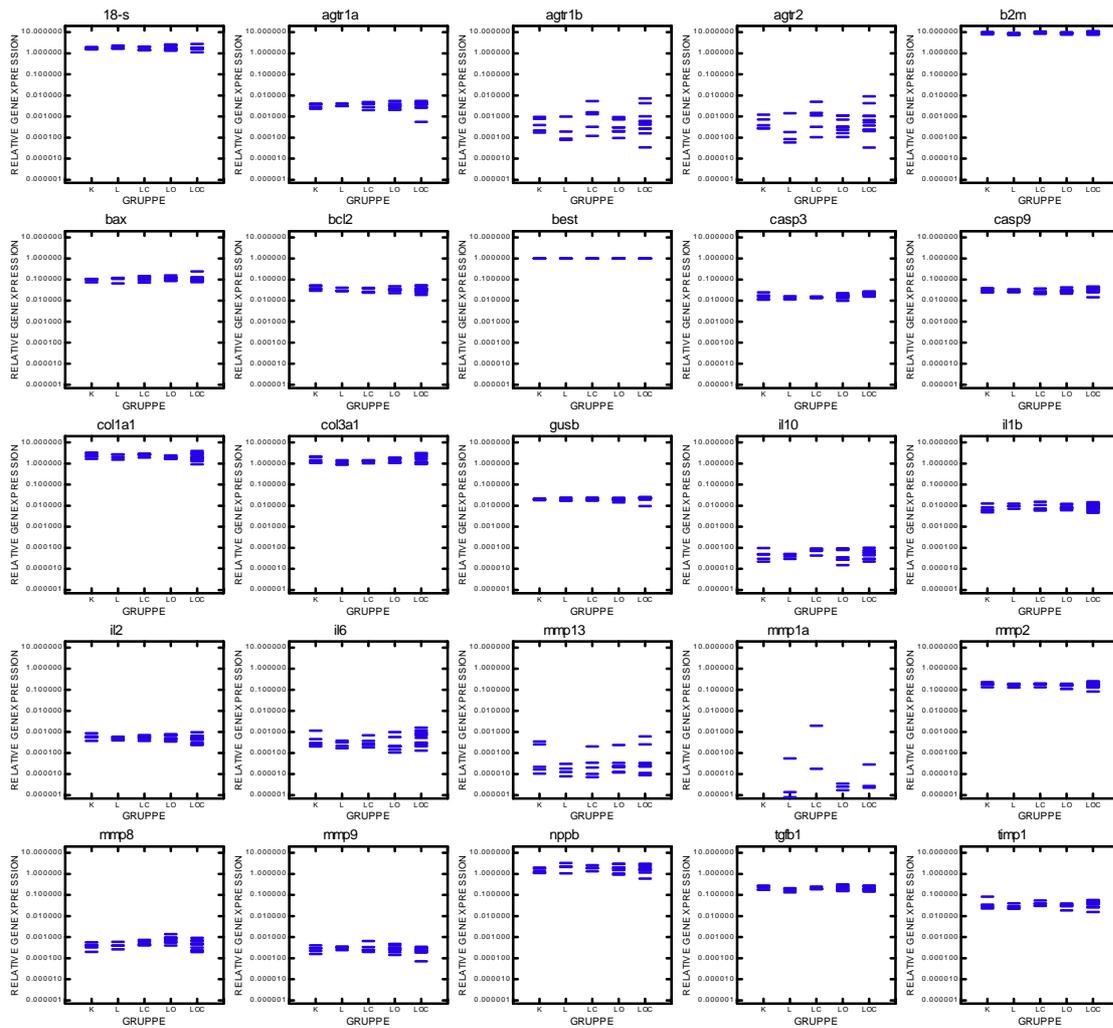


Abbildung 4.1.2.3

Relative Genexpression im Herzgewebe mittels qRT-PCR - *TaqMan*<sup>®</sup> pro Gen und Gruppe. Bereich  $8 \cdot 10^{-7}$  bis  $1.2 \cdot 10^1$ . Legende siehe Tabelle 4.1.

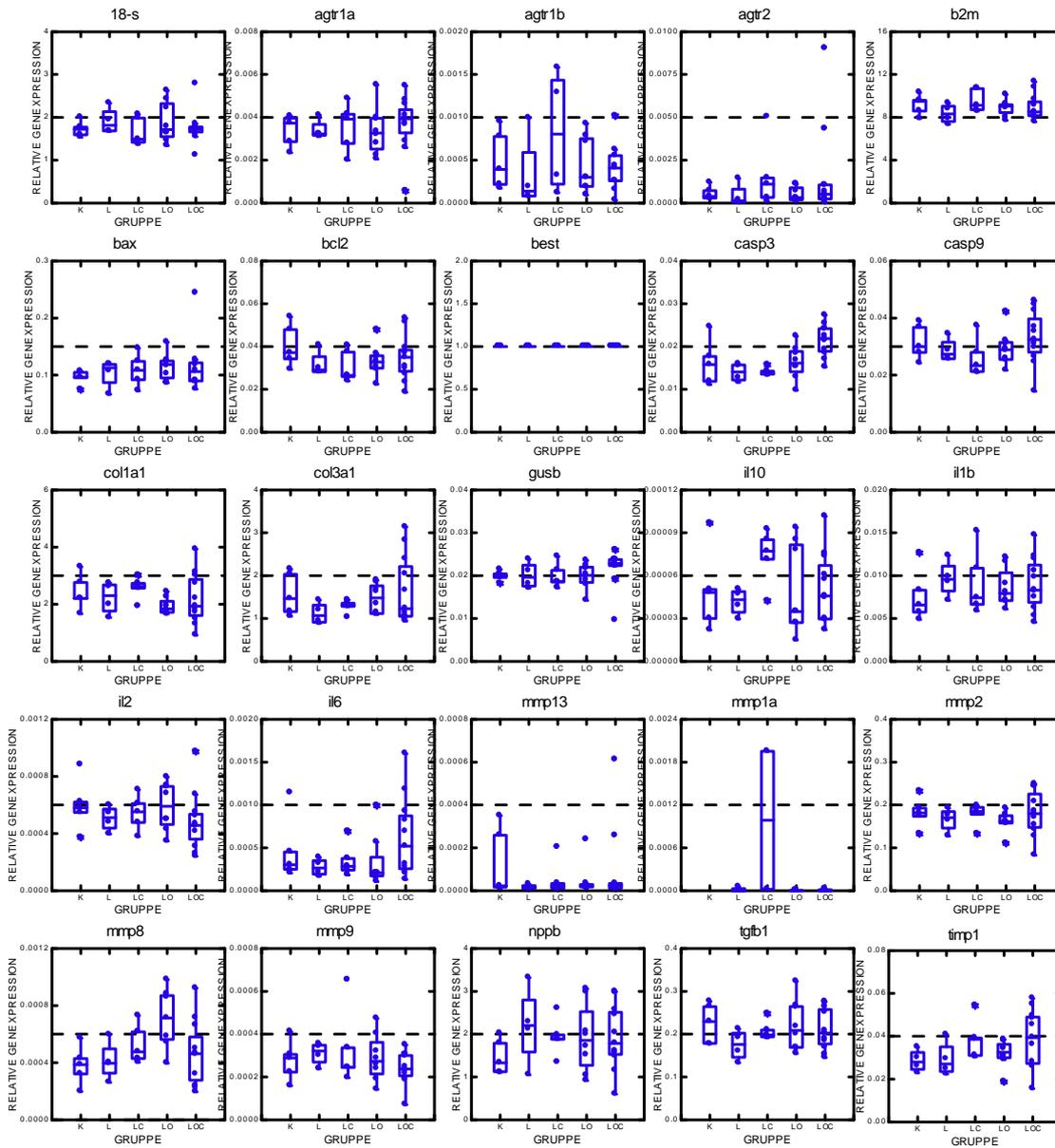
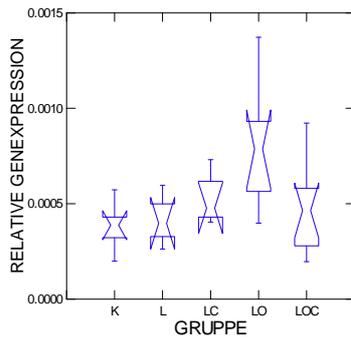
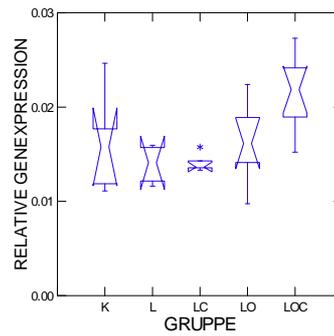


Abbildung 4.1.2.4.

Relative Genexpression im Herzgewebe mittels qRT-PCR - *TaqMan*<sup>®</sup> in Box-Whisker-Plots nach Cleveland. Legende siehe Tabelle 4.1.



A: MMP 8 in Gruppe LO stärker exprimiert als in K, L, und LOC.



B: CASP 3 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in K, L, LC und LO.

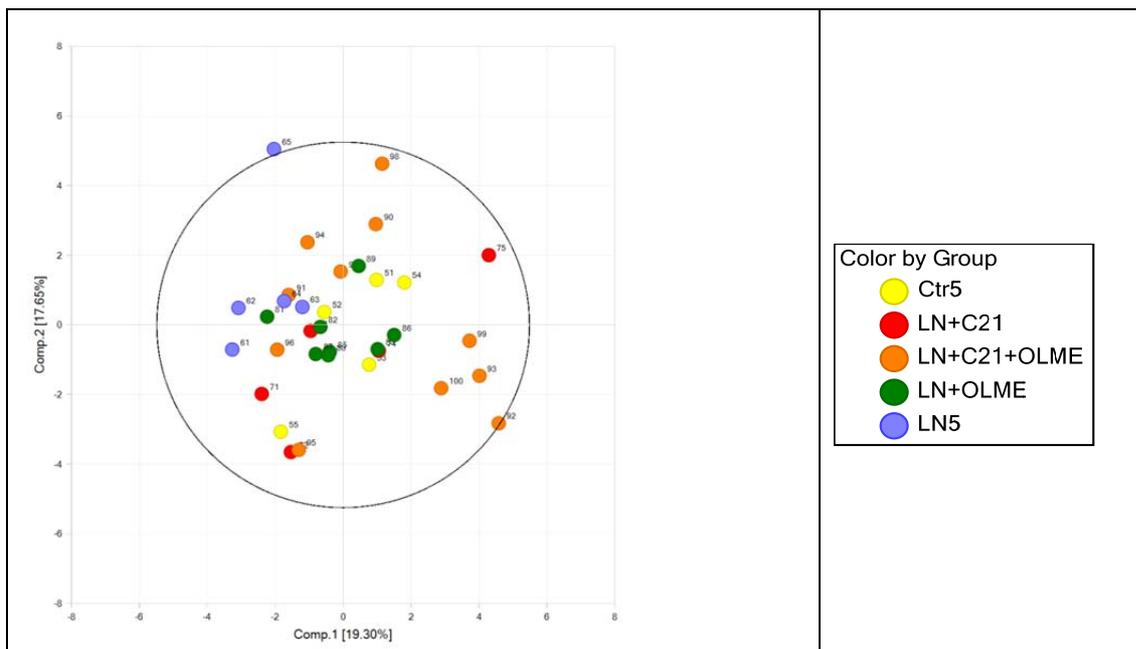
#### Abbildung 4.1.2.5 A-B

Im Kruskal-Wallis Test als statistisch signifikant unterschiedlich zwischen Gruppen mittels qRT-PCR - TaqMan<sup>®</sup> ermittelte Genexpressionen im Herzgewebe in Box-Whisker-Plots mit Kerbung nach Tukey. Legende siehe Tabelle 4.1.

### 4.1.3 HAUPTKOMPONENTENANALYSE FÜR DIE MITTELS QRT-PCT - *TAQMAN*<sup>®</sup>-SONDEN ERMITTELTE RELATIVE GENEXPRESSION IM HERZGEWEBE

Die Hauptkomponentenanalyse von  $\Delta C_t$  mit nachfolgender ANOVA wurde unter der Annahme einer Normalverteilung durchgeführt.

Die exploratorische Hauptkomponentenanalyse ergab, dass neben Probe 83 auch die Probe 65 bei insgesamt stark streuenden Daten als Ausreißer gesehen werden kann. Ein Muster oder eine Separierung von Werten ist nicht zu erkennen.



**Abbildung 4.1.3**

**Hauptkomponentenanalyse für die mittels qRT-PCT-*TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden ermittelte relative Genexpression im Herzgewebe**

---

#### 4.1.4 GENEXPRESSIONSANALYSE IM AORTAGEWEBE MITTELS QRT-PCR - SYBR™ GREEN

Die Genexpression relativ zu *Bestkeeper*-Genen in den hier verwendeten Aortagewebeprobe überstreckt einen Bereich von  $> 1 \times 10^6$ . Die Verteilung der Daten weist einen Mittelwert von 9.3 (SD 22) und einen Median von 2.4 (IQR 1.0 - 6.8) aus. Sie ist somit stark durch hohe Extremwerte verzerrt.

Zwischen den Gruppen K und L, unbehandelte Kontrolle und L-NAME behandelte Tiere, ergeben sich Unterschiede bei BAX und TGFB 1, die beide in Gruppe L gegenüber Gruppe K erhöht sind. Unterschiede zwischen anderen Gruppen wurden darüber hinaus bei COX 2 und IL 6 ermittelt.

Im Detail, die relative mRNA Expression von BAX war in Gruppe L stärker exprimiert als in K, LC, und LOC, COX 2 in Gruppe K stärker exprimiert als in LC und LO, IL 6 in Gruppe L stärker exprimiert als in LOC, TGFB 1 in Gruppe L stärker exprimiert als in K, LC, LO und LOC, und in LOC schwächer exprimiert als in L, LC, und LO.

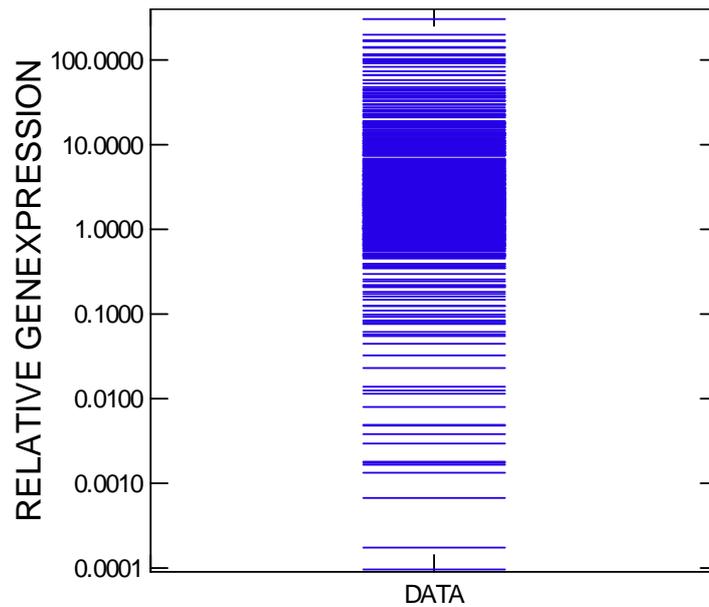


Abbildung 4.1.4.1

Relative Genexpression im Aortagewebe mittels qRT-PCR - *SYBR<sup>TM</sup> green*. Gesamtübersicht der erhobenen Daten in logarithmischem Maßstab. Bereich  $1 \cdot 10^{-4}$  bis  $2 \cdot 10^2$ .

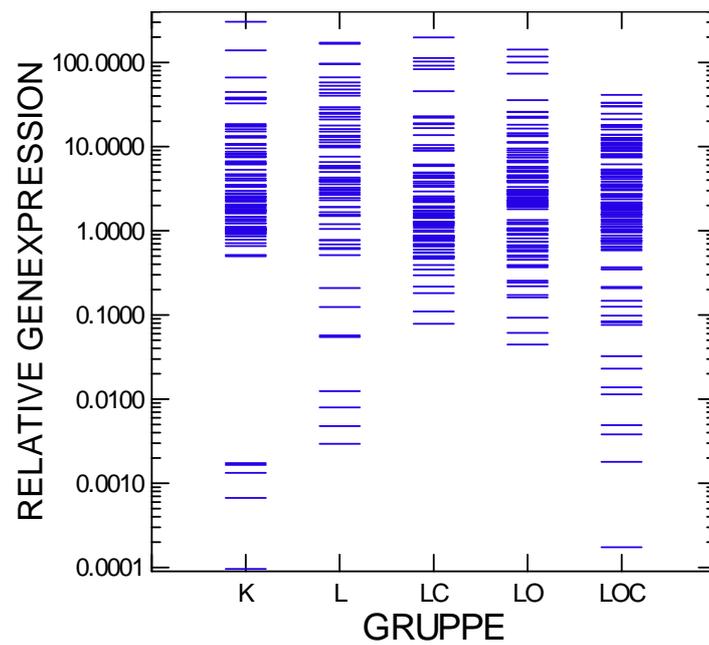


Abbildung 4.1.4.2

Relative Genexpression im Aortagewebe mittels qRT-PCR - *SYBR<sup>TM</sup> green*. Gesamtübersicht der erhobenen Daten pro Gruppe in logarithmischem Maßstab. Legende siehe Tabelle 4.1.

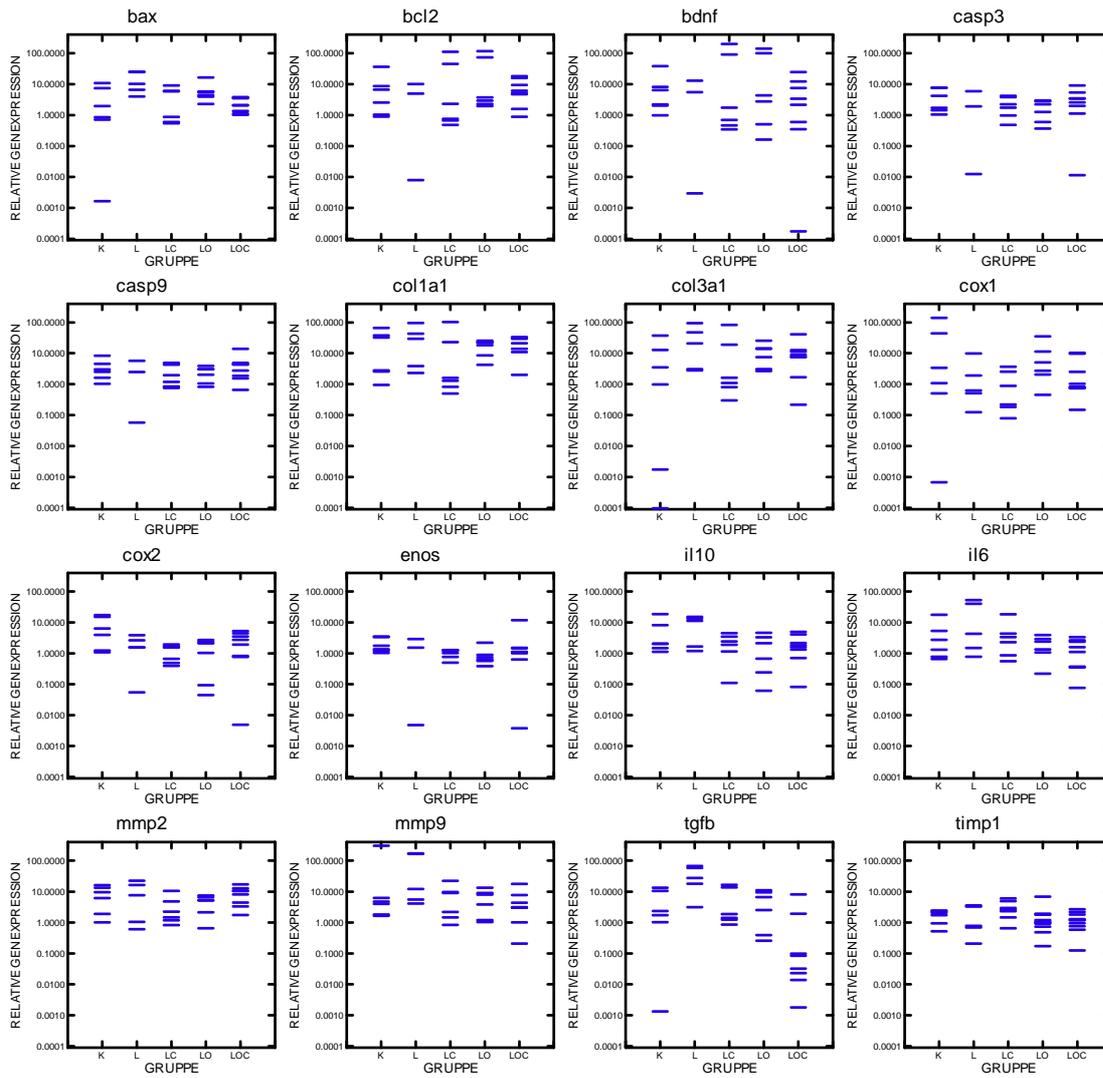


Abbildung 4.1.4.3

Relative Genexpression im Aortagewebe mittels qRT-PCR - SYBR™ green pro Gen und Gruppe. Bereich  $1 \cdot 10^{-4}$  bis  $2 \cdot 10^2$ . Legende siehe Tabelle 4.1.

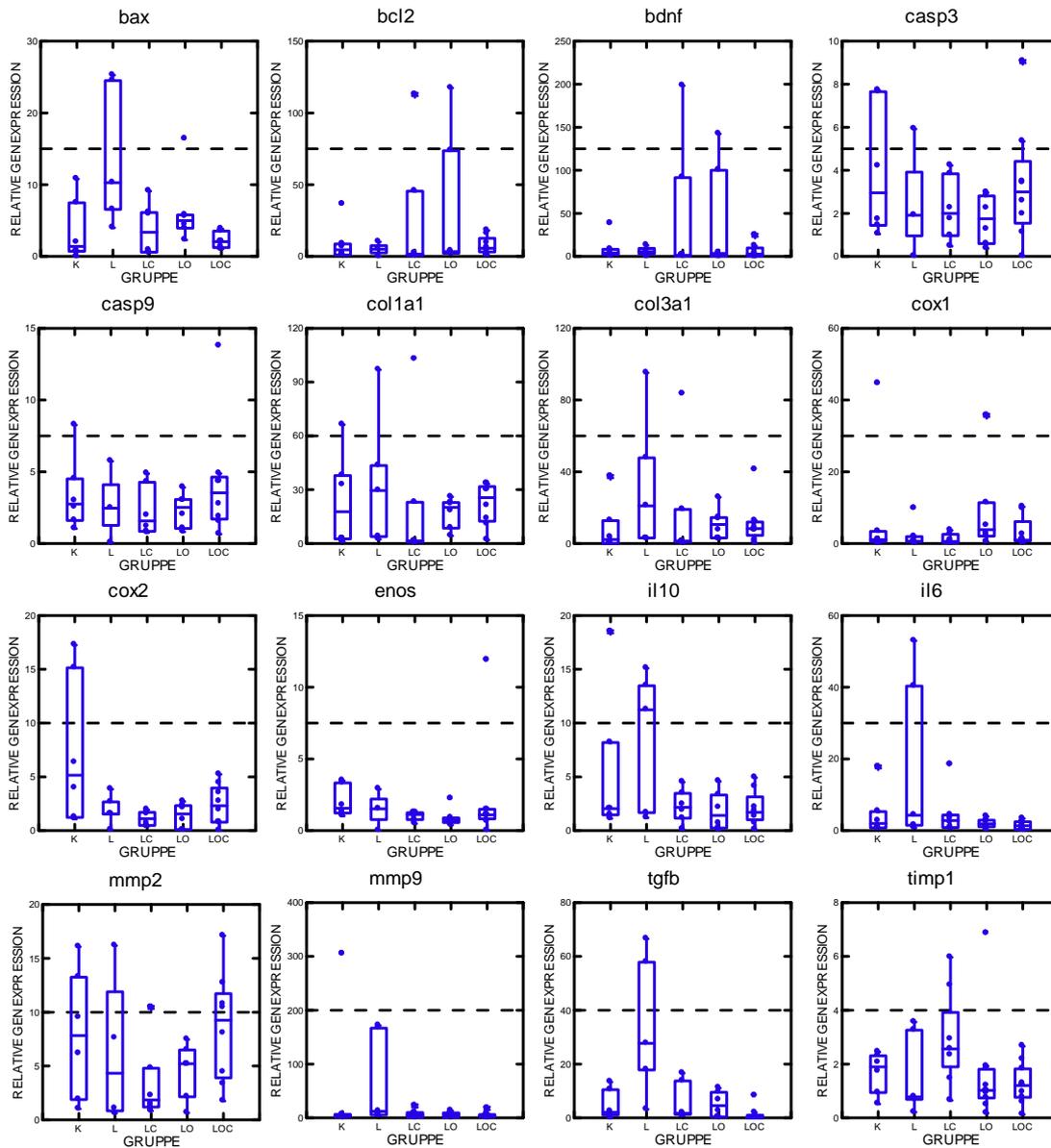
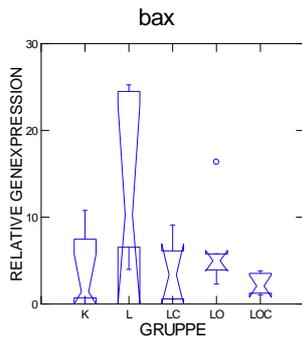
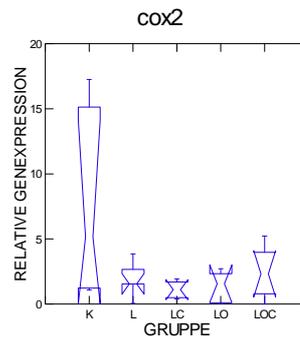


Abbildung 4.1.4.4

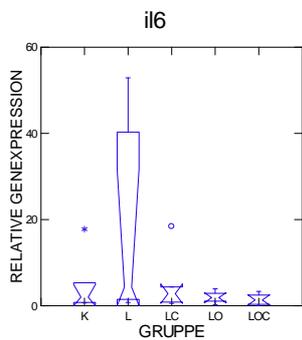
Relative Genexpression im Aortagewebe mittels qRT-PCR - *SYBR*<sup>TM</sup> *green* in Box-Whisker-Plots nach Cleveland. Legende siehe Tabelle 4.1.



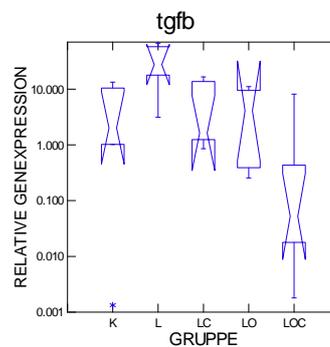
A: BAX in Gruppe L stärker exprimiert als in K, LC, und LOC.



B: COX 2 in Gruppe K stärker exprimiert als in LC und LO.



C: IL 6 in Gruppe L stärker exprimiert als in LOC



D: TGFB 1 in Gruppe L stärker exprimiert als in K, LC, LO und LOC, und in LOC schwächer exprimiert als in L, LC, und LO (logarithmische Darstellung).

#### Abbildung 4.1.4.5 A-D

Im Kruskal-Wallis Test als statistisch signifikant unterschiedlich mittels qRT-PCR - SYBR™ green zwischen den Gruppen ermittelte Genexpressionen im Aortagewebe in Box-Whisker-Plots mit Kerbung nach Tukey. Legende siehe Tabelle 4.1.

---

#### 4.1.5 GENEXPRESSIONSANALYSE IM AORTAGEWEBE MITTELS QRT-PCR – TAQMAN®-SONDEN

Die Genexpression relativ zu *Bestkeeper*-Genen in Aortagewebeproben überstreckt einen Bereich von  $1 \times 10^8$ . Die Verteilung der Daten weist einen Mittelwert von 1.59 (SD 3.6) und einen Median von 0.020 (IQR 0.003 - 1.000) aus. Sie ist somit stark durch hohe Extremwerte verzerrt.

Es ergeben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen K und L, unbehandelte Kontrolle und L-NAME behandelte Tiere.

Nur für die Gene COL1 A1, COL3 A1, IL 6 und MMP 2 werden Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen berechnet und nur für IL 6 sind sie signifikant (ANOVA der Hauptkomponentenanalyse zeigt keine signifikanten Unterschiede).

Im Detail, COL1 A1 war in Gruppe L schwächer exprimiert als in LOC, COL3 A1 in Gruppe L schwächer exprimiert als in LC, LO und LOC, MMP 2 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in K und L, und in LC stärker exprimiert als in L, IL 6 in Gruppe L stärker exprimiert als in K, LC, LO und LOC, und in K schwächer exprimiert als in LC.

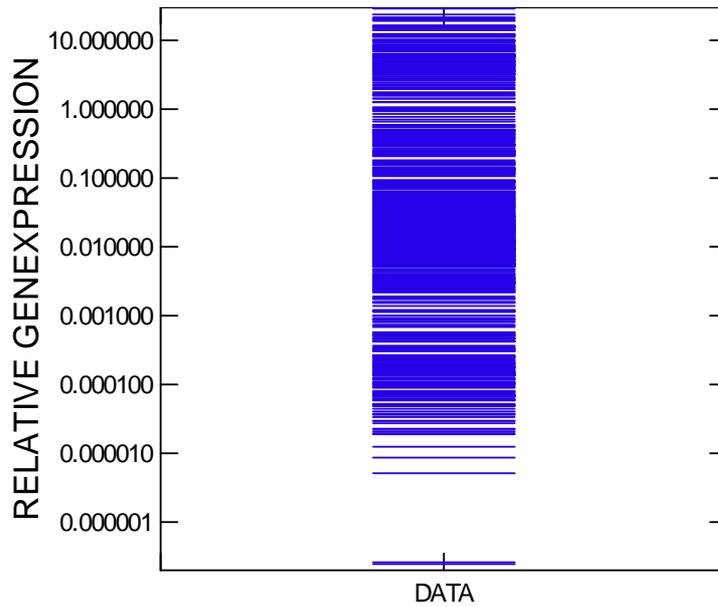


Abbildung 4.1.5.1

Relative Genexpression im Aortagewebe mittels qRT-PCR - *TaqMan*<sup>®</sup>. Gesamtübersicht der erhobenen Daten in logarithmischem Maßstab. Bereich  $2 \cdot 10^{-7}$  bis  $3 \cdot 10^1$ .

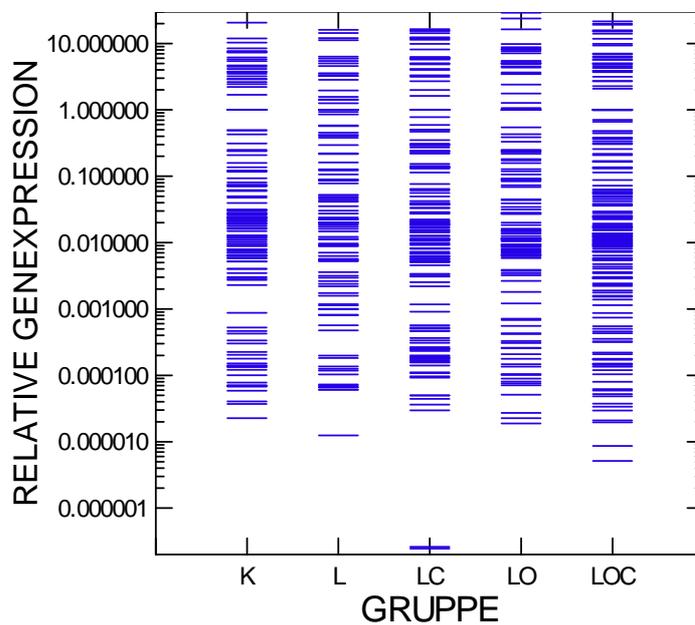


Abbildung 4.1.5.2

Relative Genexpression im Aortagewebe mittels qRT-PCR - *TaqMan*<sup>®</sup>. Gesamtübersicht der erhobenen Daten pro Gruppe in logarithmischem Maßstab. Legende siehe Tabelle 4.1.

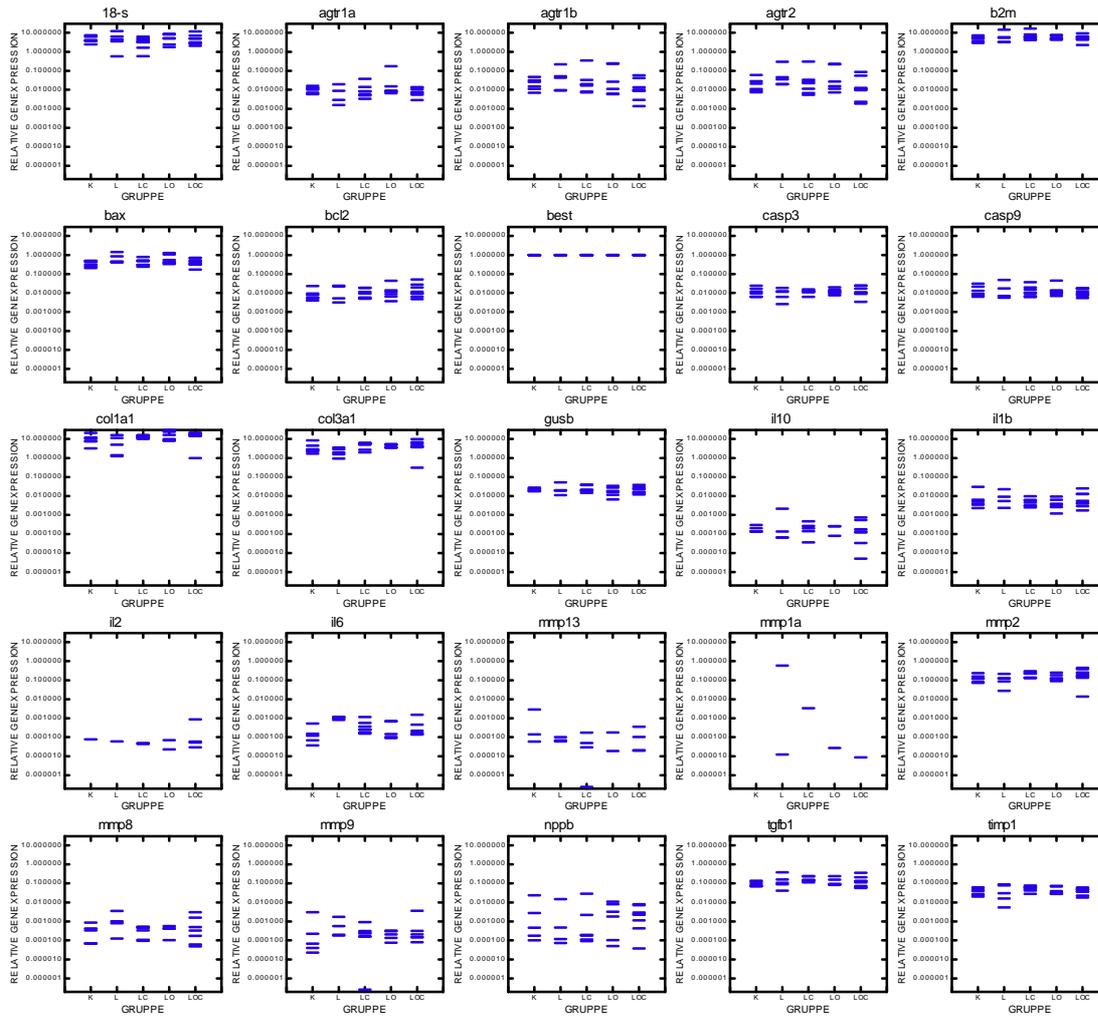


Abbildung 4.1.5.3

Relative Genexpression im Aortagewebe mittels qRT-PCR - *TaqMan*<sup>®</sup> pro Gen und Gruppe. Bereich  $2 \cdot 10^{-7}$  bis  $2,9 \cdot 10^1$ . Legende siehe Tabelle 4.1.

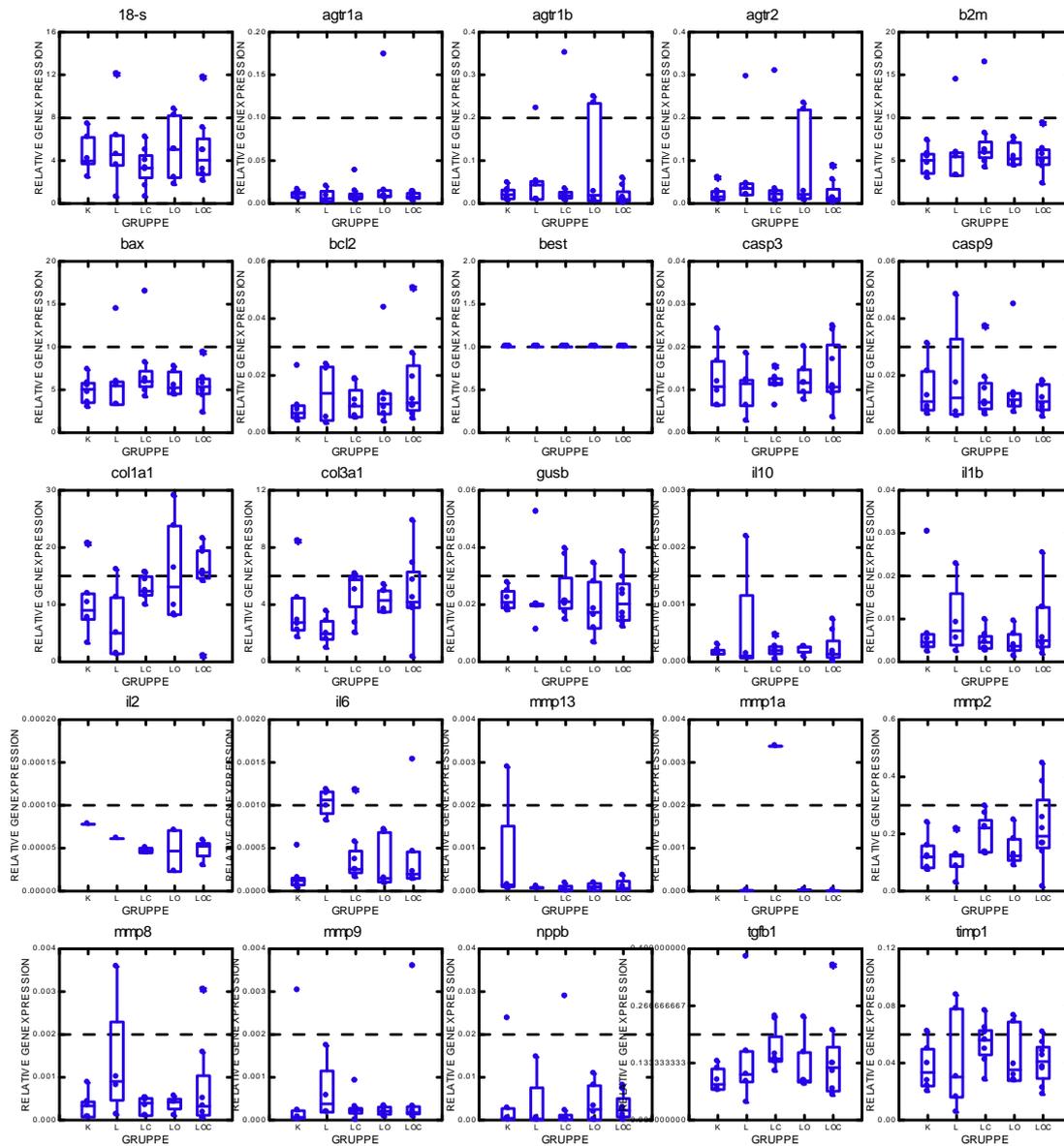
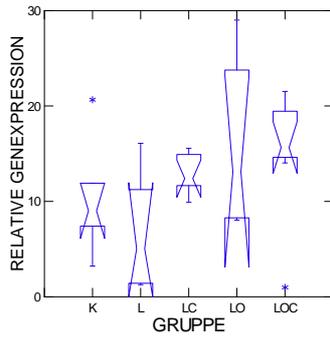
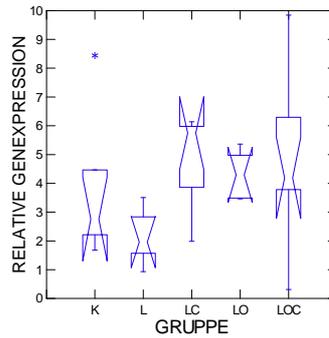


Abbildung 4.1.5.4

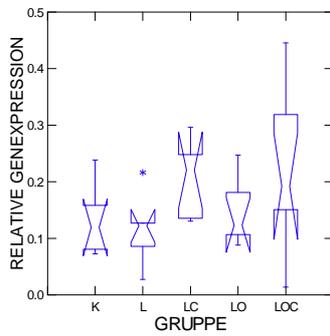
Relative Genexpression im Aortagewebe mittels qRT-PCR - *TaqMan*<sup>®</sup> in Box-Whisker-Plots nach Cleveland. Legende siehe Tabelle 4.1.



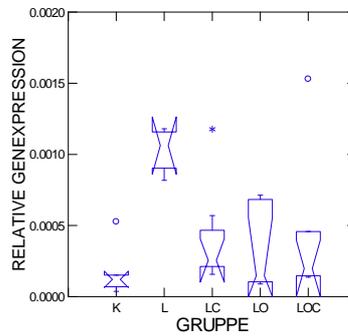
A: COL1 A1 in Gruppe L schwächer exprimiert als in LOC



B: COL3 A1 in Gruppe L schwächer exprimiert als in LC, LO und LOC



C: MMP 2 in Gruppe LOC stärker exprimiert als in K und L, und in LC stärker exprimiert als in L



D: IL 6 in Gruppe L stärker exprimiert als in K, LC, LO und LOC, und in K schwächer exprimiert als in LC

### Abbildung 4.1.5.5 A-D

Im Kruskal-Wallis Test als statistisch signifikant unterschiedlich zwischen Gruppen mittels qRT-PCR - TaqMan<sup>®</sup> ermittelte Genexpressionen im Aortagewebe in Box-Whisker-Plots mit Kerbung nach Tukey. Legende siehe Tabelle 4.1.



## 5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte die Untersuchung der Genexpression in Herz- und Aortagewebe von Ratten mit L-NAME induzierten Hypertonie zum Ziel. Insbesondere die Beeinflussung der Genexpression durch Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors mit Compound 21 war zu beurteilen.

Von besonderem Interesse waren die Gene IL 1, IL 2, IL 6, IL 10, TGFB, COX 1, COX 2, iNOS, eNOS, die den Inflammationsstatus widerspiegeln, COL1 A1, COL3 A1, MMP 1, MMP 2, MMP 9, MMP 13, TIMP 1, die Bildung und Abbau von Kollagen regulieren, BAX, BCL 2, CASP 3, CASP 9, die bei der Apoptose aktiviert sind, und die Expression von BNP, AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R.

### 5.1 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Die Gewebeproben waren Tieren entnommen worden, die entweder zuvor unbehandelt waren (Gruppe K) oder bei denen mit L-NAME eine Hypertoniesituation induziert worden war (Gruppe L) und die zugleich mit dem AT<sub>1</sub>R-Blocker Olmesartan (Gruppe LO), dem selektiven AT<sub>2</sub>R-Agonisten Compound 21 (Gruppe LC) oder Olmesartan und Compound 21 (Gruppe LOC) behandelt worden waren. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels zweier unterschiedlicher qRT-PCR-Verfahren. Die Genexpression wurde mittels Fluoreszenz sowohl mit *SYBR<sup>TM</sup> green* als auch durch *TaqMan<sup>®</sup>*-Sonden analysiert.

Es konnten Genexpressionen in allen Gewebeproben bestimmt werden, jedoch nicht in allen Proben die Expression aller Gene. Die Auswertung ergab in einigen Vergleichen statistisch gesicherte Unterschiede in den Genexpressionen zwischen den Proben der Behandlungsgruppen. Insbesondere zeigten sich nur im qRT-PCR mit *SYBR<sup>TM</sup> green* bei BNP des Herzens und BAX und TGFB 1 der Aorta signifikante Unterschiede zwischen den Genexpressionen der Kontrolltiere und den erhöhten der nicht behandelten L-NAME Tiere, während mit den spezifischeren *TaqMan<sup>®</sup>*-Sonden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genexpressionen dieser Gruppen gefunden wurden. Zumindest numerisch war aber die BAX Expression auch in der *TaqMan<sup>®</sup>* Analyse erhöht.

Die erhöhte BNP Expression kann als Ausdruck der Herzbelastung durch den L-NAME induzierten Hochdruck gesehen werden, während die stärkere BAX und TGFB 1 Expression für vermehrte Apoptose und Inflammation stehen.

Übereinstimmende Ergebnisse gab es für die erhöhte Genexpression von CASP 3 des Herzens in der Gruppe LOC gegenüber der Gruppe L sowie für erhöhte IL 6 Expression der Aorta in der

Gruppe L gegenüber der Gruppe LOC. Demzufolge wäre die Apoptose im Herzgewebe durch AT1R Blockade bei gleichzeitiger Stimulation des AT2R angeregt, während die Inflammation dadurch vermindert wäre.

## 5.2 ERGEBNISDISKUSSION

Die Beobachtungen des zugrundeliegenden Herz-Kreislauf-Versuchs, die in der Publikation Paulis et al. wiedergegeben sind [21], zeigen zwischen den Gruppen Unterschiede in Herz- und Kreislaufparametern.

Wie in der Literatur beschrieben und daher erwartet, wurde durch die Gabe von L-NAME Hochdruck induziert [24, 25, 26] und nachfolgend kam es zu Herzhypertrophie sowie dem Umbau arterieller Blutgefäße. Histologisch wurden die Wirkungen als Kollagenanreicherung dargestellt. Diese Fibrosierung führte zur Zunahme der Gefäßsteifigkeit, die experimentell in einem Anstieg der PWV messbar war. Die Expression sowohl Kollagen-relevanter als auch pro-inflammatorischer Gene, die wahrscheinlich bei der Entwicklung der Folgeerkrankungen mitwirken, sollten davon beeinflusst sein.

Die unterschiedlichen Aufgaben von Herz und Aorta spiegeln sich auch in den unterschiedlichen Expressionsmustern gleicher Gene wider. Während das Herz aktiv eine große Pumpleistung durch entsprechende Stoffwechselaktivität realisiert, reagiert die Aorta passiv auf die unterschiedlichen Druckverhältnisse bei kleiner Stoffwechselaktivität.

---

### 5.2.1 BNP, AT1R UND AT2R

Wie bereits erwähnt, war die mRNA-Expression von BNP im Herzgewebe in der Gruppe L gegenüber der Kontrollgruppe K aber auch gegenüber den Behandlungsgruppen signifikant erhöht, was als Ausdruck der Herzbelastung durch den L-NAME induzierten Hochdruck gesehen werden kann. Unter OLME als auch unter C21 sowie deren Kombination bestand jedoch kein Unterschied zu der Kontrollgruppe in der mRNA-Expression von BNP, so dass sich sowohl eine Wirkung von OLME als auch von C21 auf die mRNA-Expression von BNP belegen lässt.

Da C21 im Unterschied zu OLME im Kreislaufversuch den Blutdruck nicht beeinflusst hat, kann für die normalisierende Wirkung von C21 auf die mRNA-Expression von BNP wegen dessen fehlender antihypertensiver Wirkung eine direkte Stimulation des AT2R angenommen werden.

Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen von Suo et al. überein, die zeigten, dass die BNP-mRNA Konzentration bei Wistar-Ratten durch die Gabe von L-NAME signifikant anstieg und unter AT1R-Blockade wieder auf das Niveau der Kontrolltiere abfiel [28]. Ebenfalls erhöht war

die BNP-Konzentration unter den inflammatorischen Bedingungen einer Endomyositis bei Ratten [27]. Durch Gabe von OLME wurde die Expression auch hier auf Kontrolltierniveau gesenkt.

Die Arbeiten weisen darauf hin, dass nicht nur erhöhter Druck sondern auch inflammatorische Prozesse die BNP Expression anregen können und somit die anti-inflammatorische Wirkung von C21 die Unterdrückung der Expression von BNP auf mRNA-Ebene unter L-NAME erklären kann. Diese These wird durch die Arbeit von Zhang et al. gestützt [29]. Obwohl der Blutdruck von Ratten unter L-NAME anstieg, zeigte sich weder nach 4 noch nach 8 Wochen eine verstärkte Expression von BNP. Blutdruckerhöhung allein ohne inflammatorische Komponente scheint somit nicht allein zur Anregung der BNP Expression auszureichen.

Die mRNA-Expression von AT1R und AT2R im Herzgewebe war durch keinen der pharmakologischen Eingriffe statistisch signifikant verändert. Während die durchweg stärkere mRNA-Expression von AT1R über alle Gruppen gleich war, war die mRNA-Expression des AT2R numerisch am geringsten unter L-NAME allein und am stärksten unter C21 in Gruppe LC. In den OLME-Gruppen LO und LOC lag sie dagegen auf Kontrolltierniveau. Dieser Trend spricht für eine C21 induzierbare AT2R Expression bei L-NAME Hypertonie.

---

## 5.2.2 INFLAMMATION - INTERLEUKINE - IL 1, IL 2, IL 6, IL 10, UND TGFB 1

Aorten der LOC-Gruppe wiesen eine signifikant reduzierte IL 6 Expression gegenüber der Gruppe L aus, was durch die *TaqMan*<sup>®</sup> Analyse bestätigt wurde. Eine numerisch geringere Expression war bereits in den Gruppen LO und LC zu beobachten. Ähnlich der IL 6 Expression war TGFB 1 in der L Gruppe erhöht und die Erhöhung in den Gruppen LC und LO durch C21 und Olmesartan und sogar numerisch stärker in der Kombinationsgruppe LOC abgeschwächt, was durch die *TaqMan*<sup>®</sup> Analyse weder widerlegt noch bestätigt werden konnte.

Die Befunde können dahingehend interpretiert werden, dass Stimulation des AT2R durch C21 und Hemmung des AT1R durch einen AT1R-Blocker anti-inflammatorisch wirken.

Inflammatorische Prozesse sind Komponenten der Pathophysiologie der Hypertonie. Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem tragen zur Vermittlung der inflammatorischen Aktionen bei. Da das angeborene Immunsystem die unmittelbaren Reaktionen des Körpers auf Pathogene und Gewebeschäden darstellt [57, 58], ist auch anzunehmen, dass es Teil des Prozesses ist, der zu Hypertonie führt. Das Endothel und auch ROS sind Teil dieses Systems. Wie bereits erwähnt kann übermäßige Produktion an ROS ebenso zur Entwicklung der Hypertonie

beitragen wie eine gestörte endotheliale Funktion. Die andere Seite des Immunsystems stellt das erworbene Immunsystem dar, das durch antigen-spezifische Reize die Immunreaktion auslöst. Die Vermutung einer Verwicklung dieses Teil des Immunsystems in die Pathogenese der Hypertonie entstand durch den Nachweis T-Zell vermittelter Reaktionen bei Hypertonie [57, 58].

Wie zuvor erwähnt, vermittelt ANG II über den AT1R eine Vasokonstriktion und somit auch eine Blutdruckerhöhung. Über den gleichen Rezeptor wirkt ANG II auch pro-inflammatorisch, indem es Transkriptionsfaktoren aktiviert, wodurch die Genexpression pro-inflammatorischen Zytokinen erhöht wird.

Wie genau die Inflammationsreaktion hervorgerufen wird, ist jedoch unklar. Verstärkter mechanischer und oxidativer Stress sollen daran beteiligt sein. Die Verstärkung der Inflammationsreaktion könnte die Plasmakonzentration inflammatorischer Zytokine erhöhen. Klinische Studien beobachteten höhere Plasmakonzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL 6 und IL 1 $\beta$ , bei hypertensiven Patienten als bei normotensiven Personen und man folgerte, dass Inflammation und Hypertonie zusammenhängen [59]. Ob jedoch Inflammation der Hypertonie vorausgeht oder ihr folgt, ist weiterhin unklar. Prähypertensive Personen haben höhere Blutwerte an Inflammationsmarkern. Da auch Personen mit höheren Blutwerten an Inflammationsmarkern ein höheres Risiko an Hypertonie zu erkranken haben, ließe sich im Umkehrschluss folgern, dass Hypertonie erst zu Inflammationsreaktionen führt [60, 22]. Hypertonie könnte durch den erhöhten mechanischen Stress zu Endothelschäden und damit zu endothelialer Dysfunktion führen, wodurch schließlich der periphere Gefäßwiderstand erhöht wird und somit auch die Hypertonie weiter verstärkt wird [42].

Unter der Annahme, dass ANG II über den AT1R pro-inflammatorische Wirkungen vermittelt, war es daher von Interesse zu erfahren, wie sich C21 auf die Inflammation bei Hypertonie auswirkt. Zwei tierexperimentelle Studien, die die Wirkung von C21 auf die Inflammation untersuchten, konnten beide eine Reduzierung der mRNA Expression pro-inflammatorischer Zytokine nachweisen. In der Studie von Kaschina et al. [93] wurde in einem Ratten-Herzinfarktmodell die Wirkung von C21 auf die Funktion des Herzens geprüft. Unter anderem wurde die mRNA Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL 6, IL 1 $\beta$  und IL 2 durch den Infarkt gesteigert gefunden. Durch C21 wurden nicht nur die Plasmakonzentrationen der Zytokine, sondern auch die Genexpression deutlich verringert. Zu erwähnen ist, dass dieses Experiment bei normotensiven Ratten durchgeführt wurde und somit die Veränderungen der Genexpression nicht auf Veränderungen der Hämodynamik zurückzuführen sind.

Die Wirkung von C21 bei Inflammation wurde in einem weiteren Versuch von Rompe et al. untersucht [95]. Durch subkutane Injektion von Bleomycin wurde eine Entzündungsreaktion hervorgerufen, in deren Folge es zu einer deutlichen Steigerung der IL 6 mRNA Expression kam, die wiederum durch die gleichzeitige Gabe von C21 signifikant geringer ausfiel. Zumindest hinsichtlich der Steigerung der IL 6 mRNA Expression in der Aorta im L-NAME Modell und deren Reduktion durch C21 bestätigt die vorliegende Arbeit diese Beobachtungen.

Wie erwähnt, werden erhöhte Blutwerte an IL 6 mit Hypertonie in Verbindung gebracht [128] und konnte in einer anderen Studie beobachtet werden, dass durch die Gabe eines AT1R-Blockers mit dem Blutdruck auch die Plasmawerte an IL 6 sanken [129].

Betrachtet man die in den verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen erhobenen Ergebnisse, scheint es eine Verbindung zwischen der Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Hypertonie zu geben. Zu berücksichtigen ist aber, dass erhöhte Blutwerte und Protein Expressionen nicht immer mit signifikant gesteigerten Genexpressionen einhergehen müssen. So gibt es Studien, die keine Korrelation zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen und Bluthochdruck gefunden haben. Als Beispiel sei eine Hypertoniestudie mit immun-defizienten Mäusen genannt, bei denen durch die fehlende Immunreaktion sowohl die Blutdrucksteigerung als auch der Nierenschaden zwar abgeschwächt waren, sich dies aber nicht in einer geringeren Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL 6 und IL 1 $\beta$ , widerspiegelte [42].

In einer Querschnittstudie von Barbaro et al. [59] wurden Patienten in drei Gruppen eingeteilt, je nachdem ob sie unter therapierefraktärer Hypertonie litten, sie hypertensiv oder normotensiv waren. Hierbei wurde beobachtet, dass die Plasmakonzentrationen sowohl des pro-inflammatorischen IL 1 $\beta$  als auch des anti-inflammatorischen Zytokins IL 10 unter antihypertensiver Therapie am höchsten in der therapierefraktären Gruppe waren, es jedoch keine Unterschiede für IL 6 zwischen den Gruppen gab. Da Aldosteron über den Mineralkortikoidrezeptor eine Steigerung der IL 6 Konzentration bewirkt, erklärt der hohe Anteil der therapierefraktären Gruppe, der mit dem Aldosteronantagonisten Spironolacton behandelt wurde, den fehlenden Anstieg an IL 6, jedoch nicht den fehlenden Unterschied zwischen der normotensiven Gruppe und der Hypertoniegruppe, mit einem geringen Anteil Spironolacton-behandelter Patienten.

Eine weitere Erklärung für den mangelnden Unterschied der IL 6 Werte zwischen den Gruppen sollte darin liegen, dass IL 6 die IL 1 $\beta$  Konzentrationen durch Freisetzung von Antagonisten reguliert und sie somit absenkt. Der Anstieg von IL 1 $\beta$  und die damit erhöhte PWV, die in der Studie von Barbaro et al. [59] gefunden worden war, könnte durch die IL 1 $\beta$  vermittelte

Vasokonstriktion erklärt werden [42]. Andererseits wird berichtet, dass durch die Stimulation des IL 1 Rezeptors, die IL 6 Produktion angeregt wurde [130].

Viel et al. [131] untersuchten ebenfalls hypertensive Ratten unter dem Aspekt, dass Inflamationsreaktionen bei Hypertonie durch das Immunsystem vermittelt werden. Dabei wurde das Chromosom 2, das neben dem AT1R auch pro-inflammatorische Zytokine kodiert, aus normotensiven Ratten in genetisch hypertensive Ratten intergrossiert. In den konsomischen Ratten mit intergrossiertem Chromosom 2 wurde eine gesteigerte Produktion anti-inflammatorischer Zytokine aus Lymphozyten, wie IL 10 und TGFB 1, gemessen. In den genetisch hypertensiven Ratten war die Produktion an IL 10 und TGFB 1 dagegen gering, während die Produktion an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL 1 $\beta$ , IL 2 und IL 6, deutlich im Vergleich mit der anderen Gruppe erhöht war. Durch diese Studie wurde auch angedeutet, dass eine genetische Prädisposition die Entwicklung und das Verhalten bei Hypertonie beeinflusst [56].

Insgesamt betrachtet ergibt sich ein heterogenes Bild hinsichtlich der Beeinflussung der Inflamationsmarker der IL-Reihe, in das sich der Befund dieser Arbeit, dass Stimulation des AT2R durch C21 und Hemmung des AT1R durch einen AT1R-Blocker anti-inflammatorisch wirken, einfügt.

### **5.2.3 PROLIFERATION - KOLLAGENUMBAU - COL1 A1, COL3 A1, MMP 1, MMP 2, MMP 9, MMP 13 UND TIMP 1**

Die Genexpressionen von COL1 A1, COL3 A1 und TIMP 1 in Herzgewebe waren in der Gruppe LOC stärker exprimiert als in der Gruppe LO, ansonsten nicht unterschiedlich, was sich in der *TaqMan*<sup>®</sup> Analyse nicht widerspiegelte.

In Aortagewebe ergaben sich dagegen in der *TaqMan*<sup>®</sup> Analyse Tendenzen zu geringerer Expression von COL1 A1 und COL3 A1 in der Gruppe L als in Gruppe LOC, die sich in der *SYBR*<sup>™</sup> *green* Analyse nicht zeigten.

Demzufolge war der Umbau von Kollagen im Herzgewebe nur in Kombination von AT1R-Blockade und AT2R-Aktivierung durch C21 relativ stärker aktiviert als in den anderen Gruppen. Die Befunde im Aortagewebe lassen sich ähnlich interpretieren, der in der L-NAME Gruppe ohne Behandlung geringere Umbau wird unter der Kombination aktiviert.

Die Genexpression von MMP 2 in Aortagewebe war gemäß *TaqMan*<sup>®</sup> Analyse in den Gruppen LC und LOC stärker exprimiert als in Gruppe L, was in der *SYBR*<sup>™</sup> *green* Analyse keine Entsprechung fand. Numerisch höhere MMP 8 mit *TaqMan*<sup>®</sup> Analyse und MMP 9 Expressionen mit *SYBR*<sup>™</sup> *green* -Analyse und *TaqMan*<sup>®</sup> Analyse in Aortagewebe zeigten sich in der

Gruppe L, die sich möglicherweise infolge der Behandlung in den Gruppen LC, LO und LOC nicht von denen der Kontrolltiere in Gruppe K unterschieden. Eine *SYBR™ green* Analyse von MMP 8 wurde nicht erstellt.

Die Folgeschäden der Hypertonie an Gefäßen und Herzen als auch die Gewebeumstrukturierung sind nicht nur durch inflammatorische Prozesse zu erklären. Die Abnahme der Gefäßelastizität und das *Remodeling* sind durch Fibrose und Hypertrophie der glatten Muskulatur bedingt. Fibrose entsteht durch vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix und hier vor allem Kollagen. Am Umbau der Matrix sind verschiedene Enzyme beteiligt. Hierzu gehören MMP und deren Inhibitoren, TIMP. Bei den fibrotischen Umbauprozessen soll es zu einem Ungleichgewicht zwischen diesen Enzymgruppen kommen.

In der Annahme, dass RAS an den *Remodeling* Prozessen beteiligt ist, wurde der Einfluss von C21 auf die Hypertonie-bedingte Gewebeumstrukturierung untersucht.

In verschiedenen Arbeiten konnte eine durch die Blockade des AT1R bewirkte anti-fibrotische Wirkung beobachtet werden. Diese Wirkung schien dabei unabhängig von ihrer blutdrucksenkenden Eigenschaft zu sein und führte zur Hypothese, dass die bei Blockade des AT1R gemessenen anti-proliferativen und anti-fibrotischen Effekte zumindest zum Teil durch die gesteigerte Stimulation des AT2R vermittelt wurden [84, 132]. Diese Hypothese wurde durch weitere Untersuchungen bekräftigt. In einem Myokardinfarkt-Modell verminderte C21 die gesteigerte Genexpression von MMP 9 als auch deren Protein Expression. Ein weiteres Enzym dieser Gruppe, MMP2, zeigte keine Veränderung der Genexpression, jedoch war deren Protein Expression erhöht. Im Unterschied zur Beeinflussung von MMP 9 führte die Gabe von C21 zu keiner Veränderung der MMP 2 Expression. Die vorher erwähnte Vermutung, dass Fibrose durch ein Ungleichgewicht zwischen MMP und TIMP bedingt ist, wurde dadurch validiert, dass nach dem Myokardinfarkt die Protein Expression an TIMP 1, dem Inhibitor von MMP 9, erniedrigt war. Durch die Gabe von C21 wurde der Abfall der TIMP 1 Protein Expression deutlich reduziert, wodurch es zu einem besseren Verhältnis von MMP 9 und TIMP 1 kam. Zu erwähnen ist hier, dass der Abfall bzw. der Anstieg der TIMP 1 Protein Expression nicht anhand der mRNA Expression verglichen wurde [107]. Der Anstieg der MMP Aktivität konnte in einer weiteren C21 Studie nicht bestätigt werden [103]. Für diese wie die zuvor erwähnten Experimente bestand die Hypothese, dass durch Stimulation des AT2R mittels C21 die durch Hypertonie entstandenen Gewebsschäden abgeschwächt würden. Ähnlich den Ergebnissen der Studie von Paulis et al. [21], die zeigten, dass durch C21 als auch in Kombination mit einem AT1R-

Blocker sich die erhöhte Kollagenablagerung in der extrazellulären Matrix verringert und sich dies in einer reduzierten Gefäßsteifigkeit widerspiegelt.

Die histologisch nachgewiesene geringere Ablagerung von Kollagen konnte weder in einer Studie an SHR [103] noch durch die Genexpressionsergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Eine erhöhte Genexpression konnte weder für MMP 9 noch für MMP 2 nachgewiesen werden. Eher könnte man C21 eine Steigerung von MMP 2 zusprechen, wie in der *TaqMan*<sup>®</sup> Analyse der Aorta gefunden. Betrachtet man die Ergebnisse der Studien, die C21 verwendeten, sprechen diese gegen die Hypothese, dass die Reduzierung der Kollagenablagerung durch eine gesteigerte MMP Aktivität bedingt ist. Man könnte eher vermuten, dass die inhibitorische Aktivität von TIMP auf MMP gesteigert wird, wodurch dann der Umbau der Matrix verhindert würde. Diese These wird durch eine Studie an Patienten mit Hypertonie unterstützt, bei denen bei erhöhter Gefäßsteifigkeit erniedrigte Werte an MMP 9 und MMP 2 gefunden wurden [133]. Da in dieser Studie TIMP nicht bestimmt wurde, lässt sich nicht beurteilen, ob dies auf einer erhöhten TIMP Aktivität basierte.

Dass es zu geänderten MMP und TIMP Gleichgewichten kommt, wurde auch durch eine Studie von Varo et al. [70] bekräftigt. Sie zeigten, dass bei SHR die Kollagenase Aktivität deutlich verringert und die Genexpression des Inhibitors TIMP 1 deutlich erhöht war. Durch Blockade des AT1R mittels *Losartan* konnten diese Veränderungen wieder rückgängig gemacht werden, so dass TIMP 1 mRNA sich verringerte und die Kollagenase Aktivität wieder zunahm. Jedoch wurde letztere nicht anhand der MMP Expression ermittelt sondern im Blut gemessen, wodurch nicht nachvollzogen werden kann, wie sich diese Veränderungen der Aktivität auf die Expression auswirken. Auch dieses Ergebnis unterstützt die These, dass TIMP Expression unter fibrotischen Bedingungen gesteigert wird und dadurch der Abbau der Matrix durch MMP inhibiert wird.

Anderen Studienansätze lassen sich hingegen mit einer anderen Hypothese verbinden, der zufolge erhöhte MMP Aktivität vermehrt extrazelluläre Matrix abbaut, wodurch wiederum die Zellproliferation und somit auch die Kollagenproduktion angeregt wird, was schließlich zur Fibrose führt. Tritt also vaskulärer Schaden auf, muss die extrazelluläre Matrix abgebaut und wieder neu aufgebaut werden [16, 74]. Dies ließ sich anhand von lokal erhöhter Expression an MMP in erkrankten Gefäßen nachvollziehen [75].

Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung gelangte man in einer Studie von Yasmin et al. [76], in der Plasmawerte an MMP 9 und MMP 2 bei Patienten mit isolierter systolischer Hypertonie deutlich

gegenüber denen von normotensiven Personen erhöht waren, während die Blutkonzentrationen von TIMP gleich waren. Die Beobachtung, dass sich die Plasmawerte von MMP ohne Änderung von TIMP änderten, lässt sich vielleicht darauf zurückführen, dass die Aktivität von MMP durch pro-inflammatorische Zytokine, wie IL 1 $\beta$  und IL 6 gesteigert wurde [74, 76], und nicht ausschließlich durch erniedrigte TIMP Aktivität. In einer Studie an Patienten mit Herzversagen wurden wiederum deutlich erhöhte MMP 2 und MMP 9 Plasmawerte und erhöhte Werte an TIMP 1 gefunden.

Aus den unterschiedlichen Ergebnissen lässt sich folgern, dass das Zusammenspiel der MMP und ihrer TIMP Inhibitoren komplex ist und weiterer Klärung bedarf, zumal der Art der Belastung als auch ihrer Dauer eine wichtige Rolle bei der Aktivierung dieser Enzyme zukommt.

---

#### 5.2.4 INFLAMMATION - CYCLOOXYGENASEN COX 1 UND COX 2

Die über *SYBR<sup>TM</sup> green* Analyse gemessene Expression von COX 2 war im Aortengewebe der Gruppe K signifikant stärker als in den Gruppen LC und LO, und numerisch auch gegenüber LOC. Die Expression von COX 1 war unverändert. COX 1 und COX 2 wurden mit *TaqMan<sup>®</sup>*-Sonden nicht gemessen. Die stärkere Expression von COX 2 in den Kontrolltieren widerspricht der These, dass diese Cyclooxygenase unter Inflammation stärker exprimiert wird.

Der derzeitige Stand der Diskussion sieht endotheliale Dysfunktion und oxidativen Stress als an der Entstehung der Hypertonie als auch deren Folgeschäden beteiligt. Oxidativer Stress, der durch eine Überproduktion an ROS verursacht wird, ist an Prozessen wie vaskulärer Inflammation, *Remodeling* und gesteigerter Reagibilität auf vasokonstriktorische Stimuli beteiligt [46]. Prostaglandine, deren Bildung durch COX katalysiert wird, haben Einfluss auf den Gefäßtonus. COX 1 wird ubiquitär konstitutiv exprimiert und bewirkt die Bildung von Prostaglandinen unter physiologischen Bedingungen. COX 2 hingegen wird nur gering und unter pathologischen Bedingungen wie der Inflammation exprimiert [46, 48, 134]. COX katalysierte Produkte wirken nicht nur auf den Gefäßtonus, sondern haben auch Einfluss auf das *Remodeling* [46]. Oxidativer Stress und Produkte der COX 1 und COX 2 verschlechtern wechselseitig die Gefäßfunktion.

Die vasodilatatorische Wirkung von NO, das im Endothel durch eNOS erzeugt wird, könnte durch die vasokonstriktorischen ROS und Prostaglandine beeinträchtigt werden. In vivo Studien untersuchten, wie COX an der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion, dem oxidativen Stress und der Hypertonie beteiligt ist.

Virdis et al. [134] untersuchten die Beteiligung von COX an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion. Er beobachtete, dass unter ANG II die Gen-Expression von COX 1 vermehrt und

die von COX 2 vermindert war. Ob die gesteigerte Expression jedoch auf direkte Stimulation der COX 1 Bildung durch ANG II zurückzuführen ist oder durch Abschwächung der COX 2 Wirkung, blieb unklar. Zudem widerspricht das Ergebnis der Annahme, dass COX 2 unter pathologischen Bedingungen exprimiert wird.

In einer anderen Studie, in der durch ANG II Hypertonie induziert wurde, wurde der Einfluss von Antioxidantien auf oxidativen Stress und endotheliale Dysfunktion untersucht [11]. Unter ANG II war die Protein-Expression von COX 1 erhöht, jedoch war im Unterschied zur Studie von Viridis et al. [134] auch die Protein-Expression von COX 2 erhöht. Durch die Gabe von Antioxidantien wurde nicht nur die vaskuläre Dysfunktion abgeschwächt, sondern reduzierte sich auch die Protein-Expression von COX 1 und COX 2.

Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie mit ANG II induzierter Hypertonie nicht bestätigt werden. Man beobachtete, dass oxidativer Stress die COX 2 Expression nicht beeinflusste. Auch die Gabe von Antioxidantien führte zu keiner Abnahme der COX 2 Expression [48].

In der Annahme, dass COX nicht nur einen indirekten Einfluss auf Hypertonie haben, sondern direkt an der Blutdruckerhöhung beteiligt sind, untersuchte man, ob die Inhibierung von COX eine Wirkung auf den Blutdruck hat. Die Ergebnisse der Studien sind jedoch nicht eindeutig. Sowohl selektive als auch nicht-selektive COX 1 Hemmung im ANG II-abhängigen Goldblatt Hypertonie Modell reduziert den erhöhten Blutdruck. Da die Inhibierung von COX 2 allein zu keiner Veränderung des Blutdrucks führte [135], wurde die antihypertensive Wirkung der COX 1 Hemmung zugeschrieben. Im Gegensatz dazu beobachtete man bei Mäusen mit ANG II induzierter Hypertonie, dass die Inhibierung von COX 2 zu einem deutlichen Anstieg des Blutdrucks führte. Inhibierung der COX 1 führte zu einem deutlich geringeren Blutdruckanstieg durch ANG II und ähnelte dem der Kontrollgruppe [136]. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass, obwohl COX 1 und COX 2 die gleiche Reaktion katalysieren, jedoch die Produkte unterschiedliche Reaktionen auslösen. Daraus könnte man schließen, dass die Produkte von COX 2 einen positiven Einfluss auf den Blutdruck haben und die durch COX 1 entstandenen Produkte eher der Aufrechterhaltung der Hypertonie dienen. Jedoch stehen diese Ergebnisse in Kontrast zu den Beobachtungen, die durch Martinez-Revelles et al. an ANG II-infundierten Mäusen gemacht wurden [49]. Auch hier wurde durch ANG II Hypertonie induziert, jedoch führten COX 2 Inhibierungen zu Absenkungen des Blutdrucks. Zusätzlich wurde in der Arbeit die Gen-Expression von COX 1 und COX 2 bestimmt und gefunden, dass ANG II zwar die Genexpression von COX 2 erhöhte, jedoch nicht die von COX 1. In der gleichen Publikation

wurde die Genexpression in SHR berichtet; sowohl die Genexpression von COX 1 als auch die von COX 2 waren erhöht [49].

Der Einfluss von Antioxidantien wurde ebenfalls von Martinez-Revelles et al. untersucht [49]. Auch hier erhielt man unterschiedliche Ergebnisse, da man durch die Gabe von Antioxidantien bei SHR die Genexpression sowohl von COX 1 als auch von COX 2 reduziert wurde, bei ANG II induzierter Hypertonie in Mäusen hingegen wurde nur die COX 2 Expression reduziert. Umgekehrt konnte durch Inhibierung von COX 2 in beiden Hypertoniemodellen der oxidative Stress verringert werden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen die Funktion von COX 1 und COX 2 beim Hypertoniegeschehen nicht eindeutig beschreiben. Die Befunde sind stark vom Hypertoniemodell beeinflusst und hier auch von dem untersuchten Gefäßabschnitt abhängig. Insofern ordnet sich die in dieser Arbeit gesehene gegenüber Kontrolltieren geringere COX 2 Expression in unbehandelten L-NAME Tieren mit und ohne AT1R-Blockade oder AT2R-Stimulation durch C21, oder deren Kombination, in die Reihe kontroverser Befunde ein.

---

### 5.2.5 INFLAMMATION - NO SYNTHASEN INOS UND ENOS

Die mittels *SYBR<sup>TM</sup> green* gemessene Genexpression von eNOS der Gruppe L war gegenüber allen Gruppen numerisch am geringsten, in den Behandlungsgruppen mit Olmesartan, Gruppen LO und LOC, am höchsten und damit sogar signifikant höher als in Gruppe L. Die iNOS Genexpression war nicht verändert. In der *TaqMan<sup>®</sup>* Analyse wurden eNOS und iNOS nicht erfasst. Den Ergebnissen zufolge kann die durch L-NAME unterdrückte eNOS Expression durch AT1R-Blockade aber auch AT2R-Stimulation normalisiert werden.

Wie zuvor schon erwähnt kommt der reduzierten Verfügbarkeit von NO in der Entwicklung und Aufrechterhaltung des oxidativen Stresses und der endothelialen Dysfunktion Bedeutung zu. Jedoch scheint die Funktionalität der eNOS Expression unter pathologischen Bedingungen nicht eindeutig zu sein. In einer Studie von Leo et al. [51] untersuchte man die Wirkung auf die eNOS Expression in Ratten mit L-NAME induzierter endothelialer Dysfunktion und Hypertonie. Wie auch in der Studie von Paulis et al. [21] führte L-NAME zu einer Erhöhung des Blutdrucks. Dieser Anstieg ging jedoch nicht mit veränderter eNOS mRNA Expression einher. Gleichzeitig waren jedoch die Nitrit Werte sowohl in der untersuchten Aorta als auch der Karotis erhöht. Eine Erklärung dafür könnte die erhöhte NO Produktion durch iNOS sein, da L-NAME vorwiegend eNOS inhibiert und nur geringfügig iNOS beeinflusst. Diese Vermutung könnte dadurch gestützt werden, dass die iNOS mRNA Expression sowohl in der Aorta als auch Karotis deutlich erhöht

war. Die Protein Expression von eNOS, gemessen in der Aorta von SHR, zeigte keinen Unterschied zu Kontrolltieren in einer Studie von Bauersachs et al. [137]. In derselben Studie konnte man jedoch im Herzen derselben SHR eine deutlich erniedrigte Protein Expression beobachten. Die Befunde der Protein Expression spiegeln sich in der mRNA Expression wider. Aus diesen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass die Expression von eNOS in verschiedenen Geweben unterschiedlich geregelt wird (neben Hypertonie auch erhöhter oxidativer Stress in SHR). Im Gegensatz dazu beobachtete man in einer Studie von Kobayashi et al. [138], in der die Wirkung von Amlodipin auf die NO-Genexpression bei L-NAME induzierter Hypertonie untersucht wurde, dass durch L-NAME die eNOS mRNA Expression bei erhöhtem Blutdruck deutlich verringert war. In der L-NAME Gruppe, die mit Amlodipin behandelt wurde, sank nicht nur der Blutdruck, sondern zeigte sich im linken Ventrikel eine signifikant erhöhte eNOS Genexpression. Eine ähnliche Beobachtung machten Vaziri et al. [55]. Blei-induzierte Hypertonie in Ratten war mit deutlich erhöhter Proteinexpression von eNOS als auch iNOS in der Aorta verbunden. Diese Steigerung wurde unter Gabe des Radikalfängers *Tempol* nicht gesehen. Das deutet darauf hin, dass es durch die erhöhte Produktion von ROS durch Blei zur Inaktivierung von NO kam und somit zu erhöhtem oxidativen Stress und zur Blutdrucksteigerung.

Anhand dieser Studien wird deutlich, dass oxidativer Stress und Hypertonie Prozesse sind, die miteinander in Verbindung stehen, jedoch nicht klar zu erkennen ist, wie sie sich gegenseitig beeinflussen. Zumindest die durch L-NAME unterdrückte eNOS Expression kann durch AT1R-Blockade aber auch AT2R-Stimulation mit C21 normalisiert werden.

---

### 5.2.6 APOPTOSE - BAX, BCL 2, CASP 3 UND CASP 9

In der *SYBR<sup>TM</sup> green* Analyse des Herzgewebes war CASP 3 in Gruppe L numerisch weniger ausgeprägt als in allen anderen Gruppen, und gegenüber Gruppe LOC sogar signifikant geringer. Die Expression von CASP 9 dagegen war im Herzgewebe in Gruppe L nicht verändert, war aber bezogen auf Gruppe L in Gruppe LO signifikant geringer, was als Ausdruck der AT-Blockade gesehen werden kann.

Im Aortagewebe war BAX in Gruppe L stärker exprimiert als in K, LC, und LOC, während sich die Expression von BCL 2 nicht unterschied.

In der *TaqMan<sup>®</sup>* Analyse war die CASP 3 Expression in Gruppe LOC sogar signifikant gegen alle anderen Gruppen erhöht, während die Expression von CASP 9 nicht beeinflusst war.

Die verminderte Expression von CASP 3 im Herzgewebe würde für eine geringer aktivierte Apoptose unter L-NAME sprechen, die sich unter Behandlung mit einem AT1R-Blocker und einem AT2R-Agonisten normalisiert oder wenn beide kombiniert gegeben werden sogar gesteigert wird. Das anti-apoptotische BCL 2 wiederum wird durch keine der Behandlungen in seiner Expression verändert.

In einer Studie mit dem AT1R-Blocker Valsartan in L-NAME Ratten wurde bei unbehandelten L-NAME Tieren eine erhöhte CASP 3 Expression in Herzgewebe gefunden, die unter blutdrucksenkenden als auch den Blutdruck nicht beeinflussenden Dosen sogar weiter erhöht war [139].

Eine weitere Arbeit zeigte anhand des Anstiegs der CASP 3 Aktivität ebenfalls eine Aktivierung der Apoptose im Herzgewebe hypertensiver Ratten unter AT1R-Blockade durch Valsartan [140].

Zumindest die Antagonisierung des L-NAME Effektes auf CASP 3 durch AT1R-Blockade und der damit möglichen AT2R-Aktivierung kann durch die vorliegenden Befunde bestätigt werden. Beide Arbeiten zeigen, dass unter AT1R-Blockade in hypertensiven Ratten eine erhöhte Expression oder Aktivierung von CASP 3 als Steigerung der Apoptose beobachtet wird und mit der Reduktion der Fibrosierung einhergeht.

Die geringere Expression von BAX in der Aorta und CASP 9 im Herzen steht im Kontrast zu den Befunden einer Aktivierung der Apoptose, wie sie in CASP 3 gesehen wird. Da BAX aber CASP 9 und diese wiederum CASP 3 aktiviert, ist es auch denkbar, dass sich in der unterschiedlichen Expression unterschiedliche Funktionszustände widerspiegeln [141].

### 5.3 LIMITIERUNGEN

Wie gezeigt, können die Ergebnisse dieser Arbeit zugrundeliegenden Kreislaufversuches nur bedingt durch Genexpressionsanalysen untermauert werden. Andererseits lassen die hier berichteten Befunde auch nicht die Schlussfolgerung zu, dass es diese Unterschiede in der Genexpression nicht gibt.

Es ist dabei zu berücksichtigen, dass die Abwesenheit der zumindest zwischen den behandelten und unbehandelten Kontrollen erwarteten und in der Literatur beschriebenen Unterschiede, einen Einfluss der Probenentnahme auf das Ergebnis nicht ausschließt. Dieser Faktor liegt außerhalb des Bereiches dieser Arbeit. Ein weiterer Faktor, der die Genexpression beeinflusst, ist der physiologische Unterschied in der Genexpression zwischen den einzelnen Ratten und somit auch zwischen den Gruppen. Die technisch bedingte geringe Anzahl der Ratten pro Gruppe erschwerte es somit, statistisch relevante Ergebnisse abzubilden. Andererseits sollten aber

tatsächlich vorhandene Expressionsunterschiede so relevant sein, dass sie sich trotz der geringen Zahl an Proben statistisch belegen lassen.

Ein weiterer Punkt, der bei der Untersuchung der Genexpression innerhalb der Gruppen von Bedeutung sein könnte, ist, dass sowohl die Wirkung des AT1R-Antagonisten Olmesartan-Medoxomil, als auch die des AT2R-Agonisten C21 nur in Bezug auf die Hypertonie-Tiere untersucht wurde. Die Wirkung der beiden pharmakologischen Wirkstoffe an gesunden Kontrolltieren wurde nicht beschrieben. Die antihypertensive Wirksamkeit von Olmesartan ist aber klinisch nachgewiesen [142].

Die Auswahl der Gene, deren Expression untersucht wurde, stützte sich auf die Analyse der Ergebnisse anderer Studien, in denen Unterschiede der Genexpression beobachtet werden konnten. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass nicht alle untersuchten Studien, das gleiche Hypertoniemodell anwendeten oder die gleichen Versuchstierarten. Das lässt vermuten, dass Ergebnisse der Genexpression unter anderem vom Versuchsaufbau abhängig sind und sich nicht unmittelbar auf andere Versuchsmodelle übertragen lassen.

Die Auswahl der Gene war von der Erwartung geprägt, dass bestimmte pathologische Prozesse, wie Inflammation und Proliferation/Fibrose, an der Entwicklung der Hypertonie beteiligt sind. Es ist aber fraglich, ob eine breitere Genpalette wie die Verwendung eines DNA-*Microarrays* zur Analyse der Genexpression des gesamten Genoms qualitativ andere Ergebnisse hätte liefern können, da zumindest wesentliche Repräsentanten der verschiedenen Aspekte des *Remodeling* untersucht worden sind.

Es ist jedoch denkbar, dass das Projekt um eine Untersuchung der Differenz in der Proteinexpression erweitert werden könnte, da diese nicht unbedingt mit den Unterschieden auf der Genexpressionsebene verknüpft sind. In einem weiteren Experiment wäre es interessant die Auswirkungen der pharmakologischen Substanzen auf die Proteinexpression -und Aktivität zu untersuchen. Mittels vergleichender mRNA Expressionsanalysen kann die Auswirkung verschiedener pharmakologischer Substanzen untersucht werden. Die Analyse der Genexpression anhand der mRNA ist deshalb der für die Aufklärung pharmakologischer Wirkungen ein geeigneter Ansatz.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) ist eines der wichtigsten Systeme hinsichtlich der Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen. Die meisten schädlichen Wirkungen des RAAS lassen sich auf eine Stimulation des Angiotensin 1 Rezeptors (AT1R) zurückführen, die im Prinzip durch Stimulation des AT2R antagonisiert werden können. Mit der Entwicklung von Compound 21 (C21), dem ersten selektiven nicht-peptidischen AT2R Agonisten, wurde es möglich, die Wirkungen einer AT2R Stimulation experimentell zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von mRNA Expressionsmustern den Stellenwert einer Stimulation des AT2R mit C21 auf durch L-NAME (N<sup>0</sup>-nitro-L-arginine-methylester) induzierte Hypertonie verursachte Veränderungen an Herz- und Aortagewebe von Ratten zu bestimmen. Das Interesse galt Genen, die den Inflammationsstatus widerspiegeln (IL 1, IL 2, IL 6, IL 10, TGFB 1, COX 1, COX 2, eNOS, iNOS), die Produktion und den Abbau von Kollagen (COL1 A1, COL1 A3, MMP 1, MMP 2, MMP 9, MMP 13, TIMP 1) und die Apoptose (BAX, BCL 2, CASP 3, CASP 9) regulieren sowie der mRNA Expression von BNP, AT1R, AT2R.

In einem vorausgegangenen Versuch wurde gezeigt, dass unter C21 dem *Remodeling* der Aorta, einer Fibrosierung als auch dem Anstieg der Pulswellengeschwindigkeit in L-NAME hypertonierten Ratten unabhängig von einer Blutdruckreduktion teilweise vorgebeugt werden konnte.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die mRNA-Expression von AT1R und AT2R sowohl in der Aorta als auch im Herzgewebe nachgewiesen. Sie wurde aber weder durch AT1R Blockade durch Olmesartan (OLME) noch durch AT2R Stimulation durch C21 beeinflusst. Die BNP mRNA Expression im Herzgewebe war in den Proben unbehandelter L-NAME Ratten hochreguliert, was auf eine hämodynamische Belastung des Herzens zurückzuführen ist. Die Behandlung mit OLME, C21 oder deren Kombination reduzierte die mRNA Expression auf Kontrolltierniveau. Bemerkenswert war, dass die normalisierten Genexpressionswerte der mit C21 behandelten Proben nicht mit einer Blutdrucksenkung einhergingen. Die Gewebeproben der L-NAME hypertonierten Ratten wiesen eine numerische Erhöhung des IL 6 und TGFB 1 mRNA Expression aus, die unter der jeweiligen Behandlung mit OLME und C21 numerisch reduziert waren. Bei IL 6 war die Genexpression unter der Kombinationstherapie mit OLME und C21 sogar statistisch signifikant reduziert. Es zeigte sich jedoch keine Änderung der IL 10 mRNA Expression. Die histologisch untersuchte erhöhte Kollagenkonzentration in der Aorta wurde durch OLME, C21 und deren Kombination reduziert, jedoch gingen diese Beobachtungen nicht mit einer Veränderung der mRNA Expression von COL1 A1, COL1 A3 oder TIMP 1

einher. Die mRNA Expression von MMP 2 war im Aortagewebe unter der Kombinationstherapie erhöht. Im Herzgewebe dagegen war unter der Kombinationstherapie die mRNA Expression von COL1 A1, COL1 A3 und TIMP 1 erhöht. Diese Ergebnisse deuten auf eine unterschiedliche Regulation des Remodeling im Herz- und Aortagewebe hin.

Im Aortagewebe unbehandelter Kontrollen zeigte sich eine Tendenz zu erhöhter COX 2 mRNA Expression im Vergleich zu den Proben der L-NAME Ratten, insbesondere zu denen, die mit der Kombination behandelt worden waren. COX 1 und eNOS Genexpression auf mRNA Ebene blieben statistisch unverändert.

Die mRNA Expression von CASP 3 war im Herzgewebe unter der Kombinationstherapie am höchsten und in den Gewebeproben der unbehandelten L-NAME Gruppe am geringsten exprimiert. Im Aortagewebe blieb die Expression von CASP 3 unverändert.

Zu den Limitationen der Studie gehört, dass die Untersuchungen sich ausschließlich auf die mRNA Expression bezieht, obwohl ein Teil der untersuchten Gene auf Proteinebene oder durch Aktivierung beziehungsweise durch Inhibierung des Proteins reguliert werden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die geringe Probenzahl zu falsch negativen Ergebnissen führen könnte. Die Auswahl der Gene stützte sich auf die Analyse der Beobachtungen anderer Studien. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass diese Studien nicht alle das gleiche Hypertoniemodell oder die gleichen Versuchstierarten verwendeten. Daraus lässt sich vermuten, dass Ergebnisse der mRNA Expression unter anderem vom Versuchsaufbau abhängig sein könnten.

Ungeachtet dieser Limitationen deuten die mittels C21 erhobenen Ergebnisse darauf hin, dass sich unter der Kombination von AT1R-Blockade durch OLME und AT2R-Stimulation durch C21 eine anti-inflammatorische und pro-apoptotische Wirkung im Herzgewebe und ein erhöhter Abbau der Kollagenfragmente im Aortagewebe entwickelt und dass AT2R-Stimulation somit blutdruckunabhängig die Herzbelastung reduzieren kann [98].

Zur weiteren Validierung sind diese Ergebnisse mit anderen Methoden zu prüfen.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F; Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal* 2013;31:1281-357.
2. Neuhauser H, Thamm M, Ellert U. Blutdruck in Deutschland 2008-2011. *Bundesgesundheitsbl* 2013;56:795-801.
3. Busch MA, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Gößwald A. Prävalenz des Schlaganfalls bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl* 2013;56:656-60.
4. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl* 2013;56:650-5.
5. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin*. 2013;13:105-6.
6. A global brief on hypertension. Silent killer, global public health crisis. WHO. 2013. [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/global\\_brief\\_hypertension/en](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en)
7. Whitworth JA, WHO (International society of hypertension writing group). 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 2003;21:1983-92.
8. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006:216-245.
9. Montani J-P, Van Vliet BN. General physiology and pathophysiology of the renin-angiotensin system 163/I:3-29. In: *Angiotensin Vol. I (Handbook of Experimental Pharmacology / Angiotensin)*, 2004, Eds. Unger T, Schölkens BA. ISBN 13: 9783540406402.
10. Huyard F, Zydorczyk C, Castro MM, Cloutier A, Bertagnolli M, Sartelet H, Germain N, Comte B, Schulz R, DeBlois D, Nuyt AM. Remodeling of aorta extracellular matrix as a result of transient high oxygen exposure in newborn rats: Implication for arterial rigidity and hypertension risk. *PLoS ONE* 2014;9:e92287.
11. Kane MO, Etienne-Selloum N, Madeira SV, Sarr M, Walter A, Dal-Ros S, Schott C, Chataigneau T, Schini-Kerth VB.. Endothelium-derived contracting factors mediate the Ang II-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2010;459:671-9.
12. Schmieder RE. Hypertoniebedingte Endorganschäden. *Dtsch Arztebl* 2010; 107: 866-73.
13. Kochová P, Kuncová J, Svíglerová J, Cimrman R, Miklíková M, Liška V, Tonar Z. The contribution of vascular smooth muscle, elastin and collagen on the passive mechanics of porcine carotid arteries. *Physiol Meas* 2012; 33:1335-51.
14. Ponticos M, Smith BD. Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis. *J Biomed Res* 2014;28:25-39.

15. Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Böhm M, Lopaschuk G, Opie L. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet* 2014; 383: 1933-43.
16. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001;38:581-7.
17. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling: mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2000;102:1186-91.
18. Pries AR, Reglin B, Secomb TW. Remodeling of blood vessels: Responses of diameter and wall thickness to hemodynamic and metabolic stimuli. *Hypertension* 2005; 46:725-31.
19. Zervoudaki AI, Toutouzas PK. Remodeling of resistance vessels in essential hypertension. *Hellenic J Cardiol* 2003;44:116-24.
20. Intengan HD, Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential. *Hypertension* 1999;33:569-74.
21. Paulis L, Becker ST, Lucht K, Schwengel K, Slavic S, Kaschina E, Thöne-Reineke C, Dahlöf B, Baulmann J, Unger T, Steckelings UM. Direct Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation in N<sup>o</sup>-Nitro-L-Arginine-Methyl Ester-Induced Hypertension: The Effect on Pulse Wave Velocity and Aortic Remodeling. *Hypertension* 2012; 59: 485-92.
22. Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in Hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:152-8.
23. Weber T, Eber B, Zweiker R, Horn S, Grüner P, Pichler M, Mayer G, Eisserer G, Magometschnigg D, Illyes M. Pulswellengeschwindigkeit, zentraler Blutdruck und Augmentationsindex – „neue“ Parameter zur Beschreibung eines Endorganschadens der arteriellen Strombahn bei Hypertonie. *Pathophysiologie, Methodik, prognostische Bedeutung, Empfehlungen. J Hypertonie* 2008; 12: 7-13.
24. Kurisu S, Ozono R, Oshima T, Kambe M, Ishida T, Sugino H, Matsuura H, Chayama K, Teranishi Y, Iba O, Amano K, Matsubara H. Cardiac angiotensin II Type 2 receptor activates the Kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension* 2003;41:99-107.
25. Paulis L, Zicha J, Kunes J, Hojna S, Behuliak M, Celec P, Kojsova S, Pechanova O, Simko F. Regression of L-NAME-induced hypertension: The role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. *Hypertens Res.* 2008;31:793-803.
26. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20:298-303.
27. Ogawa T, Veinot JP, Kuroski de Bold ML, Georgalis T, and de Bold AJ. Angiotensin II receptor antagonism reverts the selective cardiac BNP upregulation and secretion observed in myocarditis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2596-603, 2008.
28. Suo M, Kalliovalkama J, Pörsti I, Jolma P, Tolvanen JP, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester-Induced Hypertension and Natriuretic Peptide Gene Expression: Inhibition by Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 40:478-86.

29. Zhang Y, Carreras D, de Bold AJ. Discoordinate re-expression of cardiac fetal genes in vN-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) hypertension. *Cardiovascular Research* 2003;57: 158-67.
30. Fitch RM, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX. Nitric oxide synthase inhibition increases aortic stiffness measured by pulse wave velocity in rats. *Cardiovasc Res* 2001;51:351-58.
31. Latham RD, Westerhof N, Sipkema P, Rubal BJ, Reuderink P, Murgu JP. Regional wave travel and reflections along the human aorta: a study with six simultaneous micromanometric pressures. *Circulation* 1985;72:1257-69.
32. Safar ME, van Bortel LM, Struijker-Boudier HA. Resistance and conduit arteries following converting enzyme inhibition in hypertension. *J Vasc Res* 1997;34:67-81.
33. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H; European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27:2588-605.
34. Learoyd BM, Taylor MG. Alterations with age in the viscoelastic properties of human arterial walls. *Circ Res* 1966;18:278-92.
35. Boutouyrie P, Laurent S, Girerd X, Benetos A, Lacolley P, Abergel E, Safar M. Common carotid artery stiffness and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Hypertension* 1995;25:651-9.
36. London GM, Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME, Cuche JL. Cardiac hypertrophy, aortic compliance, peripheral resistance, and wave reflection in end-stage renal disease. Comparative effects of ACE-inhibition and calcium channel blockade. *Circulation* 1994;90:2786-96.
37. McNulty M, Mahmud A, Spiers P, Feely J. Collagen type-I degradation is related to arterial stiffness in hypertensive and normotensive subjects. *Journal of Human Hypertension*. 2006;20:867-73.
38. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HAJ. Microcirculation in hypertension: A new target for treatment? *Circulation* 2001;104:735-40.
39. Struijker Boudier HA, Cohuet GM, Baumann M, Safar ME. The heart, macrocirculation and microcirculation in hypertension: a unifying hypothesis. *J Hypertens Suppl* 2003; 21:19-23.
40. Kameyama H, Takeda K, Kusaba T, Narumiya H, Tanda S, Kuwahara N, Yamada K, Tamagaki K, Okigaki M, Hatta T, Sasaki S. Augmentation of pulse wave velocity precedes vascular structural changes of the aorta in rats treated with N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertens Res* 2005;28:439-45.
41. Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, Laurent S. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients a longitudinal study. *Hypertension*. 2002 Jan;39(1):10-5.
42. Crowley SD. The Cooperative Roles of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:102-20.
43. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014;237:208-19.

44. Dzau VJ. Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 2001;37:1047-52.
45. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 2011;164:894-912.
46. Hernanz R, Briones AM, Salices M, Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase in hypertension. *Clin Sci(Lond)* 2014;126:111-21.
47. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J. Lipid Res* 2009;50:29-34.
48. Wong SL, Lau CW, Wong WT, Xu A, Au CL, Ng CF, Ng SS, Gollasch M, Yao X, Huang Y.. Pivotal Role of Protein Kinase C $\delta$  in Angiotensin II-Induced Endothelial Cyclooxygenase-2 Expression: A Link to Vascular Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1169-76.
49. Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salices M. Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:51-65.
50. Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, Chu Y, Faraci FM. Endogenous Interleukin-10 Inhibits Angiotensin II-Induced Vascular Dysfunction. *Hypertension* 2009; 54:619-24.
51. Leo MD, Kandasamy K, Subramani J, Tandan SK, Kumar D. Involvement of inducible nitric oxide synthase and dimethyl arginine dimethylaminohydrolase in N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-induced hypertension. *Cardiovasc Pathol.* 2015; 24(1):49-55.
52. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res.* 2000;87:840-4.
53. Kossmann S, Schwenk M, Hausding M, Karbach SH, Schmidgen MI, Brandt M, Knorr M, Hu H, Kröller-Schön S, Schönfelder T, Grabbe S, Oelze M, Daiber A, Münzel T, Becker C, Wenzel P. Angiotensin II-Induced Vascular Dysfunction Depends on Interferon- $\gamma$ -Driven Immune Cell Recruitment and Mutual Activation of Monocytes and NK-Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1313-9.
54. Nakane H, Miller FJ Jr, Faraci FM, Toyoda K, Heistad DD. Gene Transfer of Endothelial Nitric Oxide Synthase Reduces Angiotensin II-Induced Endothelial Dysfunction. *Hypertension* 2000;35:595-601.
55. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. Compensatory Up-Regulation of Nitric-Oxide Synthase Isoforms in Lead-Induced Hypertension; Reversal by a Superoxide Dismutase-Mimetic Drug. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298:679-85.
56. Schiffrin EL. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clin Sci (Lond)* 2014;126:267-74.
57. Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, Vinh A, Weyand CM. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Hypertension* 2011; 57: 132-40.

58. Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Johnson RJ. The Immunological Basis of Hypertension. *Am J Hypertens* 2014;27:1327-37.
59. Barbaro NR, Fontana V, Modolo R, De Faria AP, Sabbatini AR, Fonseca FH, Anê GF, Moreno H. Increased arterial stiffness in resistant hypertension is associated with inflammatory biomarkers. *Blood Press* 2015 Feb;24(1):7-13.
60. Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- $\alpha$ ) and essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2005;19:149-54.
61. Harrison DG, Guzik TJ, Goronzy J, Weyand C. Is Hypertension an Immunologic Disease? *Curr Cardiol Rep* 2008;10:464-69.
62. Boesen EI, Williams DL, Pollock JS, Pollock DM. Immuno-suppression with mycophenolate mofetil attenuates the development of hypertension and albuminuria in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:1016-22.
63. Franco M1, Martínez F, Quiroz Y, Galicia O, Bautista R, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B. Renal angiotensin II concentration and interstitial infiltration of immune cells are correlated with blood pressure levels in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R251-6.
64. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 2007;204: 2449-60.
65. Fu ML, Herlitz H, Schulze W, Wallukat G, Micke P, Eftekhari P, Sjögren KG, Hjalmarsen A, Müller-Esterl W, Hoebeke J. Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. *J Hypertens* 2000;18:945-53.
66. Wei F, Jia XJ, Yu SQ, Gu Y, Wang L, Guo XM, Wang M, Zhu F, Cheng X, Wei YM, Zhou ZH, Fu M, Liao YH; SOT-AT1 Study Group. Candesartan versus imidapril in hypertension: a randomised study to assess effects of anti-AT1 receptor autoantibodies. *Heart* 2011;97:479-84.
67. Herrera J, Ferrebuz A, MacGregor EG, Rodriguez-Iturbe B. Mycophenolate Mofetil Treatment Improves Hypertension in Patients with Psoriasis and Rheumatoid Arthritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:218-25.
68. Salum E, Butlin M, Kals J, Zilmer M, Eha J, Avolio AP, Arend A, Aunapuu M, Kampus P. Angiotensin II receptor blocker telmisartan attenuates aortic stiffening and remodelling in STZ-diabetic rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2014; 6:57.
69. Philips N, Bashey RI, Jimenez SA. Collagen and fibronectin expression in cardiac fibroblasts from hypertensive rats. *Cardiovascular Research* 1994;28:1342-7.
70. Varo N, Iraburu MJ, Varela M, Lopez B, Etayo JC, Diez J. Chronic AT1 Blockade Stimulates Extracellular Collagen Type I Degradation and Reverses Myocardial Fibrosis in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 2000;35:1197-202.
71. Chamiot-Clerc P, Renaud JF, Blacher J, Legrand M, Samuel JL, Levy BI, Sassard J, Safar ME. Collagen I and III and mechanical properties of conduit arteries in rats with genetic hypertension. *J Vasc Res* 1999;36:139-46.
72. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metallo-proteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267-83.

73. Morillas P, Quiles J, de Andrade H, Castillo J, Tarazón E, Roselló E, Portolés M, Rivera M, Bertomeu-Martínez V. Circulating biomarkers of collagen metabolism in arterial hypertension: relevance of target organ damage. *J Hypertens* 2013;31:1611-7.
74. Brown RD, Jones GM, Laird RE, Hudson P, Long CS. Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:200-5.
75. Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif* 2004;37:207-20.
76. Yasmin (*sic*), McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and Serum Elastase Activity Are Associated With Systolic Hypertension and Arterial Stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:372-8.
77. Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 2000;130:947-62.
78. González A, Fortuño MA, Querejeta R, Ravassa S, López B, López N, Díez J. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2003; 59:549-62.
79. Buemi M, Corica F, Marino D, Medici MA, Aloisi C, Di Pasquale G, Ruello A, Sturiale A, Senatore M, Frisina N. Cardiovascular Remodeling, Apoptosis, and Drugs. *Am J Hypertens* 2000;13:450-4.
80. Kang PM, Izumo S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol Med* 2003;9:178-82.
81. Atlas SA. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007;13:9-20.
82. Siragy HM. AT1 and AT2 receptors in the kidney: Role in disease and treatment. *Am J Kidney Dis* 2000;36:4-9.
83. Unger T, Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2004;5:7-10.
84. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003;24:261-71.
85. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: Regulation, signalling and function. *Blood Press* 2003;12:70-88.
86. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II Type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* 1998;83:1182-91.
87. Karnik SS, Unal H, Kemp JR, Tirupula KC, Eguchi S, Vanderheyden PM, Thomas WG. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]. *Pharmacol Rev*. 2015;67(4):754-819.
88. Matsusaka T, Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Ann. Rev. Physiol* 1997;59:395-412.
89. De Gasparo M, Siragy HM. The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul Pept* 1999;81:11-24.

90. Siragy HM. The Role of the AT2 receptor in hypertension. *Am J Hypertens* 2003; 13: 62-7.
91. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II Type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999;33:613-21.
92. Brogelli L, Parenti A, Ledda F. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by angiotensin Type 2 receptor stimulation for in vitro organ culture model. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;39:739-45.
93. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation: A Novel Option of Therapeutic Interference With the Renin-Angiotensin system in Myocardial Infarction? *Circulation* 2008;118:2523-32.
94. Namsolleck P, Recarti C, Foulquier S, Steckelings UM, Unger T. AT2 Receptor and Tissue Injury: Therapeutic Implications. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16:416.
95. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C, Reichenbach A, Schacherl J, Dahlöf B, Bader M, Alenina N, Schwaninger M, Zuberbier T, Funke-Kaiser H, Schmidt C, Schunck WH, Unger T, Steckelings UM. Direct angiotensin II Type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B. *Hypertension* 2010; 55:924-31.
96. Matavelli LC, Siragy H. AT2 Receptor Activities and Pathophysiological Implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015;65:226-32.
97. Criscione L, de Gasparo M, Bühlmayer P, Whitebread S, Ramjoue HPR, Wood J. Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin II AT1-receptor subtype. *Br. J. Pharmacol* 1993;110:761-71.
98. Steckelings UM, Paulis L, Namsolleck P, Unger T. AT2 receptor agonists: hypertension and beyond. *Curr. Opin. Nephrol Hypertens* 2012;21:142-6.
99. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, Johansson B, Holm M, Botoros M, Karlén A, Pettersson A, Nyberg F, Fändriks L, Gallo-Payet N, Hallberg A, Alterman M. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. *J. Med. Chem* 2004;47:5995-6008.
100. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Namsolleck P, Grzesiak A, Funke-Kaiser H, Bader M, Unger T. The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010;11: 67-73.
101. Brechler V, Jones PW, Levens NR, de Gasparo M, Bottari SP. Agonistic and antagonistic properties of angiotensin analogs at the AT2 receptor in PC12W cells 1993;44:207-13.
102. Stoll M, UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:651-7.
103. Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL. Angiotensin Type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2012;59:291-9.

104. Foulquier S, Steckelings UM, Unger T. Impact of the AT<sub>2</sub> receptor agonist C21 on blood pressure and beyond. *Curr Hypertens Rep* 2012;14:403-9.
105. Steckelings UM, Larhed M, Hallberg A, Widdop RE, Jones ES, Wallinder C, Nam-solleck P, Dahlöf B, Unger T. Non-peptide AT<sub>2</sub>-receptor agonists. *Current Opinion in Pharmacology* 2011;11:187-92.
106. Koulis C, Chow BS, McKelvey M, Steckelings UM, Unger T, Thallas-Bonke V, Thomas MC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ. AT<sub>2</sub>R agonist, compound 21, is reno-protective against type 1 diabetic nephropathy. *Hypertension* 2015; 65(5): 1073-81.
107. Lauer D, Slavic S, Sommerfeld M, Thöne-Reineke C, Sharkovska Y, Hallberg A, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM, Kaschina E. Angiotensin Type 2 Receptor Stimulation Ameliorates Left Ventricular Fibrosis and Dysfunction via Regulation of Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1/Matrix Metallo-proteinase 9 Axis and Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in the Rat Heart. *Hypertension* 2014;63:e60-7.
108. Sampson AK, Irvine JC, Shihata WA, Dragoljevic D, Lumsden N, Huet O, Barnes T, Unger T, Steckelings UM, Jennings GL, Widdop RE, Chin-Dusting JP. Compound 21, a selective agonist of angiotensin AT<sub>2</sub> receptors, prevents endothelial inflammation and leukocyte adhesion in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 2016 Feb;173(4):729-40.
109. Barbau-Piednoir E, Botteldoorn N, Yde M, Mahillon J, Roosens NH. Development and validation of qualitative SYBR®Green Real-Time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Appl Microbiol Bio-technol* 2013;97:4021-37.
110. Dymond JS. Explanatory Chapter: Quantitative PCR, *Methods in Enzymology* 2013;529:279-89.
111. Eckert KA, Kunkel TA. DNA Polymerase Fidelity and the Polymerase Chain Reaction. *Genome Res* 1991;1:17-24.
112. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
113. Rutledge RG, Cote C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acid Research* 2003;31:e93.
114. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 2004;1:92-5.
115. Judelson H. Guidelines For Designing Primers. <http://oomyceteworld.net/protocols/primer%20designing2.pdf>
116. PCR Primer Design Guidelines. [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html)
117. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.
118. Rocha MS, Cavalcante AG, Silva R, Ramos EB. On the Effects of Intercalators in DNA Condensation: A Force Spectroscopy and Gel Electrophoresis Study. *J Phys Chem B* 2014;118:4832-9.

119. Sanderson BA, Araki N, Lilley JL, Guerrero G, Lewis LK. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem* 2014;454:44-52.
120. Sigmon J, Larcom LL. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1996;17:1524-7.
121. Arikawa E, Sun Y, Wang J, Zhou Q, Ning B, Dial SL, Guo L, Yang J. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics* 2008, 9:328.
122. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best Keeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004;26: 509-15.
123. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
124. Kessler W. *Multivariate Datenanalyse für die Pharma, Bio- und Prozessanalytik*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, 2007. ISBN: 978-3-527-31262-7.
125. Pearson K. On lines and planes of closest fit to a system of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 1901; 6:559-72.
126. Wohlfart P, Linz W, Hübschle T, Linz D, Huber J, Hess S, Crowther D, Werner U, Ruetten H. Cardioprotective effects of lixisenatide in rat myocardial ischemia-reperfusion injury studies. *J Transl Med* 2013;11:84.
127. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B: Methodological* 1995;57:289-300.
128. Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, et al. Circulating Interleukin 6 Levels, Blood Pressure, and Insulin Sensitivity in Apparently Healthy Men and Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1154-9.
129. Kintscher U, Marx N, Martus P, Stoppelhaar M, Schimkus J, Schneider A, Walcher D, Kümmel A, Winkler R, Kappert K, Dörffel Y, Scholze J, Unger T. Effect of high-dose valsartan on inflammatory and lipid parameters in patients with Type 2 diabetes and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Sep;89(3):209-15.
130. Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, Osborne JB Jr, Fleming C, Pollock JS, Manhiani M, Imig JD, Brands MW. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H935-40.
131. Viel EC, Lemarié CA, Benkirane K, Paradis P, Schiffrin EL. Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H938-44.
132. Carey RM, Jin XH, Siragy HM. Role of the Angiotensin AT2 Receptor in Blood Pressure Regulation and Therapeutic Implications. *Am J Hypertens* 2001;14:98-102.
133. Zervoudaki A, Economou E, Stefanadis C, Pitsavos C, Tsioufis K, Aggeli C, Vasiliadou K, Toutouza M, Toutouzas P. Plasma levels of active extracellular matrix

- metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment. *J Human Hypertens* 2003;17:119-24.
134. Viridis A, Colucci R, Fornai M, Duranti E, Giannarelli C, Bernardini N, Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Blandizzi C, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M. Cyclooxygenase-1 Is Involved in Endothelial Dysfunction of Mesenteric Small Arteries From Angiotensin II-Infused Mice. *Hypertension* 2007;49:679-86.
  135. Welch WJ, Patel K, Modlinger P, Mendonca M, Kawada N, Dennehy K, Aslam S, Wilcox CS. Roles of vasoconstrictor prostaglandins, COX-1 and -2, and AT1, AT 2, and TP receptors in a rat model of early 2K,1C hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2644-9.
  136. Qi Z, Hao CM, Langenbach RI, Breyer RM, Redha R, Morrow JD, Breyer MD. Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. *J Clin Invest* 2002;110:61-9.
  137. Bauersachs J, Bouloumie A, Mülsch A, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res* 1998;37: 772-9.
  138. Kobayashi N, Yanaka H, Tojo A, Kobayashi K, Matsuoka H. Effects of Amlodipine on Nitric Oxide Synthase mRNA Expression and Coronary Microcirculation in Prolonged Nitric Oxide Blockade-Induced Hypertensive Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:173-81.
  139. Akashiba A, Ono H, Ono Y, Ishimitsu T, Matsuoka H. Valsartan improves L-NAME-exacerbated cardiac fibrosis with TGF- $\beta$  inhibition and apoptosis induction in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiol*. 2008 Dec; 52(3):239-46.
  140. Marchand EL, Der Sarkissian S, Hamet P, deBlois D. Caspase-dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 2003 Apr 18;92(7):777-84.
  141. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*. 2013 Jul 9;14:32.
  142. Mason RP. Optimal therapeutic strategy for treating patients with hypertension and atherosclerosis: focus on olmesartan medoxomil. *Vasc Health Risk Manag*. 2011; 7: 405-16.
- 

## 8 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Sophie Thea Ruth Becker, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Untersuchung der pharmakologischen Wirkung einer direkten Angiotensin AT2 Rezeptor Stimulation mittels Genexpressionsanalyse auf hypertoniebedingte Organschäden in einem L-NAME Hypertoniemodell bei Ratten" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer un-wahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und be-wusst.“

Datum

Unterschrift

-----



## 9 ANTEILSERKLÄRUNG AN PUBLIKATIONEN

Sophie Thea Ruth Becker hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Paulis L, Schwengel K, Lucht K, Becker S, Slavic S, Kaschina E, Kemnitz RU, Baulmann J, Unger T, Steckelings UM. The Effect of AT2-Receptor Stimulation Aortic Thickening and Stiffness in L-NAME-induced Hypertension. Dtsch med Wochenschr 2010; 135: S135-S189: (P32) S158 [<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0030-1270122>].

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):** Beteiligung an der Auswertung der Untersuchungen, Mitarbeit an der Anfertigung des Manuskriptes und Vortrag der Studie

**Publikation 2:** Becker S, Schwengel K, Lucht, K, Slavic S, Kaschina E, Leonhardt J, Baulmann J, Unger T, Steckelings UM, Paulis L. The modulation of aortic thickening and stiffness in L-NAME induced hypertension. The role of the AT2 receptor stimulation. J Hypertens, 29 (Supplement A):e77(5D.03), June 2011 [[http://journals.lww.com/jhypertension/Citation/2011/06001/THE\\_MODULATION\\_OF\\_AORTIC\\_THICKENING\\_AND\\_STIFFNESS.193.aspx](http://journals.lww.com/jhypertension/Citation/2011/06001/THE_MODULATION_OF_AORTIC_THICKENING_AND_STIFFNESS.193.aspx)].

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):** Beteiligung an der Auswertung der Untersuchungen, Mitarbeit an der Anfertigung des Manuskriptes, Vortrag der Studie.

**Publikation 3:** Paulis L, Becker ST, Lucht K, Schwengel K, Slavic S, Kaschina E, Thöne-Reineke C, Dahlöf B, Baulmann J, Unger T, Steckelings UM. Direct Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation in N<sup>o</sup>-Nitro-l-Arginine-Methyl Ester-Induced Hypertension: The Effect on Pulse Wave Velocity and Aortic Remodeling. Hypertension 2012;59:485-92 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22215717>].

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):** Beteiligung an der Auswertung der Untersuchungen, Mitarbeit an der Anfertigung des Manuskriptes

**Publikation 4:** Paulis L, Becker STR, Lucht K, Schwengel K, Slavic S, Kaschina E, Dahlöf B, Baulmann J, Unger T, Steckelings UM. The AT2 receptor and vascular remodeling. J Hypertens, 30(eSuppl 1):e109, 2012 [[http://journals.lww.com/jhypertension/Abstract/2012/09001/371\\_THE\\_AT2\\_RECEPTOR\\_AND\\_VASCULAR\\_REMODELING\\_.348.aspx](http://journals.lww.com/jhypertension/Abstract/2012/09001/371_THE_AT2_RECEPTOR_AND_VASCULAR_REMODELING_.348.aspx)].

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):** Beteiligung an der Auswertung der Untersuchungen, Mitarbeit an der Anfertigung des Manuskriptes

**Publikation 5:** Paulis L, Becker STR, Lucht K, Schwengel K, Slavic S, Kaschina E, Dahlöf B, Baulmann J, Unger T, Steckelings UM. The AT2 receptor and vascular remodeling in L-NAME induced hypertension. J Hypertens, 30(eSuppl 1):e109, 2012 [[http://journals.lww.com/jhypertension/Abstract/2012/09001/1029\\_AT2\\_receptor\\_stimulation\\_and\\_vascular.950.aspx](http://journals.lww.com/jhypertension/Abstract/2012/09001/1029_AT2_receptor_stimulation_and_vascular.950.aspx)].

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):** Beteiligung an der Auswertung der Untersuchungen, Mitarbeit an der Anfertigung des Manuskriptes und Vortrag der Studie

**Publikation 6:** Paulis L, Becker STR, Lucht K, Schwengel K, Slavic S, Kaschina E, Dahlöf, Baulmann J, Unger T, Steckelings UM. AT2 receptor stimulation and vascular remodeling in L-NAME-induced hypertension. J Hypertens, 30 (eSuppl 1): e300 (1029), 2012. [[http://journals.lww.com/jhypertension/Abstract/2012/09001/1029\\_AT2\\_receptor\\_stimulation\\_and\\_vascular.950.aspx](http://journals.lww.com/jhypertension/Abstract/2012/09001/1029_AT2_receptor_stimulation_and_vascular.950.aspx)]

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):** Beteiligung an der Auswertung der Untersuchungen, Mitarbeit an der Anfertigung des Manuskriptes.

**Publikation 7:** Ludovit P (*sic*), Becker STR, Slavic S, Kaschina E, Dahloef B, Baulmann J, Unger T, Steckelings UM. Direct AT2 receptor stimulation protects against vascular remodeling in L-NAME hypertension. Controversies to consensus on diabetes, obesity and hypertension, Abstract Book, Shanghai, 2013:p5. [<http://www.codhy.com/china/2013/Uploads/Editor/0Ludovit.pdf>].

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):** Beteiligung an der Auswertung der Untersuchungen, Mitarbeit an der Anfertigung des Manuskriptes.

**Publikation 8:** Becker S, Paulis L, Schmerler P, Slavic S, Kaschina E, Dahloef B, Baulmann J, Unger T, Steckelings U. The effects of AT2 receptor stimulation by compound 21 on L-NAME-induced hypertension in rats. 38. Wissenschaftlichen Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. / DHL® Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention in Berlin, Abstractband S56: PS6-08. [[www.hypertonie2014.de](http://www.hypertonie2014.de)].

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):** Aufbau und experimentelle Ausführung der Genexpressionsanalyse, Auswertung der Ergebnisse, Beteiligung an der Anfertigung des Manuskriptes und Vortrag der Studie

---

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin



## 10 LEBENSLAUF

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**



## 11 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt in erster Linie Professor Dr. med. Thomas Unger, der mir die Chance gab, mich mit Methodik und Thema der vorliegenden Doktorarbeit auseinanderzusetzen. Zudem danke ich für die Bereitstellung der Einrichtungen des Instituts der Pharmakologie Center for Cardiovascular Research der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

PD Dr. med. Elena Kaschina danke ich für die Weiterführung der Betreuung meiner Arbeit und den aufbauenden wissenschaftlichen Diskurs.

Dr. med. Ludovit Paulis gilt mein besonderer Dank für die unerschütterliche Unterstützung und den fortwährenden wissenschaftlichen Austausch.

Dr. rer. nat. Paulus Wohlfahrt danke ich für den Zugang zu den Laboratorien der Herz- und Kreislaufforschung der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH in Frankfurt am Main, sowie für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung.

Zudem möchte ich meinen Kollegen aus dem CCR danken, insbesondere Sebastian Kirsch und Dr. rer.nat. Daniela Zaade, die mich während der Erstellung solidarisch unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, ohne deren vorbehaltlosen Beistand diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 12 ANHÄNGE

### 12.1 GERÄTELISTE

1. Biometra Standard Power Pack P25, Analytik Jena AG, Jena
2. BIO-RAD Chemi Doc, Bio-Rad Laboratories, Inc, USA
3. Eppendorf Mastercycler, Thermocycler Gradient und Thermomixer, Eppendorf AG, Hamburg
4. Eppendorf ThermoStat plus, Eppendorf AG, Hamburg
5. Heraeus Multifuge 1S-R/3R Plus, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
6. Hettich-Zentrifuge Mikro 120, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen.
7. Mx3000P, Stratagene, Applied Biosystems, USA
8. NanoDrop, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
9. Polytron PT 1200 CL, Kinematica AG, Schweiz
10. Video Graphic Printer UP-895MD, Sony, Japan
11. ViiA™ 7 real time PCR system, life technologies, USA
12. 96-well PCR-Platten, Sigma-Aldrich, USA

### 12.2 CHEMIKALIENLISTE

1. Agarose, Sigma-Aldrich, USA
2. Chloroform, Merck, Darmstadt, D
3. Dithiothreitol (DTT) Sigma, Taufkirchen, D
4. dNTPs Bionline, Luckenwalde, D
5. Ethanol 96 % und 100 % Merck, Darmstadt, D
6. Ethidiumbromid Roth, Karlsruhe, D
7. GeneRuler 1 kb DNA ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, D
8. GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, D
9. Isopropanol Roth, Karlsruhe, D
10. Orange G Merck, Darmstadt, D
11. Power SYBR™ green PCR Master Mix, applied biosystems, UK
12. Primer, Invitrogen, USA
13. Primer, Sigma-Aldrich, USA

14. Random Primers, Promega Corporation, USA
15. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck KGaA, Darmstadt, D
16. Trizol Reagent, life technologies, USA
17. Ultra-Pure Wasser, Biochrom AG, Berlin, D

---

#### **12.2.1 PUFFER**

1. 50×TAE-Puffer: 2 mmol/L Tris, 1 mmol/L Eisessig, 0,5 mmol/L EDTA, pH 8,0

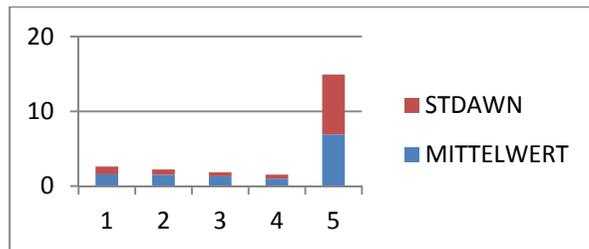
---

#### **12.2.2 KITS**

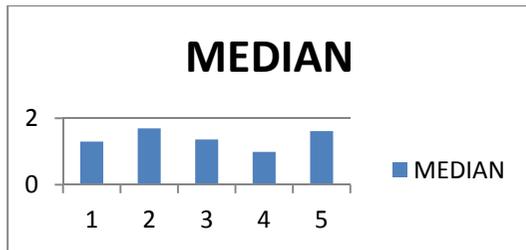
1. *SuperScript™ II Reverse Transcriptase*, Invitrogen, USA
2. *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, Applied Biosystems, USA
3. *384-well Microfluidic Card TaqMan® Array*, Applied Biosystems, USA
4. *Custom TaqMan® PreAmp Pools*, Applied Biosystems, USA

### 12.3 DATENBLÄTTER

Well Name	ANIMAL	GROUP	GROUP	GEN	GEN	ct timp1	Ct bestkeeper	dCt	stan. dCt	ddCt	2*(-ddCt)	MW	stan. MW	MW	STABW	MWGROUP	STABWGROUP	
51	1 PL			1 timp1		31	25.45	20.68	4.773721601	5.074876437	-0.301154836	1.232130304	1.073590714	1.073590714	1	0.127997301	1.57645837	1.032872787
51	1 PL			1 timp1		31	25.42	20.33	5.091356572	5.074876437	0.016480135	0.988641838						
51	1 PL			1 timp1		31	25.42	20.35	5.074876437	5.074876437	0	1						
52	2 PL			1 timp1		31	25.21	20.51	4.697063265	5.074876437	-0.377813172	1.299370784	1.298193776	1.073590714	1.209207345	0.093891589		
52	2 PL			1 timp1		31	25.25	20.43	4.815683161	5.074876437	-0.259193276	1.196809288						
52	2 PL			1 timp1		31	25.26	20.67	4.591098051	5.074876437	-0.483778386	1.398401256						
53	3 PL			1 timp1		31	26.71	22.14	4.570167698	5.074876437	-0.504708739	1.418836883	1.445813457	1.073590714	1.346708236	0.026639888		
53	3 PL			1 timp1		31	26.63	22.12	4.513379657	5.074876437	-0.56149678	1.475799549						
53	3 PL			1 timp1		31	26.58	22.03	4.546001171	5.074876437	-0.528875266	1.442803938						
54	4 PL			1 timp1		31	25.46	20.33	5.128736243	5.074876437	0.053859807	0.963355503	0.994672384	1.073590714	0.926491233	0.104650876		
54	4 PL			1 timp1		31	25.54	20.32	5.224795217	5.074876437	0.14991878	0.901301202						
54	4 PL			1 timp1		31	25.64	20.73	4.912201762	5.074876437	-0.162674675	1.119360447						
55	5 PL			1 timp1		31	23.86	20.58	3.283415513	5.074876437	-1.791460924	3.461652542	3.650085002	1.073590714	3.399885036	0.160662654		
55	5 PL			1 timp1		31	23.79	20.60	3.191868561	5.074876437	-1.883007876	3.688432607						
55	5 PL			1 timp1		31	23.74	20.59	3.148812532	5.074876437	-1.926063904	3.800169857						
0	6 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1.073590714	LEER	LEER		
0	6 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						
0	6 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						
0	7 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1.073590714	LEER	LEER		
0	7 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						
0	7 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						
0	8 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1.073590714	LEER	LEER		
0	8 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						
0	8 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						
0	9 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1.073590714	LEER	LEER		
0	9 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						
0	9 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						
0	10 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1.073590714	LEER	LEER		
0	10 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						
0	10 PL			1 timp1		31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER						

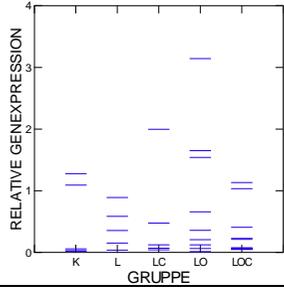
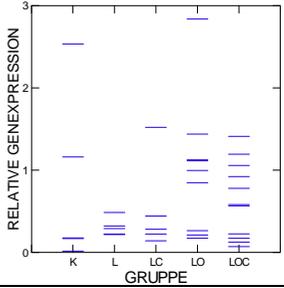
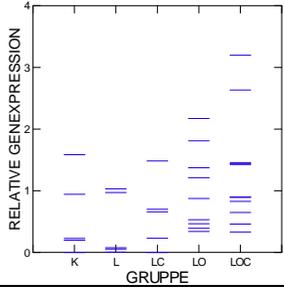
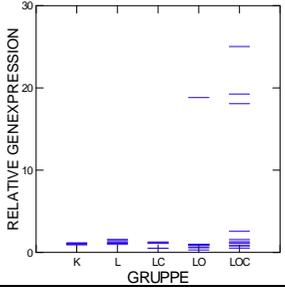
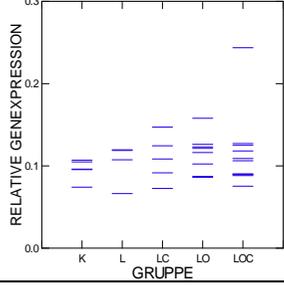
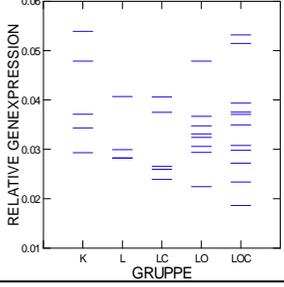
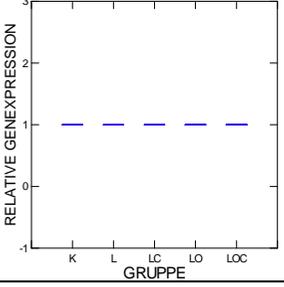
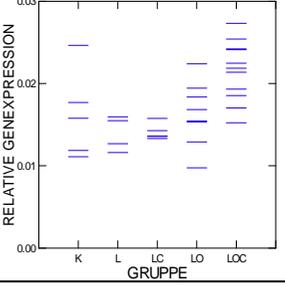
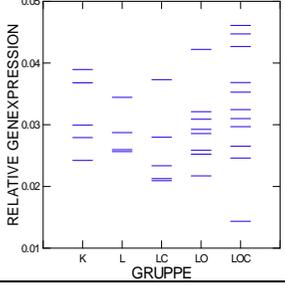


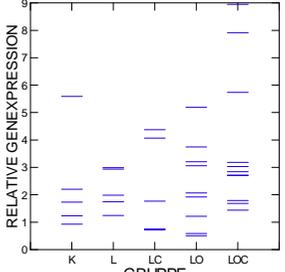
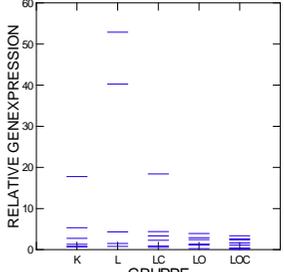
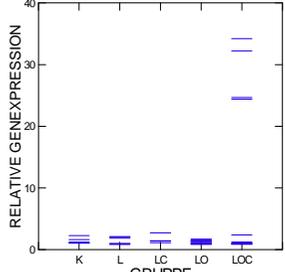
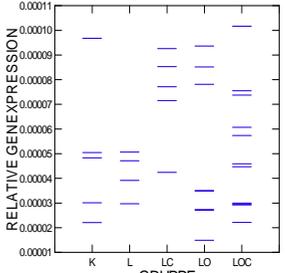
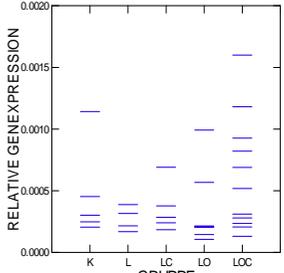
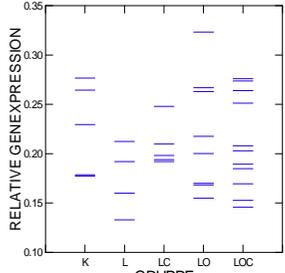
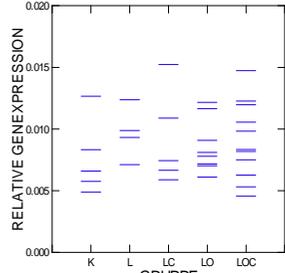
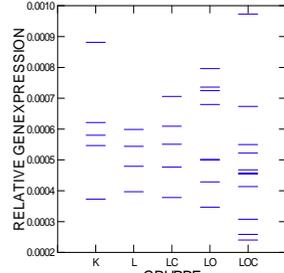
Well Name	ANIMAL	GROUP	GROUP	GEN	GEN	ct timp1	Ct bestkeepe	dCt	stan. dCt	ddCt	2 <sup>-(ddCt)</sup>	MD	stan. MD	MD	MDGROUP	
51	1 PL			1 timp1		31	25.45	20.6762784	4.779721661	5.074876437	-0.301154836	1.299370784	1	1	1.299370784	
51	1 PL			1 timp1		31	25.42	20.32064949	5.091356572	5.074876437	0.016480135	0.988641838				
51	1 PL			1 timp1		31	25.42	20.34512356	5.074876437	5.074876437	0	1				
52	2 PL			1 timp1		31	25.21	20.51293674	4.697069265	5.074876437	-0.377613172	1.299370784	1.299370784	1	1.299370784	
52	2 PL			1 timp1		31	25.25	20.43431684	4.815683161	5.074876437	-0.259193276	1.196809288				
52	2 PL			1 timp1		31	25.26	20.66890195	4.591098051	5.074876437	-0.483778386	1.398401256				
53	3 PL			1 timp1		31	26.71	22.1398323	4.570167698	5.074876437	-0.504708739	1.418836883	1.442803938	1	1.442803938	
53	3 PL			1 timp1		31	26.63	22.11662034	4.513379657	5.074876437	-0.56149678	1.475799549				
53	3 PL			1 timp1		31	26.58	22.03399883	4.546001171	5.074876437	-0.528875266	1.442803938				
54	4 PL			1 timp1		31	25.46	20.33126376	5.128736243	5.074876437	0.053859807	0.963355503	0.963355503	1	0.963355503	
54	4 PL			1 timp1		31	25.54	20.31520478	5.224795217	5.074876437	0.14991878	0.901301202				
54	4 PL			1 timp1		31	25.64	20.72779824	4.912201762	5.074876437	-0.162674675	1.119360447				
55	5 PL			1 timp1		31	23.86	20.57658449	3.283415513	5.074876437	-1.791460924	3.461652542	3.688432607	1	3.688432607	
55	5 PL			1 timp1		31	23.79	20.59813144	3.191868561	5.074876437	-1.883007876	3.688432607				
55	5 PL			1 timp1		31	23.74	20.59118747	3.148812532	5.074876437	-1.926063904	3.800169857				
0	6 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1	LEER	LEER
0	6 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				
0	6 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				
0	7 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1	LEER	LEER
0	7 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				
0	7 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				
0	8 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1	LEER	LEER
0	8 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				
0	8 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				
0	9 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1	LEER	LEER
0	9 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				
0	9 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				
0	10 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER	LEER	1	LEER	LEER
0	10 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				
0	10 PL			1 timp1	LEER	31	0	0	LEER	5.074876437	LEER	LEER				

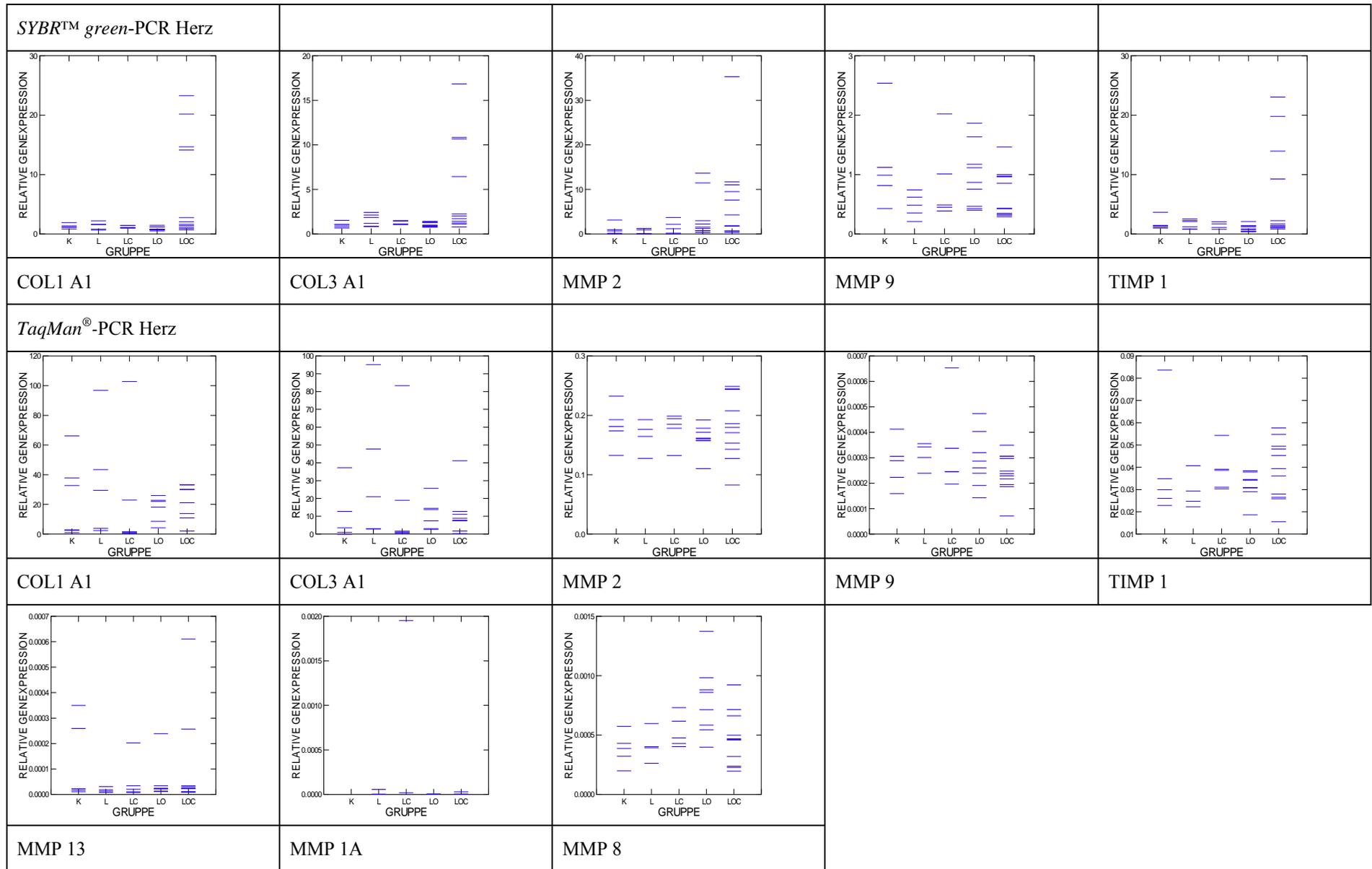


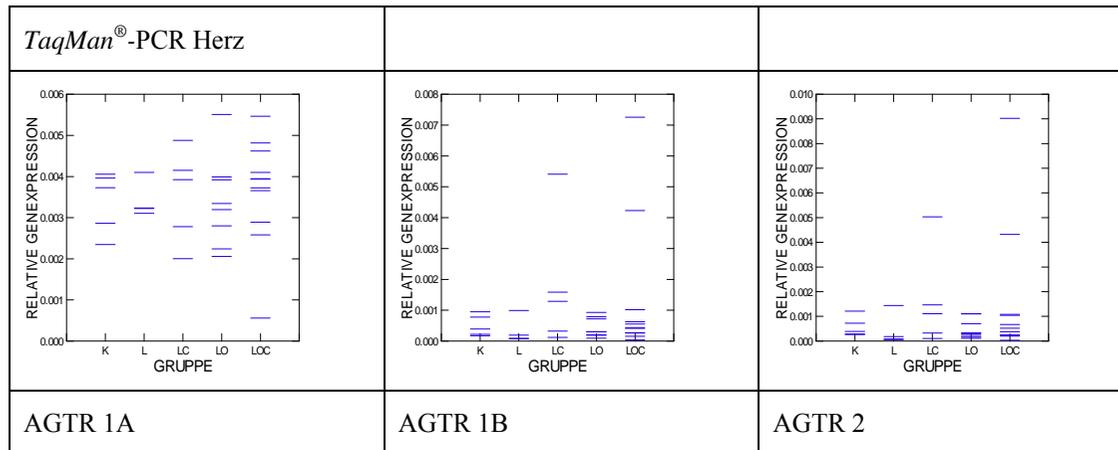
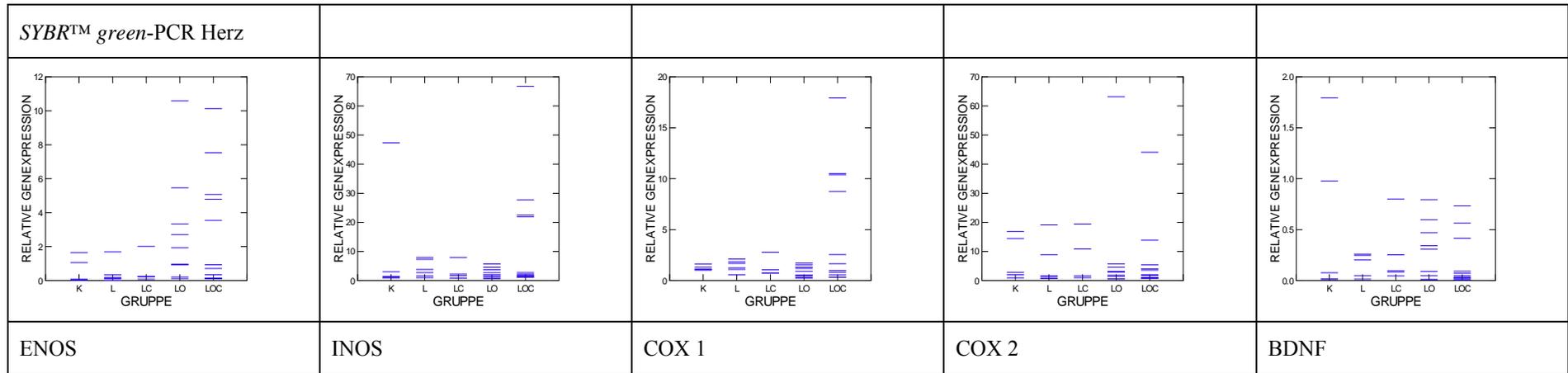
## 12.4 VERGLEICHE QRT-PCR - *SYBR*<sup>TM</sup> *GREEN* VERSUS *TAQMAN*<sup>®</sup>-SONDEN

### HERZGEWEBE

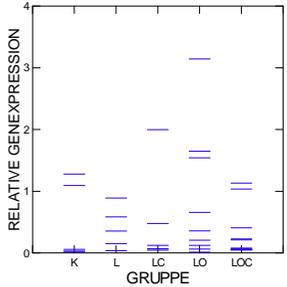
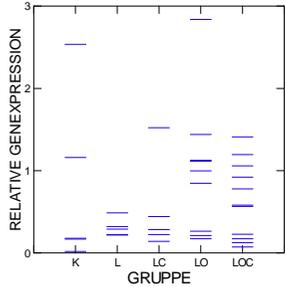
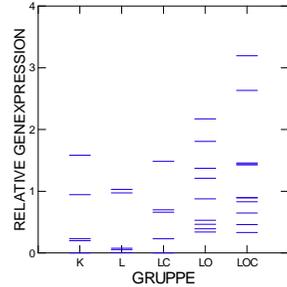
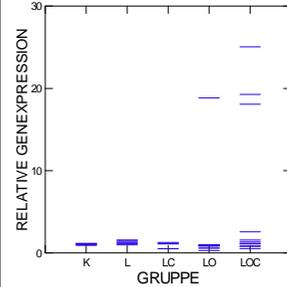
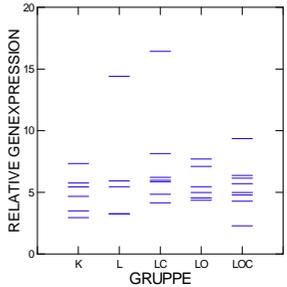
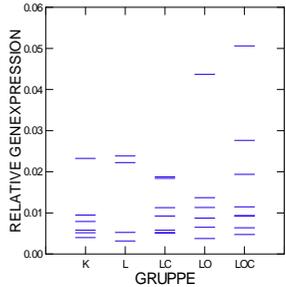
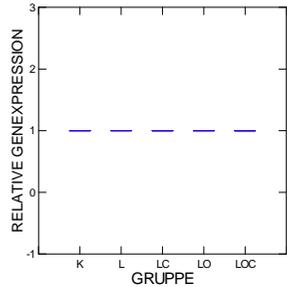
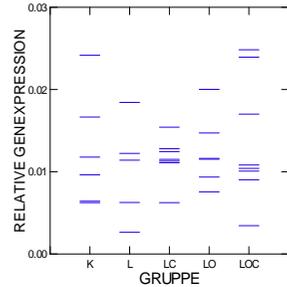
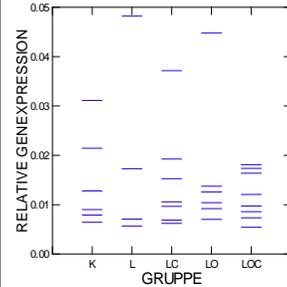
<i>SYBR</i> <sup>TM</sup> <i>green</i> -PCR Herz				
				
BAX	BCL 2	BEST	CASP 3	CASP 9
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> -PCR Herz				
				
BAX	BCL 2	BEST	CASP 3	CASP 9

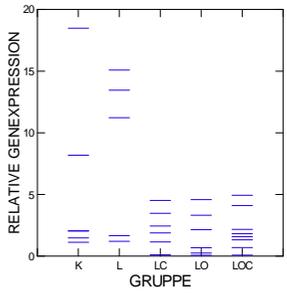
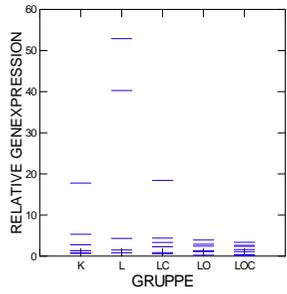
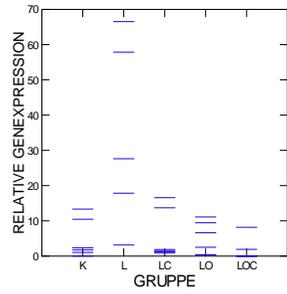
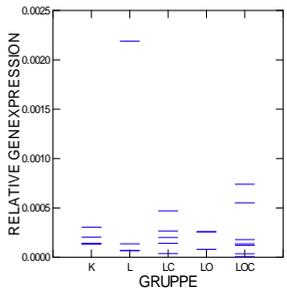
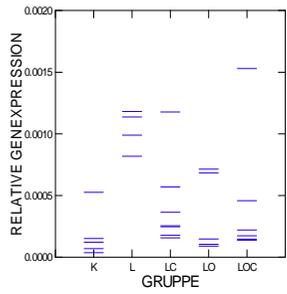
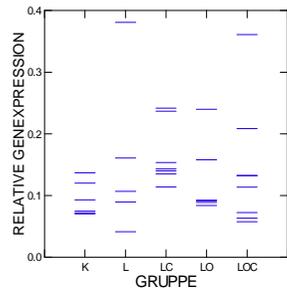
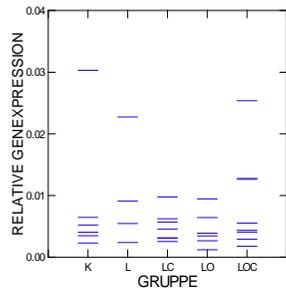
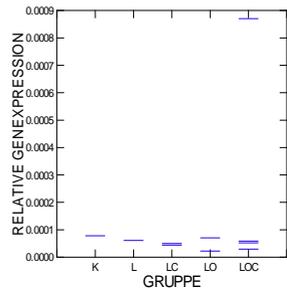
<i>SYBR™ green</i> -PCR Herz				
				
IL 10	IL 6	TGFB 1		
<i>TaqMan®</i> -PCR Herz				
				
IL 10	IL 6	TGFB 1	IL 1B	IL 2

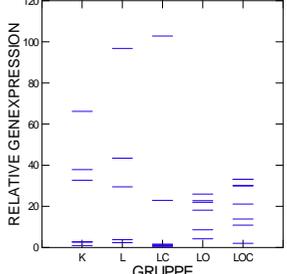
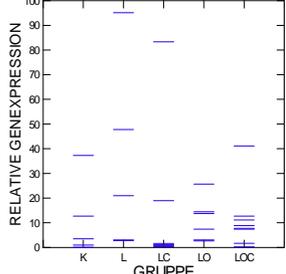
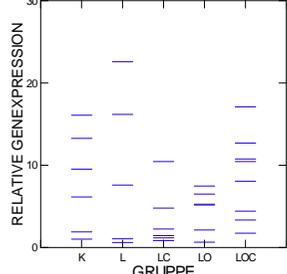
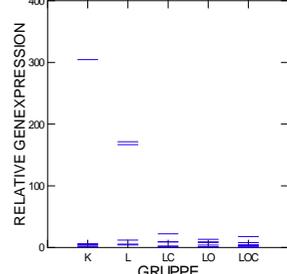
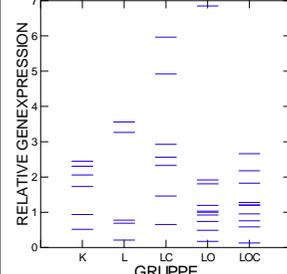
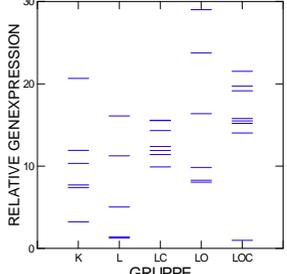
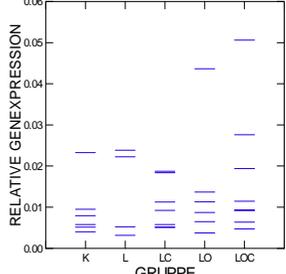
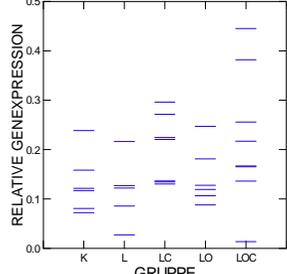
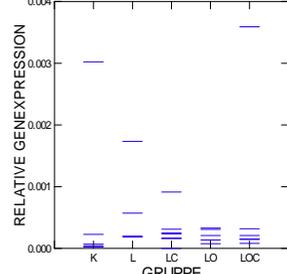
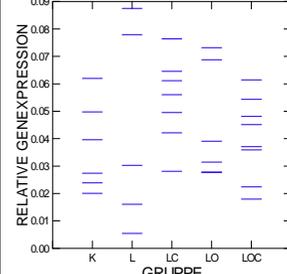
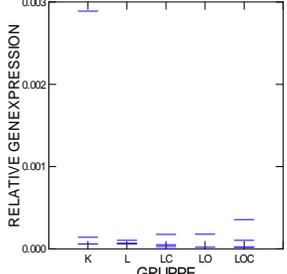
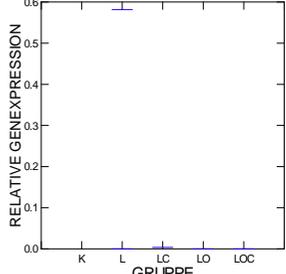
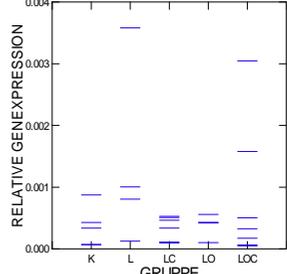




## AORTAGEWEBE

<i>SYBR™ green</i> -PCR Aorta				
				
BAX	BCL 2	BEST	CASP 3	CASP 9
<i>TaqMan®</i> -PCR Aorta				
				
BAX	BCL 2	BEST	CASP 3	CASP 9

<i>SYBR™ green</i> -PCR Aorta				
				
IL 10	IL 6	TGFB 1		
<i>TaqMan®</i> -PCR Aorta				
				
IL 10	IL 6	TGFB 1	IL 1B	IL 2

<i>SYBR™ green</i> -PCR Aorta				
				
COL 1A1	COL 3 A1	MMP 2	MMP 9	TIMP 1
<i>TaqMan®</i> -PCR Aorta				
				
COL 1A1	COL 3A1	MMP 2	MMP 9	TIMP 1
				
MMP 13	MMP 1A	MMP 8		

