

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Würzburg
- Lehrstuhl für vegetative Physiologie I -
Vorstand: Professor Dr. med. Michaela Kuhn

**Das atriale natriuretische Peptid hemmt den
vasokonstriktorischen Effekt von Angiotensin II in
der Mikrozirkulation durch die Aktivierung des
Regulators des G-Protein Signalweges 2**

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

vorgelegt von
Christian Höhne
aus Wertheim

Würzburg, April 2013

Referentin: Professor Dr. med. Michaela Kuhn

Koreferent: Professor Dr. med. Stefan Frantz

Berichterstatterin: Professor Dr. med. Stefanie Kürten

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2013

Der Promovend ist Zahnarzt

Eigene Beteiligung:

Die folgenden Experimente wurden selbstständig und vollständig von mir durchgeführt:

- Nichtinvasive Blutdruckmessungen an wachen Mäusen mittels Tail-Cuff Plethysmographie
- Präparation und Intravitalmikroskopie des Musculus cremaster von Mäusen

Von Frau Katharina Völker, Mitarbeiterin des physiologischen Instituts, durchgeführte Experimente:

- Invasive Messungen des Blutdrucks von Mäusen in der A. carotis und Infusion von Testsubstanzen über die V. jugularis

Würzburg, den 16.04.2013

Christian Höhne

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Physiologischer Hintergrund der Bedeutung des Herzens und der Blutgefäße für die Blutdruckregulation	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der Arteriolen	1
1.2	Rolle von Angiotensin II bei der Blutdruckregulation	2
1.3	Bedeutung der Regulatoren des G-Protein Signalwegs	3
1.3.1	RGS2 hemmt den G(α q)-Signalweg	3
1.3.2	Beziehung zwischen RGS2 und Ang II	4
1.4	Bedeutung des atrialen natriuretischen Peptids	5
1.4.1	Aufbau und Funktion des ANP-Rezeptors	6
1.5	Natrium-Nitroprussid ist ein potenter Vasodilatator	8
1.6	Fragestellungen und Ziele der Dissertationsarbeit	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Beschreibung der Versuchstiere und deren Genotyp	11
2.2	Nichtinvasive plethysmographische Messung des arteriellen Blutdrucks	11
2.2.1	Gewöhnungsphase der Mäuse an den Versuchsaufbau	11
2.2.2	Versuchsaufbau der plethysmographischen Blutdruckmessung .	12
2.3	Intravitalmikroskopie am Musculus cremaster	13
2.3.1	Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose	13
2.3.2	Präparation der Vena jugularis zur Aufrechterhaltung der Narkose	13
2.3.3	Präparation des Musculus cremaster zur Intravitalmikroskopie	14
2.3.4	Versuchsaufbau der Intravitalmikroskopie	14
2.3.5	Versuchsablauf und Testsubstanzen	17
2.3.6	Software zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers	18
2.4	Invasive Messungen des Blutdrucks in der A. carotis und Infusion von Testsubstanzen über die V. jugularis	21

2.4.1	Narkose der Versuchstiere durch Isofluran	21
2.4.2	Präparation der V. jugularis und A. carotis zur Infusion und Messung des arteriellen Blutdrucks	21
2.4.3	Versuchsaufbau der invasiven Blutdruckmessung	22
2.5	Berechnungen und Statistik	23
2.6	Weitere verwendete Programme	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Plethysmographische Blutdruckmessungen an Wildtypmäusen und Tieren mit RGS2-Deletion	25
3.2	Vitalmikroskopie des M. cremaster narkotisierter Mäuse zur Ermittlung des Durchmessers präkapillärer Arteriolen	26
3.2.1	Wildtyptiere weisen in Kontrollversuchen einen konstanten Gefäßdurchmesser auf	26
3.2.2	ANP hat in Wildtyptieren keinen Effekt auf den basalen Blutgefäßdurchmesser	29
3.2.3	SNP führt bei Wildtyptieren zu einer starken Vasodilatation .	31
3.2.4	Ang II führt bei Wildtyptieren zu einer deutlichen Vasokonstriktion	33
3.2.5	Superfusion mit 0.1 nM Ang II führt zu anhaltender Vasokonstriktion	35
3.2.6	ANP hebt den vasokonstriktorischen Effekt von Ang II bei Wildtyptieren auf	37
3.2.7	RGS2-defiziente Mäuse zeigen einen konstanten arteriolären Gefäßdurchmesser	39
3.2.8	An RGS2-KO Tieren hat ANP keinen Effekt auf die Ang II- vermittelte arterioläre Vasokonstriktion	40
3.2.9	Wirkung von ANP auf durch Ang II vorkontrahierte Arteriolen bei WT und RGS2-KO Mäusen im Vergleich	43
3.3	Invasive Messungen des Blutdrucks in der A. carotis	44
3.3.1	Effekte einer ANP-Infusion auf den mittleren arteriellen Blutdruck von Wildtyp- und RGS2-KO Mäusen	44
3.3.2	Bei WT-Tieren wird der systemische hypertensive Effekt von exogenem Ang II durch ANP antagonisiert	45
3.3.3	Bei RGS2-KO Tieren wird der hypertensive Effekt von Ang II durch ANP nicht signifikant vermindert	46

3.3.4	Systemische Effekte einer Ang II-/ ANP-Infusion bei Wildtyp- und RGS2-KO Tieren im Vergleich	48
4	Diskussion	49
4.1	Intravitalmikroskopie am M. Cremaster zur Darstellung der Effekte von Ang II und ANP in der Mikrozirkulation	49
4.1.1	Etablierung einer neuen softwaregestützten Methode zur Quantifizierung des Gefäßdurchmessers	50
4.1.2	Untersuchungen zu den vasokonstriktorischen Effekten von Ang II	51
4.1.3	Untersuchungen zu den vasodilatierenden Effekten von ANP	52
4.2	Untersuchungen zur Bedeutung von RGS2 als mögliche Schnittstelle für die reziproken Interaktionen zwischen Ang II und ANP	54
4.2.1	Mäuse mit globaler Deletion von RGS2 haben einen leicht erhöhten arteriellen Blutdruck und signifikante Bradykardie	56
4.2.2	Die vasokonstriktorischen und hypertensiven Effekte von Ang II waren an RGS2-KO Tieren unverändert	58
4.2.3	Die vasodilatierenden und hypotensiven Effekte von ANP waren an RGS2-KO Tieren vermindert	59
4.2.4	Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse	60
5	Zusammenfassung	61
5.1	Abstract	62
6	Literaturverzeichnis	73
7	Anhang	74
7.1	Material	74
7.1.1	Hersteller der Reagenzien / Substanzen	74
7.1.2	Hersteller der Versuchsaufbauten	74
7.1.3	Verbrauchsmaterial	75
7.2	Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen	76
7.2.1	Krebs-Pufferlösung	76
7.2.2	Narkoselösung	76
7.2.3	Fluoresceinisothiocyanat-Dextran Lösung	77
7.3	Abkürzungen	78
7.4	Abbildungsverzeichnis	82

1 Einleitung

1.1 Physiologischer Hintergrund der Bedeutung des Herzens und der Blutgefäße für die Blutdruckregulation

Das Herz versorgt den gesamten Organismus durch seine rhythmischen Kontraktionen mit den für ihn wichtigen Stoffwechselprodukten. Neben dieser grundlegenden physiologischen Funktion ist es selbst in der Lage, durch die von ihm gebildeten Hormone, den natriuretischen Peptiden (NPs), Einfluss auf den Blutdruck zu nehmen. Über das Herz wird in einem gewissen Rahmen ein gleichbleibender Blutdruck aufgebaut. Eine bedarfsorientierte Durchblutung wird hierbei durch Weitstellung (Vasodilatation) und Engstellung (Vasokonstriktion) der einzelnen Gefäße realisiert. Die Steuerung dieses Gefäßtonus wird durch zentrale und lokale Mechanismen reguliert. Das vegetative Nervensystem und verschiedene Hormone übernehmen hierbei die zentrale Steuerung. Die zentralen Mechanismen übernehmen als Hauptfunktion die Aufrechterhaltung eines ausreichenden Blutdrucks und ermöglichen damit erst den lokalen Mechanismen ihre Funktion. Diese lokale Regulation findet durch die Gefäße selbst statt. Dort erfolgt auch, je kleiner die Gefäße werden, der wesentliche Abfall des Blutdrucks. Hier beginnt die Mikrozirkulation des Blutgefäßsystems. Neben den Arteriolen sind ebenso Kapillaren, Venolen und die Lymphgefäße Bestandteil der Mikrozirkulation. Die größte Bedeutung bei der Regulation der Durchblutung und des Blutdrucks haben hierbei die Arteriolen. Sie unterscheiden sich in ihrer Anpassungsfähigkeit an veränderte Stoffwechselaktivitäten. Die Arteriolen der Skelettmuskulatur müssen sich kontinuierlich an äußerst unterschiedliche Rahmenbedingungen anpassen, die durch die Funktion des Skelettmuskels bedingt sind. Dies sind Phasen der Aktivität und Ruhe des Muskels. Deshalb wird vor allem hier eine angepasste dynamische Durchblutung benötigt. Dies macht die Arteriolen des Skelettmuskels zu einem idealen Untersuchungsobjekt für Veränderungen des Gefäßdurchmessers.

1.1.1 Aufbau und Funktion der Arteriolen

Als Arteriolen werden Blutgefäße bezeichnet, die in ihrem Durchmesser kleiner als $100 \mu\text{m}$ sind. Ihre Wand besteht aus drei Schichten. Zur blutführenden Seite wird die innerste Schicht der Arteriolen von der Tunica intima gebildet. Diese unterteilt sich wiederum in das Endothel und Subendothel. An das Subendothel schließt sich die Lamina elastica interna an und begrenzt den Übergang zur Tunica media mit

ihren glatten Muskelzellen. Obwohl die Tunica media nur schwach ausgeprägt ist, so ist sie doch in der Lage, durch die Kontraktion ihrer Muskelzellen die Arteriole vollständig zu verschließen. Dadurch kann die Durchblutung drastisch verringert werden, wie es zum Beispiel in nur wenig beanspruchtem Gewebe nötig ist. Arteriolen werden deswegen auch Widerstandsgefäße genannt, weil in ihnen der Reibungswiderstand des Blutes stark zunimmt, der Blutdruck und die Fließgeschwindigkeit hingegen abnehmen. Eine kleine Veränderung des Durchmessers führt zu einer erheblichen Veränderung des Blutdrucks. Die äußerste Schicht der Arteriole wird durch die Tunica adventitia gebildet. Durch sie wird die Arteriole mit dem sie umgebenden Gewebe verbunden.

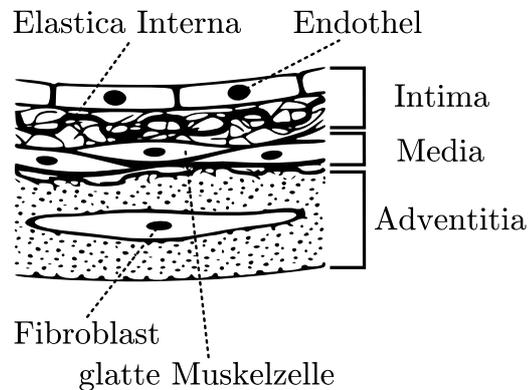


Abb. 1.1: Wandaufbau Arteriole

1.2 Rolle von Angiotensin II bei der Blutdruckregulation

Angiotensine gehören zu den Gewebshormonen. Sie sind Peptidhormone, die in der Leber durch enzymatische Spaltung gebildet werden. Das in der Leber gebildete Angiotensinogen wird enzymatisch durch Renin in Angiotensin I (Ang I) umgewandelt (Page et al., 1940)[65]. Ang I ist ein wichtiger Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Dieses nimmt eine bedeutende Funktion bei der Regulation des Blutdrucks und des Wasserhaushalts ein. Durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) wird das weitgehend inaktive Prohormon Ang I in Angiotensin II (Ang II) umgewandelt (Skeggs et al., 1956)[81]. Erst das so gebildete Ang II kann nun seine volle gefäßverengende Wirkung entfalten. Das gebildete Ang II besteht aus acht Aminosäuren und bindet an die Angiotensin-Rezeptoren vom Typ 1 und 2 (AT_1 und AT_2) an der Zelloberfläche (Hein et al., 1997; Allen et al., 2000)[32][2]. Die Bindung an den AT_1 -Rezeptor führt zu einem gesteigerten Sympathikustonus und einer verminderten Natriurese und Diurese, was wiederum den arteriellen Blutdruck erhöht (Sealey et al., 1990)[77]. Einzelne wichtige funktionelle Abläufe sind an dieser Stelle kurz erwähnt. Eine Aktivierung des AT_1 -Rezeptors führt zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur

von Blutgefäßen und damit zu einer Erhöhung des Blutdrucks. Dies bewirkt in der Niere vor allem eine Gefäßverengung der Vasa efferentia, also der von den Glomeruli wegführenden Gefäßen. Des Weiteren wird durch Ang II in der Nebenniere eine Freisetzung von Aldosteron und Adrenalin bewirkt. Eine andauernde Stimulation des AT₁-Rezeptors bewirkt eine Verstärkung mitogener Effekte und führt somit unter anderem zu einer Hypertrophie des Herzens. Das Wachstum von Kardiomyozyten und die Mitoserate von Fibroblasten wird so erhöht (Ito et al., 1993; Mazzolai et al., 1998; Wollert et al., 1999)[40][55][92]. Der AT₁-Rezeptor ist ein G-Protein ($G_{\alpha q}$) gekoppelter Rezeptor und kann durch den Regulator des G-Protein Signalweges 2 (RGS2) in seiner Funktion beeinflusst werden.

1.3 Bedeutung der Regulatoren des G-Protein Signalwegs

G-Proteine spielen für Körperzellen eine wichtige Rolle bei der schnellen Reaktion auf physiologische Einflüsse (Gu et al., 2009)[29]. Die Regulatoren des G-Protein Signalwegs (RGS) beschleunigen hierbei die Inaktivierung von G-Protein gekoppelten Signalwegen. RGS-Proteine bestehen aus einer annähernd 120 Aminosäuren umfassenden GTPase-aktivierenden-Protein-Domäne (GAP-Domäne) (Berman et al., 1996)[9] und können die durch G_{α} -vermittelte GTP Hydrolyse bis auf das 2000-fache steigern (Ross and Wilkie, 2000)[71]. Damit wirken RGS über eine Beschleunigung der Aktivität der GTPase. Dies geschieht durch eine schnellere Inaktivierung des Signals mit der folgenden Entfernung des Rezeptor-Agonisten. Des Weiteren wird auch eine verminderte GPCR (G-Protein-gekoppelter Rezeptor) Sensitivität des Agonisten bewirkt. Außerdem kann die GAP-Domäne des RGS-Proteins Signalwege blockieren, indem es die Bindung von G_{α} an nachgeschaltete Effektormoleküle unterbindet (Hepler et al., 1997)[33]. Die drei RGS-Proteine RGS2 (Siderovski et al., 1994)[79], RGS4 (Ruiz et al., 2010)[72] und RGS5 (Hamzah et al., 2008)[30] sind unter den am meisten im Herzen und Blutgefäßen exprimierten Proteinen. Sie befinden sich auf einer Region von Chromosom 1 (Wu et al., 1995; Seki et al., 1998; Sierra et al., 2002)[93][78][80], welche mit Veränderungen des Blutdrucks und Bluthochdruck in Verbindung steht (Saad et al., 2001)[74].

1.3.1 RGS2 hemmt den $G(\alpha q)$ -Signalweg

Über die Aktivierung von $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren werden vasokonstriktorische Effekte verschiedener Hormone vermittelt. Hierbei sind z. B. Angiotensin II (Ang II),

Endothelin, Noradrenalin und Vasopressin als Agonisten beteiligt. RGS2 blockiert den G_{α_q} -Signalweg, der im ganzen Gefäßsystem anzutreffen ist (Heximer et al., 1997)[36]. Die Bedeutung von RGS2 zeigt sich bei Studien an Tieren und Menschen, in denen der Blutdruck untersucht wurde. Mäuse mit einem fehlenden RGS2 Protein haben einen erhöhten Blutdruck (Heximer et al., 2003; Tang et al., 2003; Gross et al., 2005)[35][85][28]. Bei einer genaueren Betrachtung dieser Mäuse zeigte sich in einer Vielzahl von Geweben eine veränderte G-Protein Signaltransduktion. Unter anderem ist in diesen Mäusen der vasokonstriktive Effekt von Agonisten (s. o.), die über den G_{α_q} -Signalweg wirken, gesteigert (Heximer et al., 2003; Sun et al., 2005)[35][83]. Außerdem zeigen Mäuse mit fehlendem RGS2 Protein eine veränderte Reaktion auf eine Infusion mit Ang II und anderen Agonisten (Heximer et al., 2003)[35]. Dies kann teilweise durch einen verstärkten Effekt auf die Kontraktionsfähigkeit der Blutgefäße erklärt werden und wird hierbei durch G-Proteine vermittelt. Zunächst wurde dies an Blutgefäßen der Niere von Mäusen mit fehlendem RGS2-Protein nachgewiesen (Hercule et al., 2007)[34]. Des Weiteren spielt RGS2 eine wichtige Rolle bei der durch Stickstoffmonoxid vermittelten Vasodilatation (Tang et al., 2003; Sun et al., 2005; Obst et al., 2006)[85][83][61]. Stickstoffmonoxid (NO) hemmt die Vasokonstriktion über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I- α (cGKI- α). Diese bewirkt eine Dephosphorylierung der Myosin-leichten-Kette (MLK) und die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Ebenso katalysiert cGKI- α eine aktivierende Phosphorylierung von RGS2 und hemmt damit die Vasokonstriktion durch G_{α_q} -aktivierende Hormone (Tang et al., 2003)[85].

1.3.2 Beziehung zwischen RGS2 und Ang II

Es gibt zunehmend Anhaltspunkte, dass zwischen RGS2 und Ang II eine wechselseitige Beziehung besteht. Von RGS2 ist bekannt, dass es den Signalweg des AT_1 -Rezeptors inhibiert. Die Expression von RGS2-mRNA kann wiederum durch den Ang II Signalweg gesteigert werden. Dies wurde an verschiedenen kultivierten Zellen nachgewiesen (Grant et al., 2000; Cho et al., 2003; Calo et al., 2004)[27][15][13] und deutet darauf hin, dass RGS2 ein wichtiger Gegenspieler des durch Ang II vermittelten Signalweges ist. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die durch Ang II stimulierte Expression von RGS2 in der Lage ist, sowohl den Ang II Signalweg (Li et al., 2005) [49] als auch die Produktion von Aldosteron zu hemmen (Romero et al., 2006)[70]. Obwohl der detaillierte Mechanismus der Regulation von RGS2 noch nicht komplett verstanden wird, legen neue Erkenntnisse die Vermutung nahe, dass PLA_2 (Phospholipase A₂) dabei eine Rolle spielt (Xie et al., 2007)[94].

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass eine wechselseitige Beziehung zwischen RGS2 und Ang II besteht. Dies wird durch *in vivo* Studien untermauert, die zeigen, dass Tiere mit fehlendem RGS2-Protein empfindlicher auf den durch Ang II ausgelösten Bluthochdruck reagieren als Wildtyptiere (Hercule et al., 2007)[34].

1.4 Bedeutung des atrialen natriuretischen Peptids

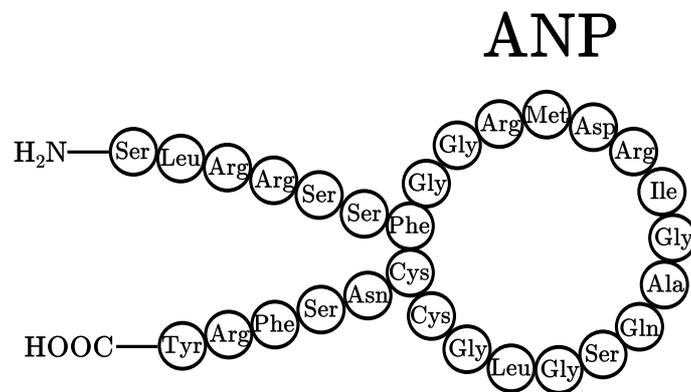


Abb. 1.2: Aminosäuresequenz des atrialen natriuretischen Peptids (ANP)

Das Herz produziert in den Muskelzellen seiner Vorhöfe, vor allem im rechten Vorhof, das atriale natriuretische Peptid (ANP) (Flynn et al., 1983; Brenner et al., 1990)[24][11]. Es wird dort in speziellen Granula gespeichert. ANP wird auch in den beiden Herzventrikeln produziert, aber in einem signifikant niedrigeren Maß (de Bold et al., 2001)[17]. Die ersten Experimente dazu wurden von de Bold mit einem Extrakt aus Herzatrien von Ratten durchgeführt (de Bold et al., 1981)[16]. Diese Versuche legten die Vermutung nahe, dass es in den Herzatrien einen potenten natriuretischen Faktor geben muss, da durch die Injektion dieses Gewebeextraktes natriuretische Effekte beobachtet wurden. Danach gelang die Isolierung und Sequenzierung von ANP (Kangawa et al., 1984; Zivin et al., 1984; Lewicki et al., 1986)[42][98][48]. ANP spielt eine bedeutende Rolle bei der Blutdruckregulation und der Herzkreislaufhomöostase durch seine Effekte auf die Nieren und das Gefäßbett (Epstein et al., 1998; D'Souza et al., 2004; Kuhn, 2004)[21][20][46]. ANP ist ein endogenes bioaktives Peptidhormon und besteht aus 28 Aminosäuren (Abb. 1.2). Es wird bei akuter und chronischer Dehnung des Myokards ausgeschüttet (de Bold et al., 2001)[17] und bewirkt eine Steigerung der Harnausscheidung über die Nieren und wirkt als ein Vasodilatator auf die glatte Muskulatur der Arteriolen. Es reguliert weiterhin die Bildung anderer Hormone wie zum Beispiel Glucocorticoide, Katecholamine

und Angiotensin II (Ruskoaho, 1992)[73]. Damit kann das Herz Einfluss auf das zirkulierende Blutvolumen nehmen und den Blutdruck senken.

1.4.1 Aufbau und Funktion des ANP-Rezeptors

Der spezifische Rezeptor für ANP, der membranständige Guanylylzyklase-Rezeptor vom Typ A (GC-A) (Nakao et al., 1992; Epstein et al., 1998)[59][21], wird in vielen Geweben exprimiert (Kuhn et al., 2003)[45]. Er besitzt eine extrazelluläre ANP-Bindungsdomäne und eine intrazelluläre Region bestehend aus einer Kinase-Homologen-Domäne und einer Guanylylzyklase-Domäne (Garbers et al., 1991, 1994; Potter et al., 2001)[25][26][68]. Die intrazelluläre Guanylylzyklase-Domäne wandelt freies Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosin-3'-5'-Monophosphat (cGMP) um (Abb. 1.3). Dieser Aufbau des Rezeptors erlaubt es, mit äußerst kurzen Bindungs- und Dissoziationsraten des Liganden auf kleinste Veränderungen der ANP-Plasmakonzentration zu reagieren. Durch die Aktivierung von GC-A erfolgt ein Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration (Lucas et al., 2000; Potter et al., 2006)[52][67]. cGMP wirkt als „second messenger“ und aktiviert weitere Mediatoren wie zum Beispiel Phosphodiesterasen (PDE II und PDE III), Ionenkanäle und die cGMP-abhängigen Proteinkinasen cGKI und cGKII. Über diese und weitere Signalträger werden komplexe Reaktionsketten beeinflusst und so die Funktionen der Zellen spezifisch verändert (Brenner et al., 1990; Anand-Srivastava et al., 1993)[11][5]. Nach der Aktivierung des Rezeptors unterscheiden sich die Signalwege von Zelle zu Zelle. Grundsätzlich führt ANP, über den GC-A-Rezeptor, zu einer Dämpfung des Renin-Aldosteron-Systems (RAS), einer Verminderung des Sympathikustonus sowie gesteigerter Natriurese und Diurese, was wiederum zu einer Blutdrucksenkung führt. Der Clearance-Rezeptor (NPR-C) ist für die Reaktionsstärke und Reaktionsdauer von ANP von großer Bedeutung. Dieser wird in erster Linie in der Niere synthetisiert und hat keine Guanylylzyklase-Domäne. Der NPR-C-Rezeptor übernimmt die Aufgabe der Steuerung des hormonellen Plasmaspiegels von ANP. Er bindet und internalisiert ANP zellulär und gestattet so den Abbau. Dieser Prozess und die renale Elimination nehmen nur wenig Zeit in Anspruch und so hat ANP deswegen nur eine durchschnittliche Plasmahalbwertszeit von 1 - 3 Minuten (Yandle et al., 1986; Maack et al., 1987; Almeida et al., 1989)[96][53][3]. In glatten Gefäßmuskelzellen aktiviert cGMP die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) und diese hemmt die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine. Es werden der Einstrom von Calcium und die Freisetzung von intrazellulärem

Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum gehemmt (Bahnon et al., 1993; Lucas et al., 2000)[7][52]. Hierbei spielen verschiedene Prozesse eine Rolle. Durch die Phosphorylierung des Inositol-1,4,5-trisphosphat-assoziierten-cGKI-Substrats (IRAG) wird die Calciumkonzentration gesenkt. IRAG ist ein mit dem IP_3 -Rezeptor verknüpftes cGMP-Kinase Substrat und bildet gemeinsam mit cGKI und dem IP_3 -Rezeptor I einen trimeren Komplex aus. Es befindet sich an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Schlossmann et al., 2000, Ammendola et al., 2001)[75][4]. cGKI phosphoryliert IRAG und hemmt damit den Calciumausstrom aus dem ER. Des Weiteren wird die Phosphorylierung von BK_{Ca} -Kanälen durch cGKI vermittelt. Dies führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle und bewirkt einen verstärkten Ausstrom von Kalium aus der Zelle. Dadurch kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Das so gesenkte Potential der Membran verringert die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungskontrollierter L-Typ Calciumkanäle (Hofmann et al., 2000; Bolz et al., 2003; Munzel et al., 2003)[37][10][58]. Außerdem hemmt cGKI die Funktion der Myosin-leichten-Kette (MLK) der glatten Muskulatur. cGKI phosphoryliert hierbei die Myosin-bindende Untereinheit der Myosinphosphatase und aktiviert so die Phosphatase (Hofmann et al., 2000; Schlossmann et al., 2003)[37][76]. Dann wird das kontraktile Protein Myosin dephosphoryliert und seine Interaktion mit Aktin beendet. Ebenso hemmt ANP das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System dadurch, dass Renin und Aldosteron vermindert freigesetzt werden (Brenner et al., 1990)[11]. Auch durch Caldesmon wird die Kontraktion von glatten Muskelzellen beeinflusst. Es ist ein Protein, das Calmodulin bindet und vermindert so die ATPase Aktivität von Myosin in glatten Muskelzellen (Cheung et al., 1980)[14]. Eine möglicherweise bedeutende Rolle spielt ANP bei der Regulation des AT_1 -Rezeptors für Ang II in der Mikrozirkulation. Ang II aktiviert die Kontraktion der glatten Muskulatur über den $\text{G}_{\alpha\text{q}}$ gekoppelten AT_1 -Rezeptor (Abb. 1.3). Der Regulator des G-Protein Signalwegs 2 (RGS2) ist ein negativer Regulator von $\text{G}_{\alpha\text{q}}$. Von RGS2 ist bekannt, dass er von cGKI phosphoryliert und stimuliert wird (Osei-Owusu et al., 2007)[64]. In der vorliegenden Dissertation wurde daher zunächst untersucht, ob ANP in der Lage ist, den vasokonstriktiven Effekt von Ang II zu hemmen. Außerdem stellte sich die Frage, ob ANP dem vasokonstriktorischen Effekt von Ang II durch die Aktivierung von RGS2 entgegenwirkt.

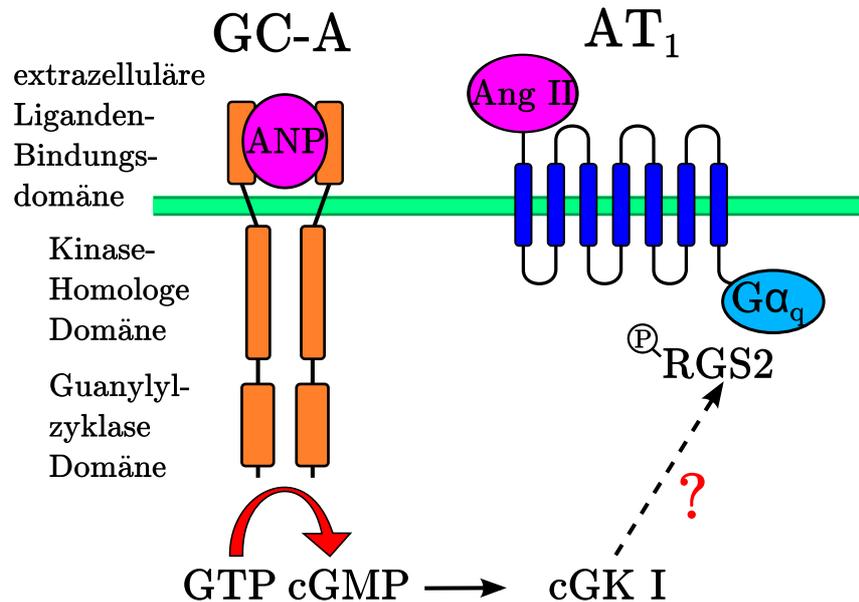


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Rezeptoren von ANP und Ang II. Außerdem ist der mögliche Mechanismus der in dieser Dissertation untersuchten Interaktion zwischen ANP und Ang II dargestellt.

1.5 Natrium-Nitroprussid ist ein potenter Vasodilatator

Natrium-Nitroprussid (SNP) ist eine stark blutdrucksenkende Substanz. In der glatten Muskulatur wirkt SNP über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Dies bewirkt vor allem eine starke Vasodilatation der Arterien, aber auch der Venen und eine Senkung des Blutdrucks (Khot et al., 2003)[43]. SNP wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten vergleichend zu ANP untersucht. Das von SNP freigesetzte NO erreicht durch Diffusion benachbarte glatte Gefäßmuskelzellen. Die lösliche Guanylylzyklase (sGC) wird dort durch NO aktiviert und stimuliert darüber die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in den „second messenger“ Guanosin-5-Monophosphat (cGMP). Durch das so gebildete cGMP werden die cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGKs) aktiviert (Derbyshire et al., 2009)[18]. Diese Proteinkinase unterteilen sich in zwei Isoenzyme. Im Zytosol von glatten Gefäßmuskelzellen aktiviert cGMP vor allem die Proteinkinase I (cGKI). Diese hemmt durch Phosphorylierung die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen. So wird z. B. der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle gesenkt und eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern verringert (Bahnon et al., 1993; Lucas et al., 2000)[7][52]. Durch diese Prozesse kommt es zur Vasodilatation und dies vor allem im Bereich der Widerstandsgefäße. Daraus resultiert dann eine Abnahme

des arteriellen Blutdrucks. Eine weitere Funktion von cGKI ist seine Wirkung auf ein Protein, das mit dem IP_3 -Rezeptor verbunden ist. Es wird als Inositol-1,4,5-trisphosphat-assoziiertes-cGKI-Substrat (IRAG) bezeichnet (Schlossmann et al., 2000, Ammendola et al., 2001)[75][4] und reduziert den Calciumausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum, der durch IP_3 ausgelöst wird. Eine weitere Wirkung von NO findet sich bei den BK_{Ca} -Kanälen der glatten Gefäßmuskelzellen (Mistry et al., 2009)[57]. Dort wird durch NO ein verstärkter Ausstrom von Kalium ausgelöst und es folgt eine Hyperpolarisation der Muskelzelle. Dadurch wird die Leitfähigkeit der spannungsabhängigen Calciumkanäle reduziert und es findet eine Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration statt. So kommt es zu einer Relaxation der Muskelzelle und das Gefäß dilatiert. Eine weiterer Effekt von cGKI bewirkt, dass die Myosin-leichte-Kette (MLK) der glatten Gefäßmuskulatur von cGKI phosphoryliert wird. Dies geschieht calciumunabhängig und führt zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Hofmann et al., 2000; Schlossmann et al., 2003)[37][76].

1.6 Fragestellungen und Ziele der Dissertationsarbeit

Der arterielle Blutdruck wird durch das Zusammenspiel der beiden Hormone ANP und Ang II reguliert und auch in vielen anderen physiologischen Systemen sind sie funktionelle Antagonisten. ANP übt über seinen cGMP generierenden GC-A-Rezeptor sehr gut bekannte blutdruckmindernde Effekte wie Gefäßrelaxation, Diurese, Erhöhung der endothelialen Durchlässigkeit und Hemmung des Sympathikustonus aus. Ang II dagegen hat gegenteilige Effekte in Form seiner vasokonstriktiven Wirkung auf Blutgefäße, seiner Erhöhung des Sympathikustonus und Verminderung der Natriurese und Diurese. Zu ihrer Interaktion im Bereich der blutdruckbestimmenden Widerstandsgefäße ist aber nichts bekannt. Daher wurden im Rahmen dieser Dissertation intravitalmikroskopische Studien der Mikrozirkulation des Musculus cremaster der Maus durchgeführt. Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Bedeutung des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) als funktioneller Antagonist von Angiotensin II (Ang II). Eine weitere Fragestellung war, ob diese Interaktion durch RGS2 vermittelt wird. Dazu wurden Experimente an Wildtypmäusen und Mäusen mit einem fehlenden RGS2-Protein (RGS2-KO) durchgeführt. Hauptziel dieser Dissertationsarbeit war die Untersuchung der Wirkung von Ang II und ANP auf die Mikrozirkulation *in vivo* und ob ein möglicher hemmender Effekt von ANP durch RGS2 vermittelt wird. Die Experimente wurden mittels lokaler Superfusion des Musculus cremaster in

Anlehnung an der von Baez (1973)[6] beschriebenen Methode durchgeführt. Es ist eine Untersuchungsmethode, mit der Arteriolen mit einem Durchmesser von 5 – 100 μm direkt *in vivo* beobachtet werden können. Um dies zu ermöglichen, war die Etablierung von Versuchen am M. cremaster nötig, sowie einer Methode zur Quantifizierung des Durchmessers der Arteriolen. In einem weiteren Teil dieser Dissertation wurden Blutdruckmessungen an wachen und an narkotisierten Mäusen durchgeführt, um die systemischen Effekte von Ang II und ANP auf den Blutdruck zu untersuchen. Hierbei wurde bei wachen Mäusen der Blutdruck mittels einer Schwanzmanschette gemessen. Diese Experimente wurden durchgeführt, um Einflüsse der Narkose auf die späteren Experimente besser abschätzen zu können. Später wurde bei narkotisierten Mäusen invasiv der Blutdruck über die A. carotis bestimmt. Ziel dieser Blutdruckmessungen war, die blutdruckregulierende Bedeutung der Effekte, die zuvor in der Mikrozirkulation festgestellt wurden, nachzuweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung der Versuchstiere und deren Genotyp

Alle Untersuchungen wurden an männlichen Mäusen durchgeführt. Als Kontrolltiere dienten Wildtypmäuse vom Stamm C57BL/6 aus der Tierhaltung des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg. Die Gruppe der genetisch veränderten Mäuse bestand aus männlichen Mäusen mit einem fehlenden Protein, dem Regulator des G-Protein Signalwegs 2 (RGS2), vom Institut für molekulare Biotechnologie in Wien (IMBA). Mäuse mit fehlendem RGS2 Protein (RGS2-KO) wurden zuerst von Oliveira-dos-Santos (Oliveira-dos-Santos et al., 2000)[62] generiert. Diese Mäuse wurden im Institut weitergezüchtet. Die Versuchstiere hatten ein Alter von 3 bis 8 Monaten und ein Gewicht von 21 bis 31 g. Alle Tiere wurden bei freiem Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser gehalten. Die Tierversuche wurden den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes entsprechend durchgeführt und waren durch die Regierung von Unterfranken genehmigt worden.

(Az. 55.2-2531.01-22/07)

2.2 Nichtinvasive plethysmographische Messung des arteriellen Blutdrucks

2.2.1 Gewöhnungsphase der Mäuse an den Versuchsaufbau

Um die Mäuse an die im wachen Zustand durchgeführten Messungen zu gewöhnen, wurden diese über einen Zeitraum von fünf Tagen jeweils in der gleichen Reihenfolge und zur gleichen Uhrzeit vorgenommen. Dies geschah auch, um den Einfluss tagesbedingter Schwankungen des Blutdrucks zu standardisieren. Diese Versuche erfolgten mit dem „Softron Indirect Blood Pressure Meter BP-98A“ (Firma SoftronTM, Tokio, Japan). Die Mäuse wurden während der Messung jeweils in einer zum Versuchsaufbau gehörenden Stofftasche fixiert. Man konnte sie eng um die Maus verschließen und sie endete am Schwanzansatz. Die Stofftasche wurde dann in eine auf 37°C vorgewärmte Kunststoffröhre gesetzt. Dies förderte die Durchblutung der hinteren Extremitäten. So verblieb die Maus zehn Minuten in Ruhe, bis in der Mitte des Schwanzes die Blutdruckmanschette angebracht wurde. Die plethysmographische Messung des Blutdrucks erfolgte minütlich an der Schwanzarterie über eine Dauer von fünfzehn Minuten. Die Blutdruckmanschette pumpte sich dabei automatisch auf 180 mmHg durch den Einstrom von Luft in den Cuff auf und unterbrach damit den Rückfluss des Blutes. Anschließend nahm beim Luftausstrom aus dem Cuff

der Manschettendruck wieder kontinuierlich ab und der Blutdruck und der Puls konnten durch die von der sich öffnenden Arterie auf die Manschette übertragenen pulsierenden Druckschwankungen durch einen integrierten Sensor bestimmt werden (Kuwahara et al., 1991)[47]. Nach den Vorversuchen wurde der Blutdruck über einen Zeitraum von einer Woche gemessen und der Mittelwert aller Werte gebildet.

2.2.2 Versuchsaufbau der plethysmographischen Blutdruckmessung

Die apparativen Komponenten wurden bei der Firma SoftronTM bezogen. Die Auswertung des Blutdrucks erfolgte mittels einer mitgelieferten Schnittstelle und einer Software, mit der die Blutdruckmessung auf einem PC aufgezeichnet werden konnte. Dieses computergestützte Blutdruckgerät wertet Herzfrequenz (HF), systolischen Blutdruck (SBD) und diastolischen Blutdruck (DBD) aus und berechnet aus diesen Daten automatisch den mittleren arteriellen Blutdruck (MBD).

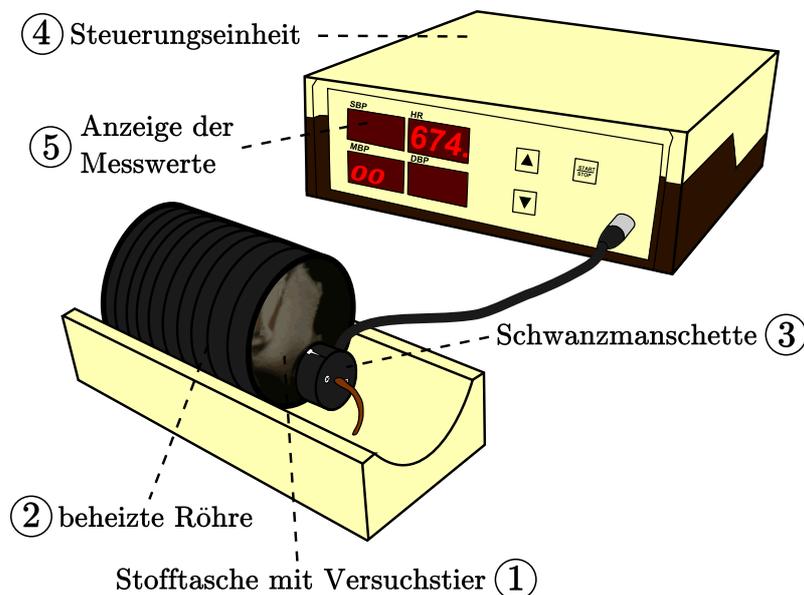


Abb. 2.1: Versuchsanordnung der plethysmographischen Blutdruckmessung: Bei diesem Versuchsaufbau befindet sich die Maus in einer Stofftasche (1), um mögliche Bewegungen zu verhindern. Diese Stofftasche wird in eine beheizte Röhre (2) geschoben. Die Blutdruckmanschette (3) wird dann an dem Schwanz der Maus befestigt und ist zur Auswertung mit einer Steuerungseinheit (4) verbunden. Die Messwerte werden nach der Blutdruckmessung angezeigt (5) und an einen PC übertragen.

2.3 Intravitalmikroskopie am Musculus cremaster

2.3.1 Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose

Zur Einleitung der Narkose wurde die in Tabelle 2.1 beschriebene Narkoselösung verwendet. Aus diesem Ansatz wurden initial 8 μl pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

Substanz	Konzentration	Dosierung initial	Dosierung Perfusor
Fentanyl	0.004 mg/ml	0.032 mg/kg KGW	0.01 mg/kg KGW/h
Midazolam	0.440 mg/ml	3.520 mg/kg KGW	1.10 mg/kg KGW/h
Medetomidin	0.044 mg/ml	0.352 mg/kg KGW	0.11 mg/kg KGW/h

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Narkoselösung

Nach ca. 10 Minuten war eine ausreichende Narkosetiefe erreicht. Nun konnte mit der Präparation auf dem Versuchstisch begonnen werden. Die rechte Vena jugularis wurde freipräpariert und kanüliert. Damit war es möglich während dem gesamten Zeitraum der Intravitalmikroskopie mittels einer Infusionspumpe eine konstante Tiefe der Narkose aufrechtzuerhalten. Bei diesen Versuchen betrug die Infusionsrate 2.5 μl je Gramm Körpergewicht pro Stunde. Am Ende des Experiments wurden die Tiere durch zervikale Dislokation euthanasiert.

2.3.2 Präparation der Vena jugularis zur Aufrechterhaltung der Narkose

Um ein Einbringen von Haaren in das zu präparierende Areal zu verhindern, wurden die Haare des Versuchstieres an der rechten Seite der Trachea mit Paraffinöl glattgestrichen. Danach wurde mit einem Hautschnitt an dieser Stelle die rechte V. jugularis chirurgisch freipräpariert und drei Ligaturen in Form von Schlingen um die V. jugularis externa gelegt. Die oberste Ligatur wurde sofort zugezogen und mittels zweier chirurgischer Knoten gesichert. Mit Hilfe einer mikrochirurgischen Pinzette wurde nun die Vene etwas angehoben und mit einer kleinen chirurgischen Schere inzidiert. Über diese Öffnung wurde die Vene mit einem ausgezogenen Polyethylenschlauch (Innendurchmesser ~ 0.28 mm) katheterisiert. Dieser war mit Anästhesielösung blasenfrei gefüllt. Nachdem die korrekte Lage im Lumen des Gefäßes durch Aspiration von Blut überprüft worden war, wurden die zwei verbliebenen Schlingen festgezogen und verknotet. Damit war gewährleistet, dass sich die Schlingen sowohl um das Gefäß als auch um den Katheter zusammenzogen.

Danach wurde mit der Präparation des M. cremaster begonnen. Während dem gesamten Versuch wurde die Narkose über diesen Zugang aufrechterhalten.

2.3.3 Präparation des Musculus cremaster zur Intravitalmikroskopie

Der rechte M. cremaster wurde nach der von Baez (1973)[6] beschriebenen Methode für die Intravitalmikroskopie freipräpariert. Zu diesem Zweck wurde der Hodensack der Maus am unteren Ende durch einen Hautschnitt geöffnet und dieser Schnitt dann bis in die Leistengegend fortgesetzt. Danach wurde das untere Ende des nun freiliegenden M. cremaster durch eine Halteklammer fixiert und vertikal aufgespannt und dann vom Bindegewebe befreit. Auf dem Arbeitstisch wurde nun der Muskel über ein Deckglas aufgespannt und der Muskelsack vorsichtig geöffnet. Mit weiteren vier Halteklammern wurden die Ränder des Muskels fixiert und über einen Silikonring gespannt. An den Halteklammern waren jeweils, über reibungsarme Fäden, Gewichte befestigt und deren Zugkraft wurde über einen halbkreisförmigen Rahmen umgelenkt. So konnte sichergestellt werden, dass während des Experiments die über die Klammern ausgeübte Kraft konstant blieb. Anschließend wurde das Ligament, das sich zwischen Cremaster und Hoden befindet, durchtrennt und der Hoden zurück in die Bauchhöhle geschoben. Eventuelle Blutungen, die durch die Eröffnung des Muskelsacks auftreten konnten, wurden vorsichtig kauterisiert.

2.3.4 Versuchsaufbau der Intravitalmikroskopie

Die Maus wurde auf einem in der Werkstatt des Instituts aus Plexiglas gefertigten Arbeitstisch gelagert (Abb. 2.2). Zur konstanten Kontrolle der Körpertemperatur wurde ein Temperaturfühler rektal eingeführt. Die Heizung des Tisches erfolgte indirekt über einen mit dem Tisch durch Schläuche verbundenen Vorratsbehälter mit temperiertem Wasser. Die Temperatur wurde so eingestellt, dass die rektal gemessene Temperatur der Maus 36°C betrug. Nach dem Befüllen des Vorratsgefäßes der Superfusionsanlage (siehe Abb. 2.3) mit Krebs-Lösung wurde dieses durch einen Silikonstopfen mit eingelassenem Metallrohr verschlossen. Das Rohr verhinderte ein Überlaufen und gewährleistete zudem eine andauernde, gleichmäßige Füllung des Hauptgefäßes. Während der Präparation und dem folgenden Versuch wurde der M. cremaster kontinuierlich mit einer Krebs-Pufferlösung superfundiert (Zusammensetzung siehe Tab. 2.2), um eine Austrocknung zu verhindern und die physiologischen Bedingungen aufrechtzuerhalten.

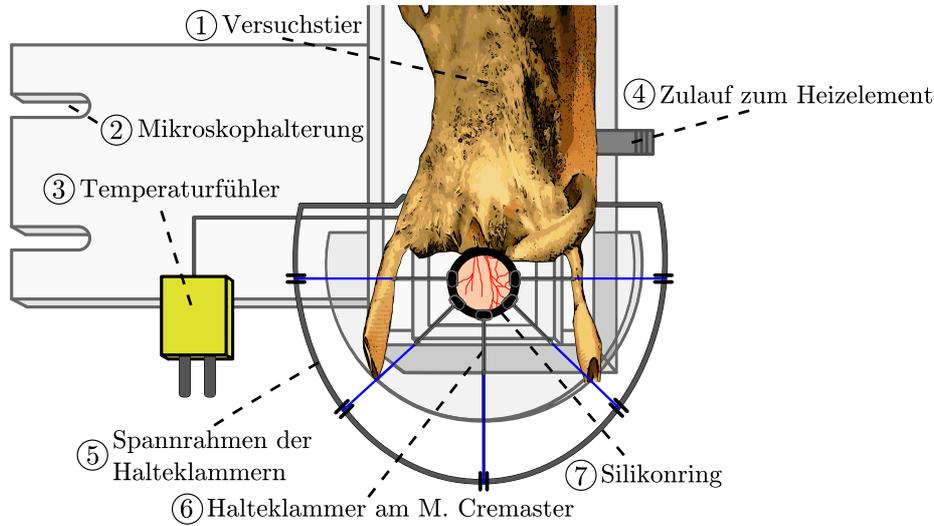


Abb.2.2: Aufbau des Versuchstisches und Positionierung der Maus mit freigelegtem M. cremaster: Auf der Abbildung ist das Versuchstier (1) zu sehen, das durch Klebeband an den Hinterbeinen auf dem Plexiglastisch befestigt wurde. Mittels einer Halterung (2) wurde der Plexiglastisch an dem Mikroskop befestigt. Über einen rektalen Temperaturfühler (3) wurde die Körpertemperatur der Maus kontinuierlich gemessen. Die Heizung des Tisches erfolgte über einen Zulauf (4), durch den erhitztes Wasser in eine Kammer unter der Maus gepumpt wurde. An einem Spannrahmen (5) wurden Halteklammern (6) am M. cremaster befestigt und dieser mit einem Silikonring (7) über den Tisch gespannt, um so eine Superfusion der Krebs-Lösung (siehe Tabelle 2.2) von allen Seiten zu gewährleisten.

Diese Lösung wurde mit einem Gemisch aus 95 % N₂ und 5 % CO₂ begast, um einen pCO₂ von ca. 40 mmHg zu erreichen. Die durch diesen Druck eingestellte CO₂-Konzentration und die in der Lösung vorhandene HCO₃⁻-Konzentration führten zu einem pH-Wert von 7.4, der im Verlauf der Experimente wiederholt kontrolliert wurde. Zusätzlich wurde diese Lösung über einen Wärmekreislauf auf 34°C erwärmt.

Bestandteile:

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM/l]
NaCl	58.44	120
KCl	74.56	4.7
KH ₂ PO ₄	136.1	1.2
CaCl ₂ x 2H ₂ O	147.0	2.5
MgSO ₂ x7H ₄ O	246.5	1.2
NaHCO ₃	84.01	20
Glucose	198.2	5.5

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Krebs-Pufferlösung

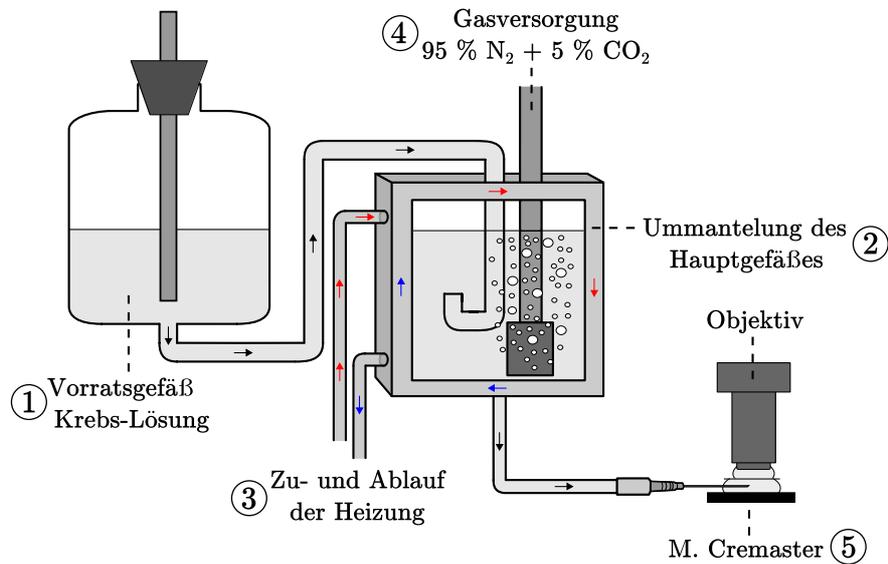


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau der Superfusionsanlage: Im Vorratsgefäß (1) befindet sich die noch nicht erwärmte Krebs-Pufferlösung. Diese wird in das Hauptgefäß (2) geleitet und dort auf eine gleichbleibende Temperatur (3) erwärmt. Des Weiteren wird hier die Pufferlösung über eine Gasversorgung auf einen konstanten pH-Wert von 7.4 eingestellt (4). Die so für den Versuch vorbereitete Lösung wird nun auf den M. cremaster (5) geleitet.

Um der Krebs-Lösung weitere Substanzen definiert zuzusetzen, wurde eine Infusionspumpe verwendet. Dies erfolgte erst kurz vor der für die Superfusion verwendeten Kanüle, da so einer Verunreinigung des Vorratsgefäßes mit den für die Versuche benötigten Substanzen sicher vorgebeugt werden konnte. Des Weiteren war so ein schneller Wechsel der Testsubstanzen möglich. Die Kanüle wurde so positioniert, dass ihre Spitze beim Blick durch das Mikroskop gerade noch am rechten unteren Bildrand zu sehen war. Damit konnte gewährleistet werden, dass sich im Beobachtungsfeld eine konstante, gleichbleibende Konzentration der Substanzen einstellte. Der sich über der Kanüle bildende Flüssigkeitsfilm wurde durch ein sehr dünnes Deckglas bedeckt, um einen gleichmäßigen hydrostatischen Druck auf den M. cremaster auszuüben. Die Fließgeschwindigkeit der Superfusionslösung wurde auf 1 ml/min eingestellt und vor jedem Versuch neu justiert. Bei allen angegebenen Konzentrationen handelt es sich um die auf den M. Cremaster einwirkenden Endkonzentrationen. Die präkapillären Arteriolen des Muskels wurden mit einem binokularen Mikroskop untersucht. An diesem war eine Kamera befestigt und es wurden im Abstand von fünf Minuten digitale Aufnahmen angefertigt. Außerdem wurde mittels einer Videokamera Filmmaterial aufgenommen. Der Gefäßdurchmesser der präkapillären Arteriolen wurde anschließend mit einem im

Rahmen der vorliegenden Dissertation entwickeltem Programm erfasst und normiert. Dieses Programm wird in Kapitel 2.3.6 näher beschrieben.

2.3.5 Versuchsablauf und Testsubstanzen

Im Anschluss an die Vorbereitungen und die Präparation der Maus wurde dem Versuchstier zur Darstellung der Mikrozirkulation der Plasmamarker Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-D) zu Versuchsbeginn über die Schwanzvene injiziert. Nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit Licht einer Wellenlänge von 496 nm emittiert dieser grünes Licht einer Wellenlänge von 520 bis 530 nm. So lässt sich die gesamte Mikrozirkulation des M. cremaster darstellen. Von diesem Farbstoff wurden 10 mg in 1 ml 0.9% NaCl gelöst und 3 μ l dieser Lösung pro Gramm Körpergewicht injiziert. Nach der Injektion wurde eine Stabilisierungsphase von 30 Minuten abgewartet. Im Zuge andauernder Beleuchtung kann es allerdings sukzessive zu einem Rückgang der Fluoreszenz kommen. Um diesem Effekt des Photobleichens entgegenzuwirken, wurden die Versuche in Dunkelheit durchgeführt. Auch der Fluoreszenzfarbstoff wurde im Dunkeln aufbewahrt, um ein vorzeitiges Ausbleichen zu verhindern. Zudem wurde nur ein eng fokussierter Bereich des Muskels beleuchtet und der sich in diesem Bereich befindliche Farbstoff wurde durch die Zirkulation des Blutes umgehend erneuert. Nun wurde damit begonnen einen geeigneten Gefäßausschnitt zu finden. Bei jedem Experiment wurde ein Bereich des M. cremaster zur Untersuchung gewählt, in dem mehrere präkapilläre Arteriolen mit verschiedenem Durchmesser untersucht werden konnten. Dies waren Arteriolen mit einem Durchmesser von 8-45 μ m. Eventuelle Blutungen, die durch die Eröffnung des Muskelsacks auftreten konnten, wurden kauterisiert. Arteriolen, die im Bereich dieser Blutungen lagen, wurden nicht in die Untersuchung aufgenommen. Wenn die Stillung der Blutung durch Kauterisierung nicht möglich war, wurde der Versuch umgehend abgebrochen, da andernfalls durch eine Blutung am Rand des M. cremaster das Fluoresceinisothiocyanat-Dextran markierte Blut, über die gesamte Oberfläche verteilt wurde. Dies hätte in der Folge, den vollständigen präparierten M. cremaster zum Leuchten gebracht und somit eine Gefäßerkennung unmöglich gemacht. Es wurde ein Versuchsbereich gewählt, der sich nicht im Randbereich des Muskels befand. Damit konnte die Reaktion der Gefäße auf präparationsbedingte Schäden annähernd ausgeschlossen werden. Nachdem nun ein geeigneter Versuchsbereich gefunden war, wurde über einen Zeitraum von 15 Minuten jede Minute ein Bild aufgenommen, bzw. konstant Videomaterial aufgezeichnet. Danach wurden im eigentlichen Versuchsteil im Abstand von fünf

Minuten Bilder aufgenommen. Nach diesen Vorbeobachtungen und der Selektion geeigneter Blutgefäße begann nun der Versuchsteil, in dem der M. cremaster mit verschiedenen Testsubstanzen superfundiert wurde. Die entsprechenden Substanzen, Konzentrationen und die jeweiligen Superfusionszeiten werden im Ergebnisteil näher beschrieben.

2.3.6 Software zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein Programm in Java™ entwickelt. Mit ihm ist es möglich, das während der Versuche gesammelte Bildmaterial auszuwerten, wobei sowohl einzelne Bilder als auch Filmsequenzen analysiert werden können.

Zunächst wurde anhand des vorliegenden Bildmaterials von jedem Versuch das auszuwertende Blutgefäß bestimmt. Die Kriterien zur Auswahl des Blutgefäßes sind die in Kapitel 2.3.5 beschriebenen. Bei dem Ausgangsbild zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die Gefäßwand markiert (Abb. 2.4 **A**). Durch diese Markierung wurde automatisch der Winkel berechnet, um den das Bild gedreht werden musste, um es waagrecht darzustellen. Diese Bildrotation geschah mit dem Ausgangsbild und allen weiteren folgenden Bildern, die im Abstand von fünf Minuten aufgenommen wurden. Damit war eine gleichmäßige Grundausrichtung des Blutgefäßes, dessen Durchmesser bestimmt werden sollte, gewährleistet. Nun wurde das Blutgefäß so zugeschnitten (Abb. 2.4 **B**), dass ausschließlich der vom Mikroskop scharf abgebildete Bereich ausgewertet wurde und somit angrenzende Bereiche ausgeblendet wurden. Um diesen Gefäßausschnitt auch bei den anderen Aufnahmen sicher aufzufinden, wurde ein Bezugspunkt gewählt. Durch diesen Bezugspunkt konnten mögliche Bewegungen des Gefäßes ausgeglichen werden. Dies war nötig, da es im Laufe des Versuchs zu Veränderungen der Positionierung des Objektivs bzw. der Maus kommen konnte. Der Grund dafür war, dass die Versuchsanordnung nicht vollkommen starr war. Anhand aufeinander folgender Aufnahmen wurde durch diesen Punkt immer der gleiche Ausschnitt des Blutgefäßes ausgewählt. Nach dem Zuschnitt des Bildmaterials (Abb. 2.4 **C**) konnte durch eine selektive Kantenerkennung automatisiert die Gefäßwand bestimmt und das Bild in ein Binärdatei umgewandelt werden (Abb. 2.4 **D**). Diese Bilddatei wurde nun spaltenweise analysiert und der Mittelwert der so erhaltenen Werte bestimmt. Dieser Wert repräsentierte den mittleren Gefäßdurchmesser in Bildpunkten (Pixel), der nun in das Auflösungsvermögen des Mikroskops umgerechnet werden musste und $0.3215 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ betrug.

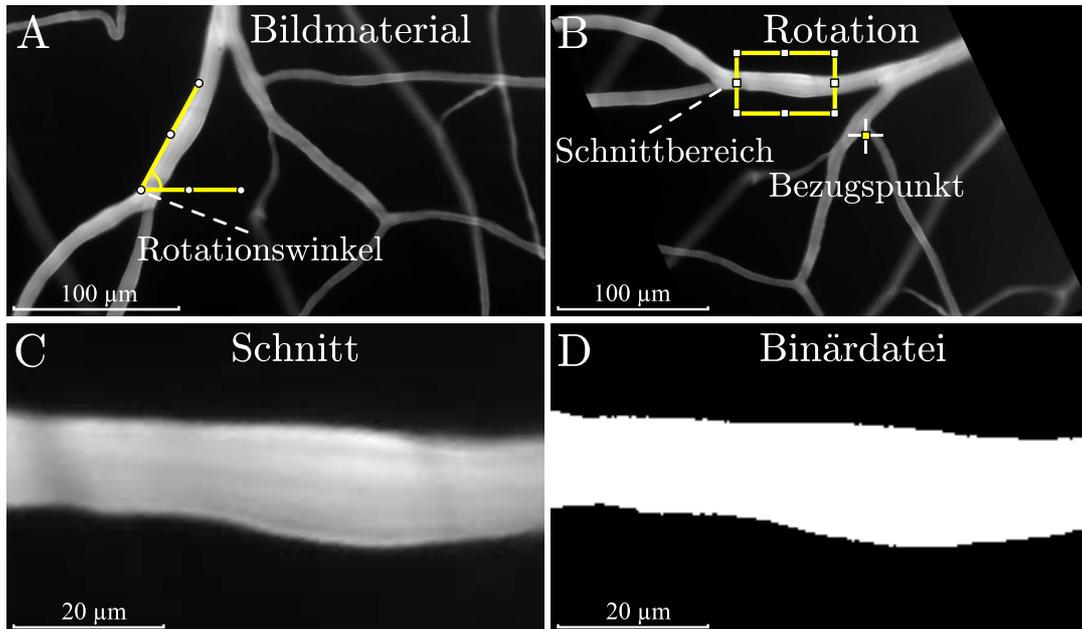


Abb. 2.4: Beispiel der Auswertung eines Blutgefäßes: In den oberen Abbildungen ist dargestellt, in welcher Weise die Software das Bildmaterial verarbeitet. In Abbildung (A) wurde die Gefäßwand markiert, um das Ausgangsbild so zu rotieren, damit das Blutgefäß waagrecht zum liegen kommt. Nach der Rotation wurde der auszuwertende Gefäßbereich markiert und ein Bezugspunkt (B) bestimmt. Er diene als Referenzpunkt bei der Auswertung der weiteren Aufnahmen. Der ausgeschnittene Bereich ist in (C) dargestellt. Nach der Kantenerkennung wurde eine Binärdatei ausgegeben (D), aus der dann der Mittelwert des Gefäßdurchmessers bestimmt werden konnte.

Beispiel der Auswertung eines Blutgefäßes in einem Versuch mit Natrium-Nitroprussid (SNP):

In Abbildung 2.5 ist an einem weiteren Beispiel dargestellt, wie diese Software genutzt werden kann, um etwa den Einfluss von SNP auf den Vasotonus zu analysieren. Bei diesem Versuch wurde nach der beschriebenen Stabilisierungsphase von 30 Minuten mit der Superfusion von SNP begonnen. Jeweils nach 10 Minuten wurde die Konzentration von SNP um eine Zehnerpotenz erhöht. Es wurde mit einer Konzentration von 10 nM begonnen, bis nach 40 Minuten eine Endkonzentration von 10 μM erreicht war. In der Zeit zwischen diesen Konzentrationszunahmen blieb die Konzentration konstant. In Abb. 2.5 ist in der Spalte mit der Binärdatei sehr gut die starke Vasodilatation zu erkennen, die bereits bei einer Gabe von 10 nM SNP innerhalb eines Zeitraumes von 10 Minuten ($t = 10$) eintritt. Der vasodilatatorische Effekt scheint für dieses Gefäß bei einer Konzentration von 1 μM sein Maximum erreicht zu haben.

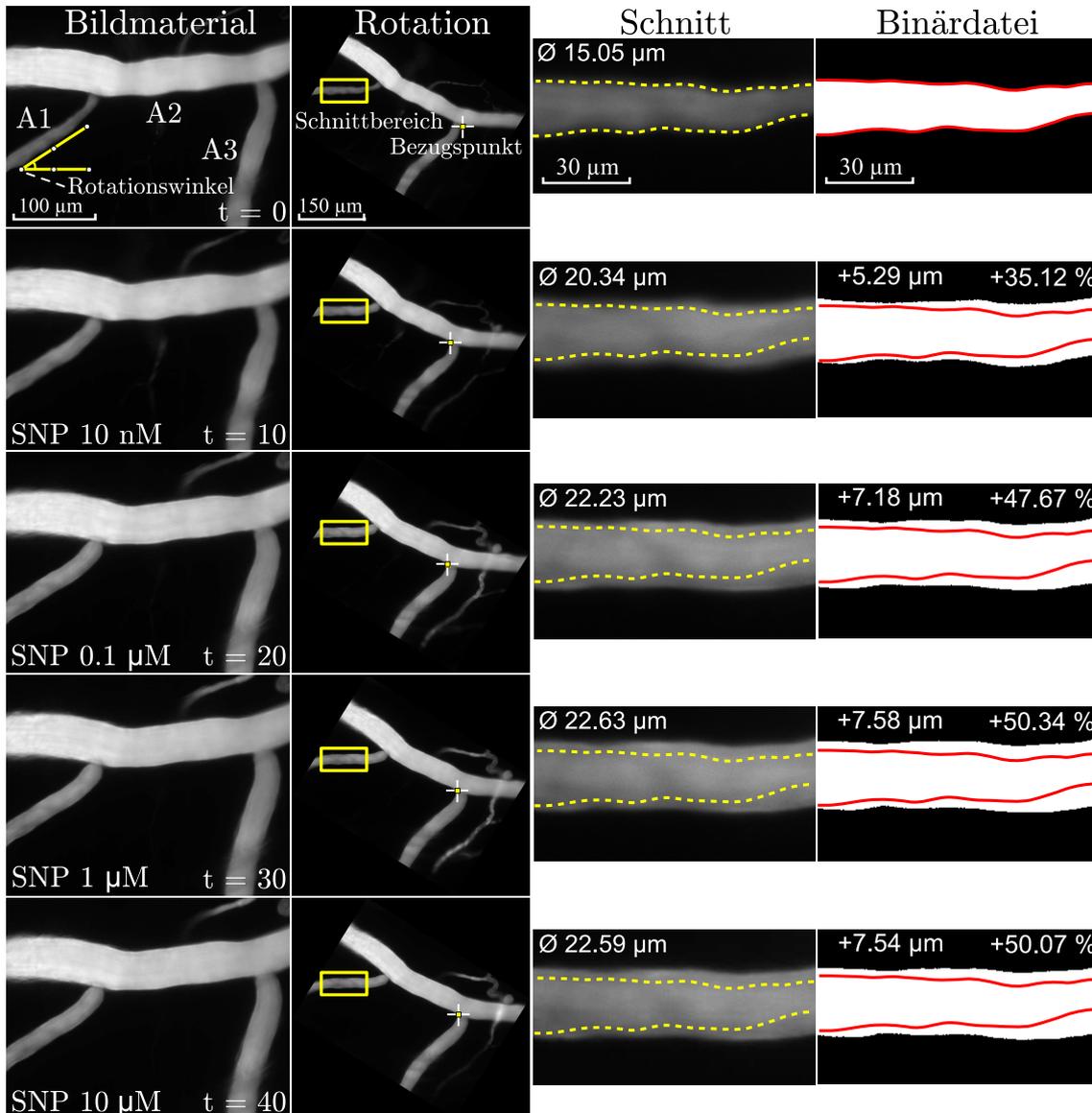


Abb. 2.5: Beispiel der Auswertung eines Superfusionsversuchs mit SNP: In der oben dargestellten Abbildung sind spaltenweise die von der Software verarbeiteten Aufnahmen dargestellt. Wie zuvor beschrieben wird zwischen dem Ausgangsbildmaterial, den Aufnahmen nach der Rotation, dem Zuschnitt des Materials und der Binärdatei unterschieden, aus der dann der Mittelwert bestimmt wurde. Nach der Rotation wurde der vom Mikroskop scharf abgebildete Bereich ausgewählt und zugeschnitten. In der Spalte „Schnitt“ sind des Weiteren Angaben zum jeweiligen mittleren Durchmesser des Gefäßes zu finden. Die Gefäßwand wurde durch eine gestrichelte gelbe Linie markiert und diese vom Ausgangsbild auf alle weiteren übertragen. Damit sind Veränderungen des Durchmessers besser zu erkennen. Die Gefäßwand wurde bei der Binärdatei analog mittels einer roten durchgezogenen Linie markiert. Es finden sich außerdem noch Angaben zur prozentualen Veränderung des mittleren Durchmessers in Bezug auf das Ausgangsbild und zur Veränderung des mittleren Durchmessers in μm .

Vorteile der Bestimmung des Gefäßdurchmessers mit diesem Programm:

Durch das vorliegende Verfahren können Fehler bei der Bestimmung des Durchmessers und der Position der Gefäßwand größtenteils ausgeschlossen werden. Damit ist es möglich ein Gefäß *in toto* zu analysieren, lediglich durch das Auflösungsvermögen des Mikroskops begrenzt. Auch eine Analyse einzelner Abschnitte des Gefäßes sind möglich, da durch die Festlegung von Bezugspunkten einzelne Positionen sicher aufgefunden werden können. Es wurden die jeweiligen Rotationswinkel, Schnittbereiche und Bezugspunkte zu jedem Bild automatisch aufgezeichnet. Dies erfolgte zur Dokumentation und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

2.4 Invasive Messungen des Blutdrucks in der A. carotis und Infusion von Testsubstanzen über die V. jugularis

2.4.1 Narkose der Versuchstiere durch Isofluran

Das Versuchstier wurde zur Einleitung der Narkose in eine Kammer aus Plexiglas überführt. Diese wurde in der Werkstatt des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg gefertigt. Durch eine Apparatur zur Inhalationsnarkose (VipTM 3000 - Isofluran) wurde die Kammer mit einem Gemisch aus Isofluran und Sauerstoff gefüllt. Durch Inhalation von 5 Vol.% Isofluran wurde die Narkose eingeleitet und danach während des gesamten Versuchsablaufs mit 2 Vol.% Isofluran aufrechterhalten. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe gewährleistet war, wurde das Tier auf den Versuchstisch gelegt, in Rückenlage an den Vorder- und Hinterbeinen mit Klebeband fixiert, und ein Aufsatz über die Schnauze der Maus geschoben. Mit diesem Aufsatz wurde der Maus weiterhin das Gasgemisch mit der Atemluft zugeführt. Damit war eine kontinuierliche und tiefe Narkose mit Isofluran gewährleistet. Nun konnte mit der Präparation der rechten Vena jugularis und der linken Arteria carotis begonnen werden. Nach Abschluss des Experiments wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation euthanasiert.

2.4.2 Präparation der V. jugularis und A. carotis zur Infusion und Messung des arteriellen Blutdrucks

Wie schon zuvor bei der Intravitalmikroskopie beschrieben (2.3.2), wurde die rechte Vena jugularis freipräpariert und kanüliert. Über dieses Gefäß wurde während der

Versuche die Infusion zunächst mit Ringer-Lactat und später mit ANP und Ang II eingeleitet. Zusätzlich wurde nun die linke Arteria carotis ebenso freipräpariert und kanüliert. Nach dem Glattstreichen der Haare über dem zu präparierenden Hautareal der linken Seite der Trachea mit Paraffinöl wurde durch einen Hautschnitt an dieser Stelle die linke Arteria carotis freigelegt. Mit einem ausgezogenen Polyethylenschlauch (Innendurchmesser $\sim 0.28\text{mm}$) wurde sie katheterisiert. Dieser war zuvor mit Kochsalzlösung blasenfrei gefüllt worden. Ebenso wie bei der Vena jugularis wurde dieser Katheter mit drei Seidenfäden am Gefäß fixiert. Dieses Blutgefäß wurde zur späteren Blutdruckmessung verwendet. Die korrekte Lage im Gefäßlumen konnte durch die Blutdruckmessung über diesen Zugang festgestellt werden. Nach dem Abschluss der Präparation wurde über den Zugang der Vena jugularis zunächst für 30 Minuten eine Volumensubstitution mit Ringer-Lactat Infusion eingeleitet. So konnte sich ein gleichmäßiger mittlerer arterieller Blutdruck einstellen. Danach wurden Ang II und ANP als Testsubstanzen über diesen Zugang eingeleitet. Diese Substanzen, sowie die entsprechenden Konzentrationen und Infusionszeiten, sind in den dazugehörigen Versuchen näher beschrieben.

2.4.3 Versuchsaufbau der invasiven Blutdruckmessung

Um die Körpertemperatur der Maus während der Versuche konstant zu halten, wurde rektal ein Temperaturfühler eingeführt. Durch eine an diesen Fühler gekoppelte, automatisierte Heizplatte konnte so die Körpertemperatur bei 36°C gehalten werden. Über die A. carotis wurde nun während der Experimente der Blutdruck gemessen und aufgezeichnet. Dies erfolgte unter Verwendung eines Statham-Drucksensors, der über einen Verstärker an einen Schnellschreiber angeschlossen war.

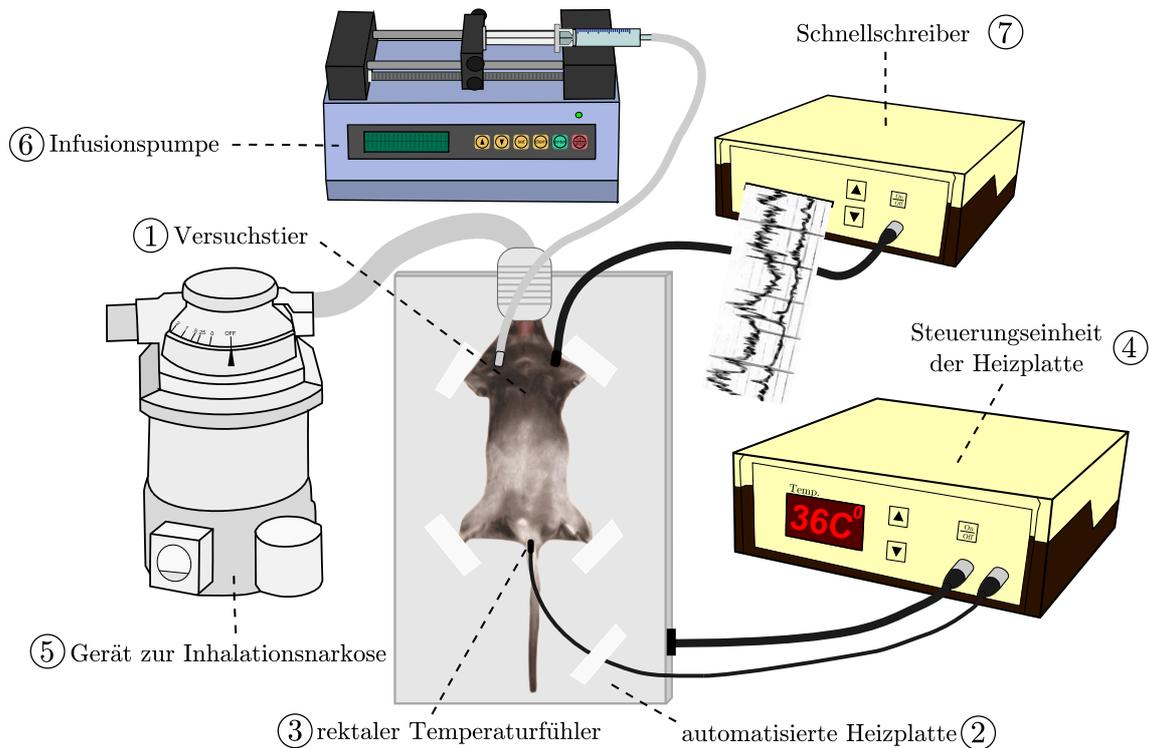


Abb. 2.6: Versuchsaufbau der invasiven Blutdruckmessung: Das Versuchstier (1) wurde in Rückenlage auf einer automatisierten Heizplatte (2) befestigt. Mit Hilfe eines rektalen Temperaturfühlers (3) wurde über eine Steuerungseinheit der Heizplatte (4) die Körpertemperatur der Maus konstant gehalten. Die Narkose erfolgte mit einem Gerät zur Inhalationsnarkose (5). Durch eine Infusionspumpe (6) wurden der Maus über die V. jugularis kontinuierlich die verschiedenen Testsubstanzen zugeführt. Blutdruckschwankungen wurden anhand eines Sensors über die linke A. carotis registriert und durch einen Schnellschreiber (7) aufgezeichnet.

2.5 Berechnungen und Statistik

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden mit Hilfe des Programms OpenOffice (v3.4.0 Apache Software Foundation) ausgewertet. Alle dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten unter Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM). Bei der Intravitalmikroskopie am M. cremaster wurden die Ergebnisse als eine Veränderung des mittleren Gefäßdurchmessers nach der Stabilisierungsphase von 30 Minuten in Prozent dargestellt.

Die Ergebnisse wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Änderung des Durchmessers (\%)} = (D_{Mt})/(D_{K0}/100)-100$$

Mit D_{Mt} wird der Durchmesser zur Zeit t beschrieben. D_{K0} steht für den Kontrolldurchmesser bei $t = 0$.

Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde der ungepaarte und für Vergleiche innerhalb einer Gruppe der gepaarte t-Test verwendet. Bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($p < 0.05$), wurden beobachtete Unterschiede als signifikant angesehen.

2.6 Weitere verwendete Programme

Das Bildmaterial wurde durch die mit dem Mikroskop gelieferte Software xcellence pro (v1.2) aufgenommen und gespeichert. Zur Betrachtung und weiteren Verarbeitung des Bildmaterials wurde ImageJ (v1.46e von Wayne Rasband) eingesetzt. Die eigentliche Auswertung und Berechnung der Ergebnisse erfolgte durch die in Kapitel 2.3.6 beschriebene Software (v1.4 von Christian Höhne). Für die Grafiken und Schaubilder wurde das Programm Inkscape (v0.48.2 Inkscape Community) verwendet. Zur Darstellung der Diagramme wurde OpenOffice (v3.4.0 Apache Software Foundation) eingesetzt. Die vorliegende Dissertation wurde mit dem TeXnicCenter (v2.0 Alpha4 von S. Wiegand, T. Weinkauff u.a.) in L^AT_EX (v2_ε von Leslie Lamport) und OpenOffice (v3.4.0 Apache Software Foundation) geschrieben. Die Literaturangaben wurde in L^AT_EX mit JabRef (v2.9.2 von Morten O. Alver, Nizar N. Batada u.a.) im BibTeX Format (v0.99d von Oren Patashnik) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Plethysmographische Blutdruckmessungen an Wildtypmäusen und Tieren mit RGS2-Deletion

Um den basalen Blutdruck zu bestimmen und diesen später mit den invasiven Messungen an Wildtypmäusen (WT) und Tieren mit einer genetischen Deletion des RGS2-Proteins (RGS2-KO) vergleichen zu können, wurden Versuche an wachen Mäusen mittels einer Blutdruckmanschette am Schwanz durchgeführt.

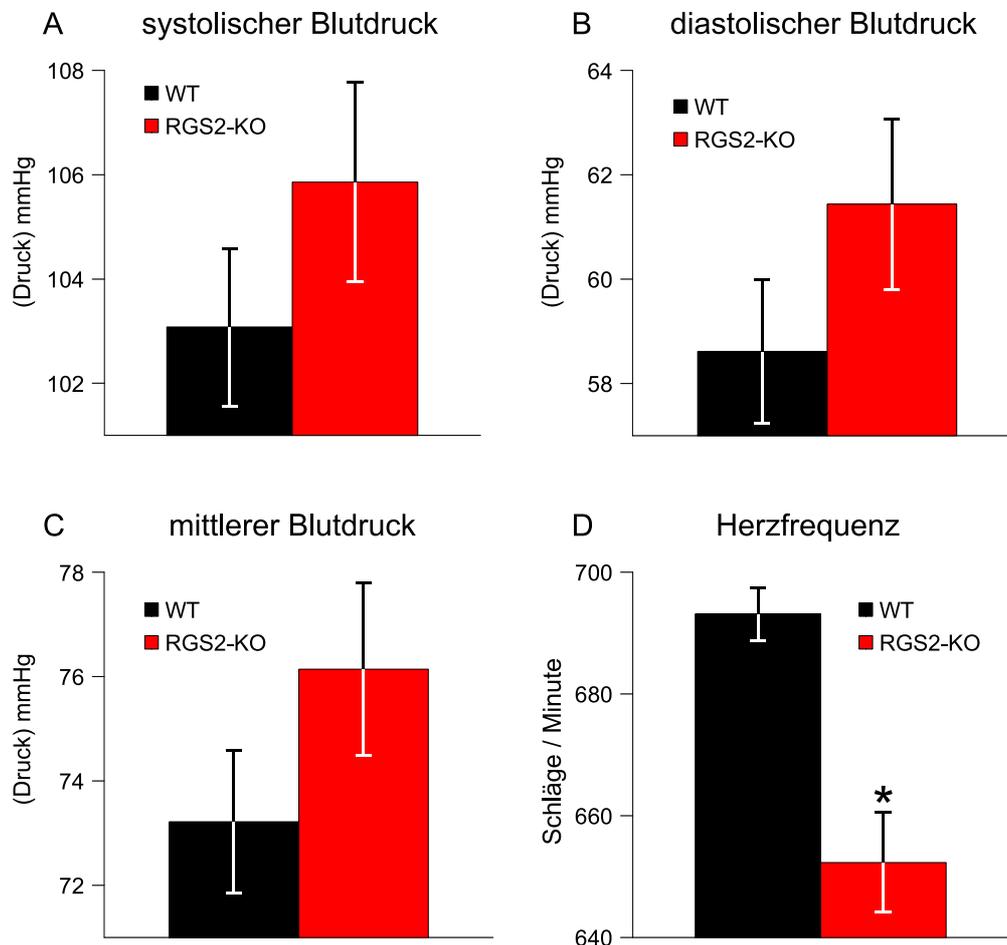


Abb. 3.1: In Abbildung A-C sind die verschiedenen Werte der Messungen des arteriellen Blutdrucks mittels einer Schwanzmanschette für den WT (N = 7) und RGS2-KO Mäusen (N = 9) dargestellt. Der Blutdruck in RGS2-KO ist zwar leicht erhöht, es konnten hier aber keine signifikanten Differenzen nachgewiesen werden. Bezüglich der Herzfrequenz (Abbildung D) besteht ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Genotypen (* $p < 0.01$). WT-Mäuse weisen eine Herzfrequenz von 693 (+/- 4) bpm (Herzschläge/min) auf und RGS2-KO eine von 652 (+/- 8) bpm.

Fazit: Die Ergebnisse dieser Versuche stimmen überein mit den Ausgangswerten, welche mittels der invasiven Blutdruckmessung an mit Isofluran narkotisierten Mäusen gemessen wurden (Kapitel 3.3). Durch diese Vorversuche an wachen Mäusen konnte kein Effekt der hier verwendeten Isoflurannarkose auf den Blutdruck festgestellt werden. Die zuvor publizierte Hypertonie der RGS2-KO Tiere konnte nicht bestätigt werden (Heximer et al., 2003; Tang et al., 2003; Gross et al., 2005)[35][85][28].

3.2 Vitalmikroskopie des M. cremaster narkotisierter Mäuse zur Ermittlung des Durchmessers präkapillärer Arteriolen

3.2.1 Wildtyptiere weisen in Kontrollversuchen einen konstanten Gefäßdurchmesser auf

Zunächst wurden Kontrollversuche durchgeführt. Das Ziel war zu überprüfen, ob die präkapillären Arteriolen über den geplanten Versuchszeitraum einen konstanten Gefäßdurchmesser beibehielten.

Der M. cremaster wurde in diesen Versuchen nur mit Krebslösung superfundiert. Nach einer Stabilisierungsphase von 30 Minuten wurden die für die weitere Auswertung geeigneten Gefäße bestimmt und über einen Zeitraum von maximal 55 Minuten mittels Intravitalmikroskopie kontinuierlich beobachtet. In Abbildung 3.2 ist ein Beispiel eines solchen Kontrollversuchs gezeigt, wobei einzelne Bilder durch die zuvor in Kapitel 2.3.6 beschriebene Software deckungsgleich zugeschnitten wurden. Aus dem vorliegenden Filmmaterial sind einzelne Aufnahmen, jeweils im Abstand von fünf Minuten, gewählt worden.

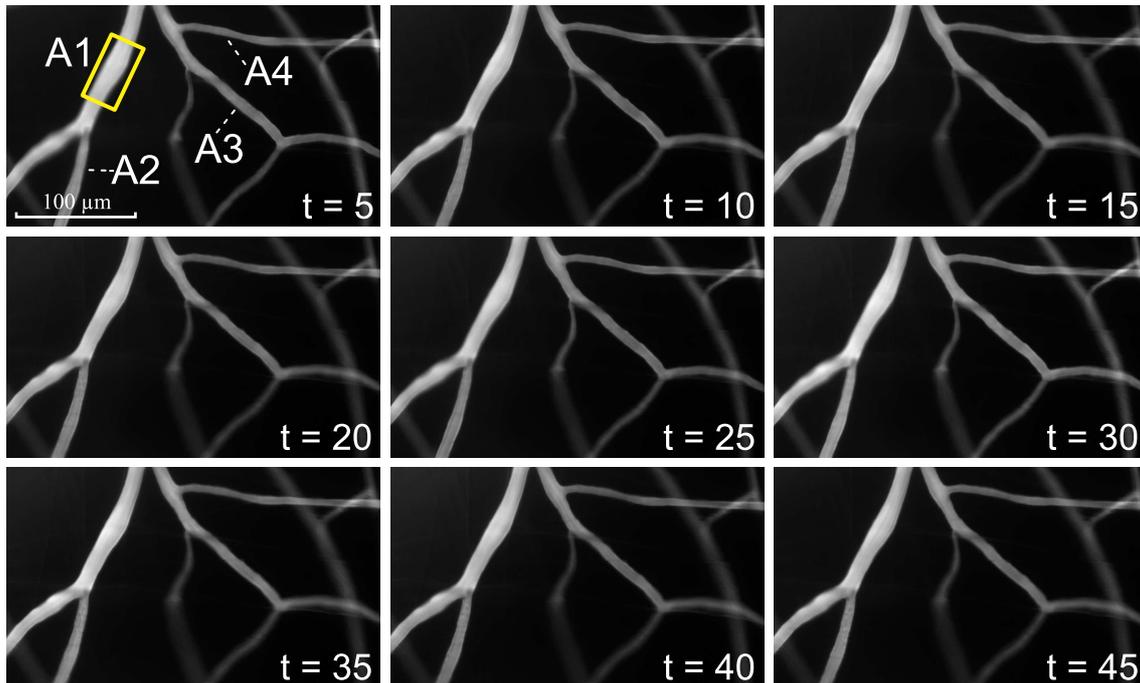


Abb. 3.2: Vitalmikroskopie des M. cremaster, Kontrollversuch bei einer Wildtypmaus: Die zur Auswertung herangezogenen Gefäße A 1-4 sind in der Abb. t = 5 markiert. Zusätzlich ist bei dem Blutgefäß A1 der in Abb. 3.3 analysierte Bereich markiert. Durch Einsatz des Plasmamarkers Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-D) sind die Blutgefäße klar von dem sie umgebenden Gewebe abgrenzbar. Beim optischen Vergleich der Aufnahmen sind keine Veränderungen der Durchmesser der einzelnen Gefäße über den Beobachtungszeitraum von 45 Minuten zu erkennen.

Beim Vergleich der einzelnen Bilder der oberen und der nächsten Abbildung und der gemessenen Werte wird deutlich, dass es bei diesem Blutgefäß, ausgehend von zunächst annähernd $14 \mu\text{m}$, zu keiner signifikanten Änderung des Gefäßdurchmessers über einen Versuchszeitraum von 45 Minuten kommt. Es konnte an allen ausgewerteten Versuchen bestätigt werden, dass der Gefäßdurchmesser der Blutgefäße während der Gesamtdauer der Versuche unter Basalbedingungen konstant bleibt.

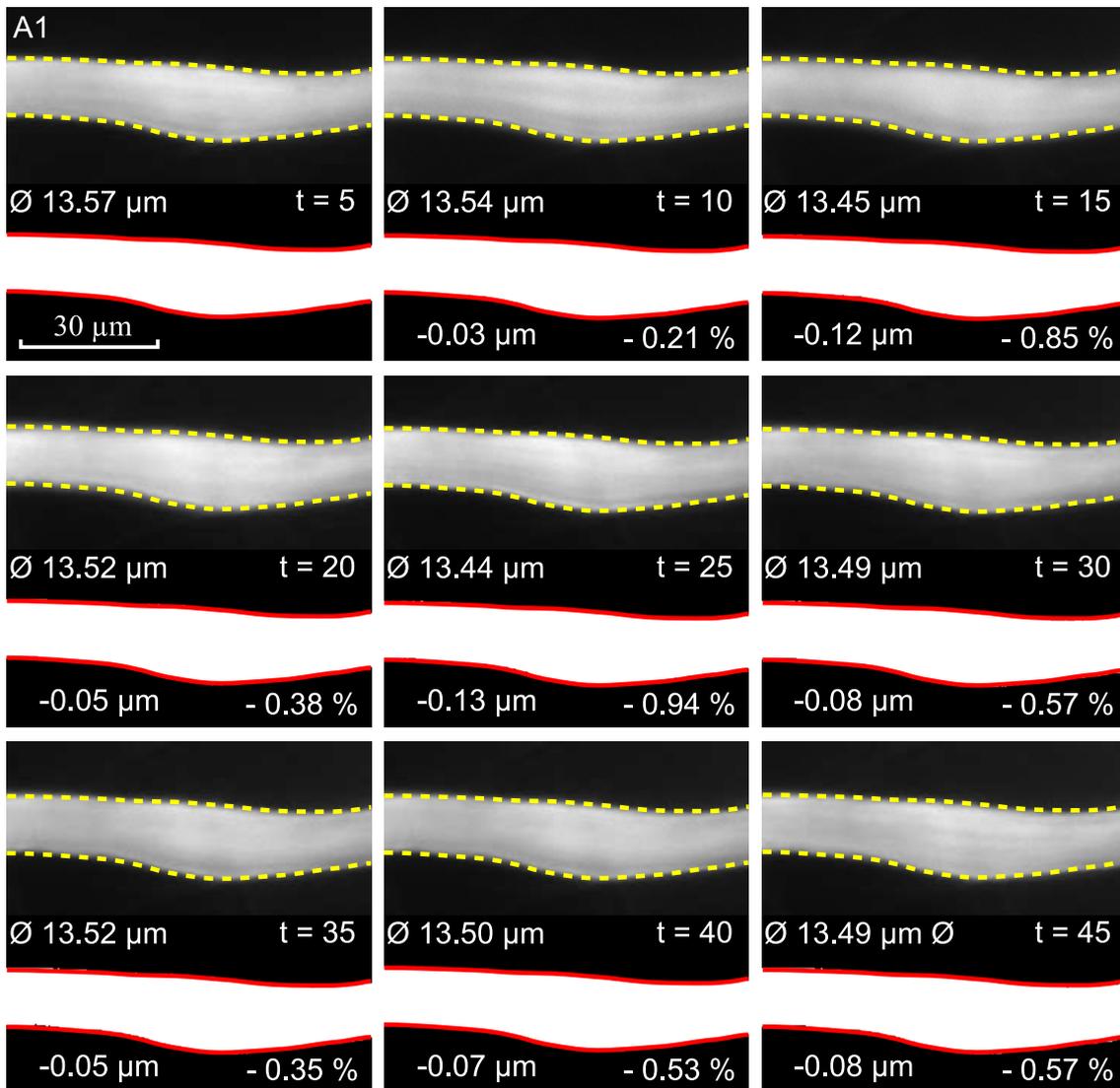


Abb. 3.3: Analyse des Kontrollversuchs bei einer Wildtypmaus: Diese Abbildung zeigt exemplarisch die nähere Analyse des in Abb. 3.2 ausgewählten Teilbereiches des Blutgefäßes A1. In der oberen Zeile ist das Gefäß mit den Angaben zum jeweils aktuellen Gefäßdurchmesser dargestellt. Die Gefäßwände sind bei $t = 5$ (Aufnahme 5 Minuten nach Versuchsbeginn) durch eine gestrichelte gelbe Linie markiert. Diese Markierung wurde auf die folgenden Bilder übertragen, um Veränderungen des Gefäßdurchmessers besser zu verdeutlichen. Die entsprechenden Binärdateien nach Kantenerkennung der Gefäßwände sind jeweils direkt unter den mikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Des Weiteren finden sich in der unteren Zeile Angaben zur prozentualen und totalen Veränderung des Gefäßdurchmessers, jeweils bezogen auf den Ausgangswert bei $t = 5$.

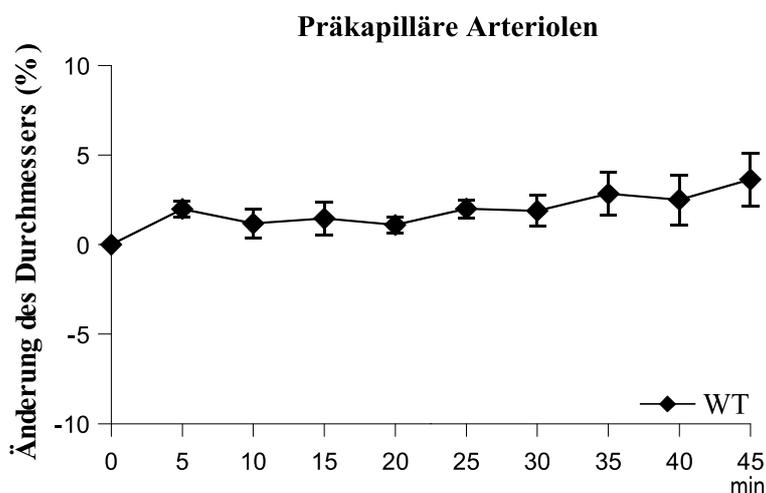


Abb. 3.4: Auswertung aller Kontrollversuche bei Wildtyptieren: In diesem Liniendiagramm ist die prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers über den Beobachtungszeitraum von 45 Minuten dargestellt. Es wurden die Gefäßdurchmesser von 13 präkapillären Arteriolen an 6 Wildtyptieren (WT) ausgewertet (N = 6, A = 13). Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 5 Minuten.

Fazit: Die Auswertung aller Kontrollversuche bei Wildtyptieren (Abbildung 3.4) zeigt, dass über den für die Versuche benötigten Zeitraum von 45 Minuten, der Gefäßdurchmesser in allen Versuchstieren in einem sehr engen Rahmen konstant bleibt. Damit ist es möglich, auch kleinste Veränderungen des Durchmessers, wie sie z. B. durch die Superfusion mit Testsubstanzen auftreten, nach der von Baez (1973)[6] beschriebenen Methode zu untersuchen. Wildtyptiere besitzen in den hier durchgeführten Versuchen für präkapilläre Arteriolen einen mittleren Durchmesser von $23,38 \mu\text{m}$ ($\pm 4,92 \mu\text{m}$).

3.2.2 ANP hat in Wildtyptieren keinen Effekt auf den basalen Blutgefäßdurchmesser

Um den Einfluss des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) auf den Durchmesser von präkapillären Arteriolen des M. cremaster zu untersuchen, wurde Wildtyptieren synthetisches ANP (1 nM - 1 μM) als Testsubstanz superfundiert.

Der Muskel wurde über die beschriebene Stabilisierungsphase von 30 Minuten nur mit Krebs-Lösung superfundiert. Danach wurde jeweils 1 nM ANP zugegeben und diese Konzentration im Abstand von 15 Minuten gesteigert, bis nach 55 Minuten eine Endkonzentration von 1 μM erreicht war. Diese höchste Konzentration wurde dann für 10 Minuten aufrechterhalten. Abbildung 3.5 gibt ein Beispiel eines solchen Versuches wieder.

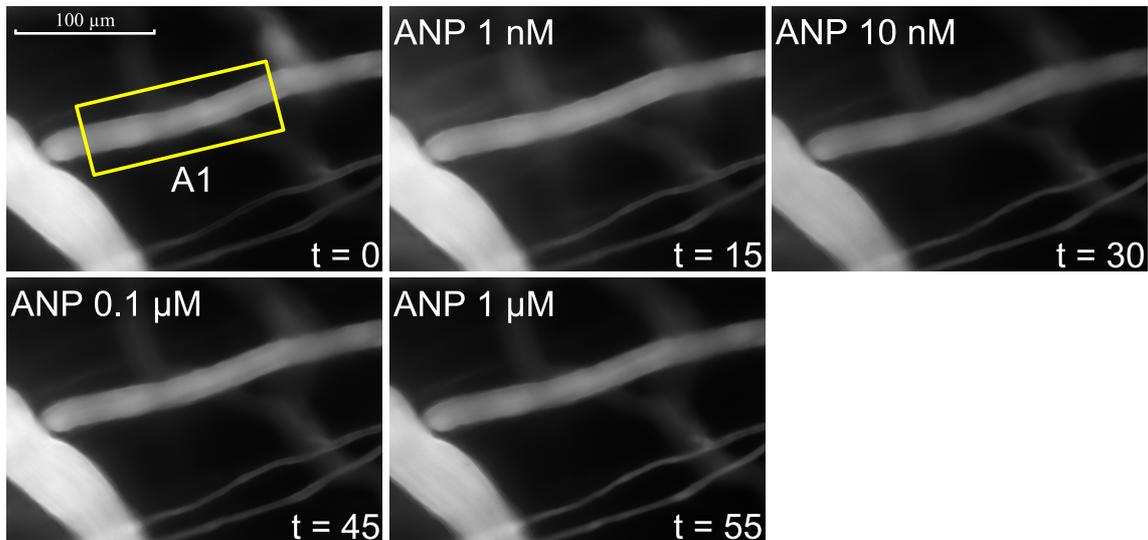


Abb. 3.5: Einfluss von ANP auf den Blutgefäßdurchmesser des M. cremaster bei einer Wildtypmaus: Angegeben sind jeweils die vorliegende ANP-Konzentration. Der in Abb. t = 0 gelb gekennzeichnete Bereich wird in Abb. 3.6 analysiert. Es ist kein signifikante Veränderung des Gefäßdurchmessers erkennbar.

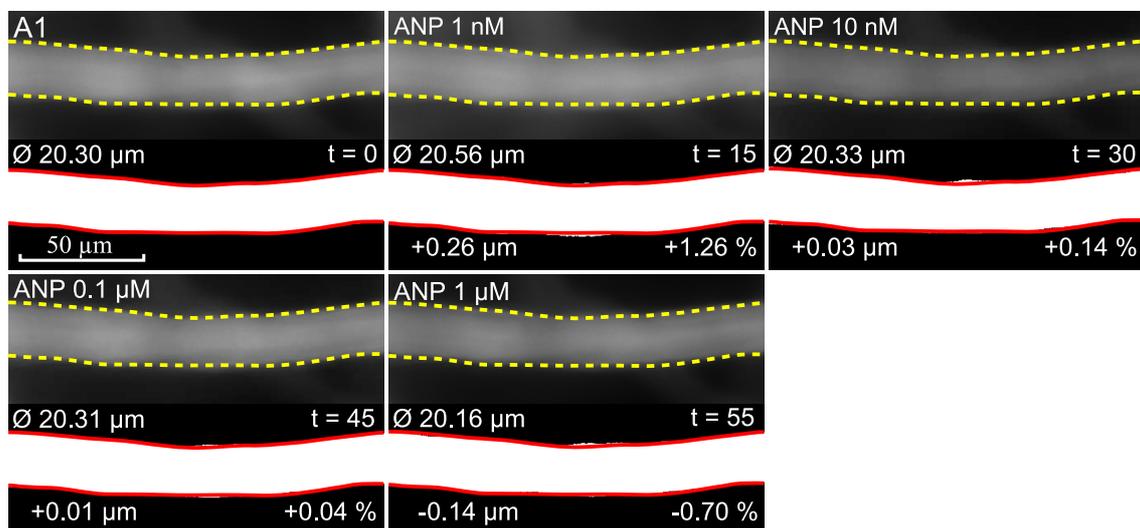


Abb. 3.6: Analyse des ANP-Effektes auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes: Hier ist das von der Software analysierte Bildmaterial (Abb. 3.5) dargestellt. Beim Vergleich der ausgewerteten Einzelaufnahmen ist kein Unterschied zu den zuvor durchgeführten Kontrollversuchen zu erkennen (Abb. 3.3)

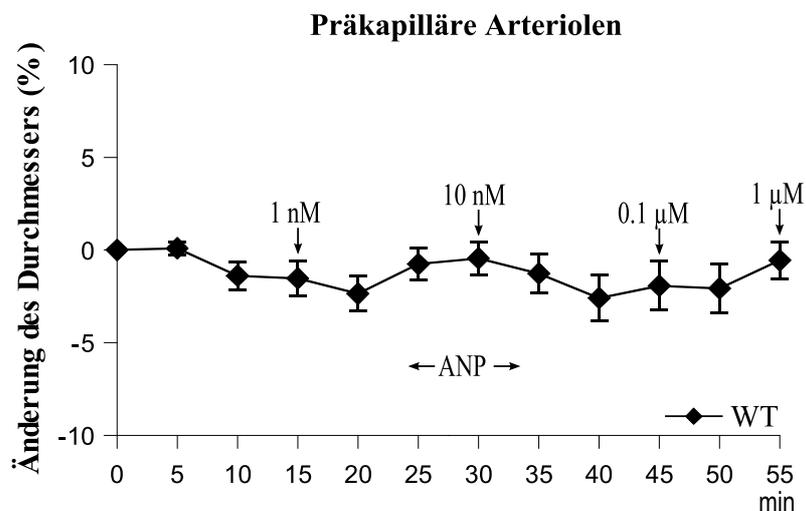


Abb. 3.7: Auswertung aller Versuche mit einer ANP-Superfusion bei Wildtyptieren: In diesem Diagramm ist die prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers über den Beobachtungszeitraum von 55 Minuten dargestellt. Es wurden die Gefäßdurchmesser von 11 präkapillären Arteriolen an 5 Wildtyptieren (WT) ausgewertet ($N = 5$, $A = 11$). Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 5 Minuten. Nach jeweils 15 Minuten wurde die Konzentration von ANP um eine Größenordnung erhöht.

Fazit: Bei der Superfusion mit ANP zeigte sich, unabhängig von der ANP-Konzentration, kein signifikanter Effekt von ANP auf den Gefäßdurchmesser.

3.2.3 SNP führt bei Wildtyptieren zu einer starken Vasodilatation

An Wildtyptieren wurden Versuche mit Natrium-Nitroprussid (SNP) (10 nM - 10 μ M) durchgeführt. SNP wurde bei den späteren Versuchen mit ANP als Positivkontrolle für eine Vasodilatation verwendet. Ziel dieser Vorversuche war, eine geeignete SNP-Konzentration für die späteren Experimente zu ermitteln.

Über die beschriebene Stabilisierungsphase von 30 Minuten wurde der M. cremaster nur mit Krebs-Lösung superfundiert. Danach wurde jeweils 10 nM SNP zugegeben und diese Konzentration im Abstand von 10 Minuten gesteigert, bis nach 40 Minuten eine Endkonzentration von 10 μ M erreicht war. Abbildung 3.8 gibt ein Beispiel eines solchen Versuches wieder. Dieses Beispiel für den Effekt von SNP auf den Vasotonus zeigt deutlich, dass mit steigender SNP-Konzentration vor allem bei kleinen Blutgefäßen eine ausgeprägten Vasodilatation auftritt. So ist bei Gefäß A1, im Gegensatz zu A2, eine viel deutlichere Vasodilatation zu beobachten.

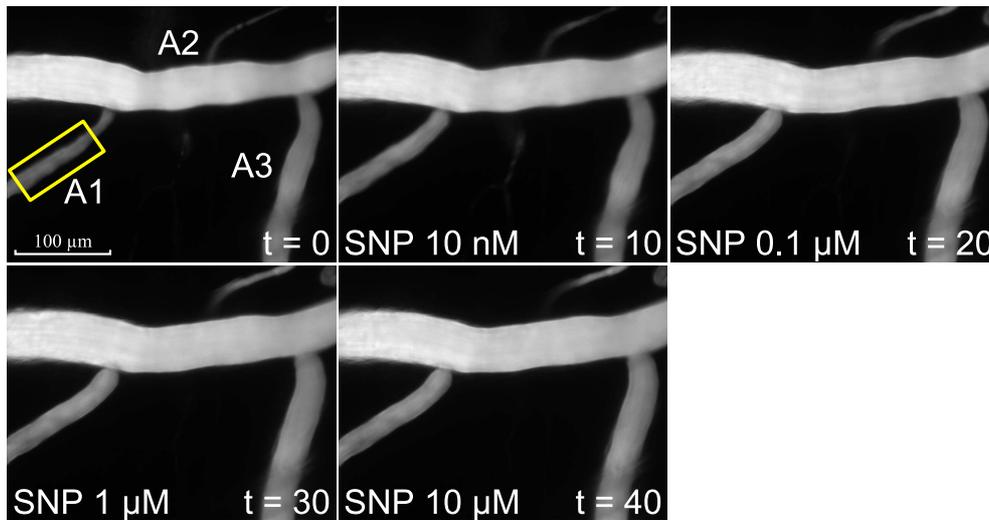


Abb. 3.8: Einfluss von SNP auf den Blutgefäßdurchmesser des M. cremaster bei einer Wildtypmaus: Auf dem Bild zu Versuchsbeginn ($t = 0$) sind alle später ausgewerteten Gefäße mit A 1-3 markiert. Der in Abb. 3.9 genauer analysierte Bereich von A1 ist gelb gekennzeichnet. Eine deutliche Zunahme des Gefäßdurchmessers ist schon nach einer Superfusion mit SNP in einer Konzentration von 10 nM zu erkennen. Die nächste Abbildung zeigt diese Gefäßdilatation noch deutlicher.

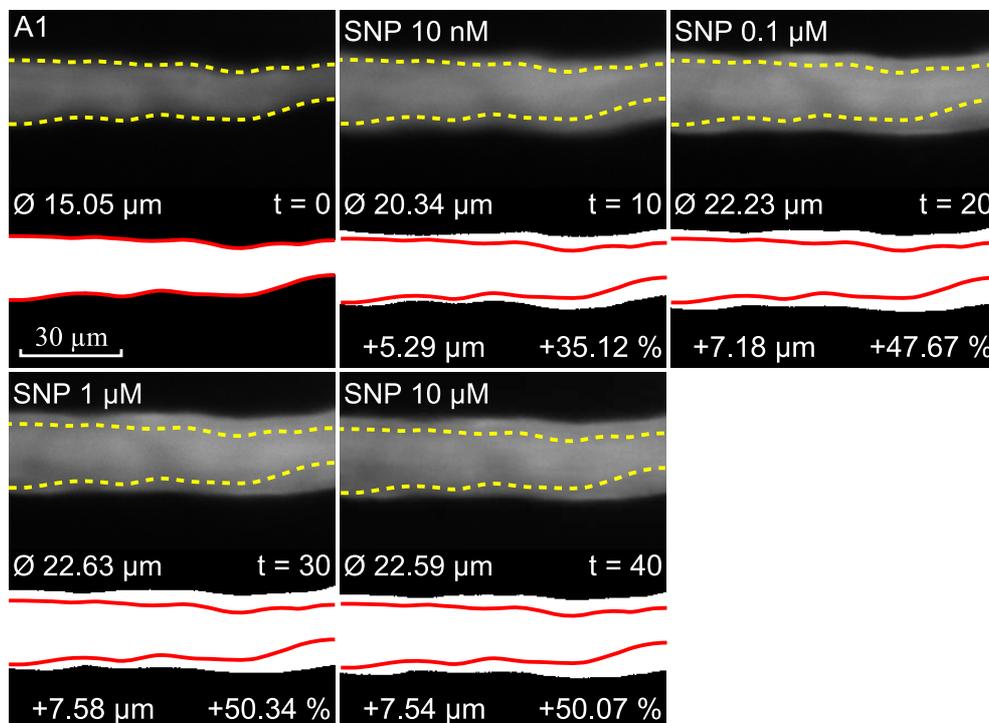


Abb. 3.9: Analyse des SNP-Effektes auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer Wildtypmaus: Die maximale Dilatation der Arteriole A1 ist schon bei einer Konzentration von 1 μM erreicht. Eine weitere Konzentrationssteigerung führte zu keiner verstärkten Vasodilatation.

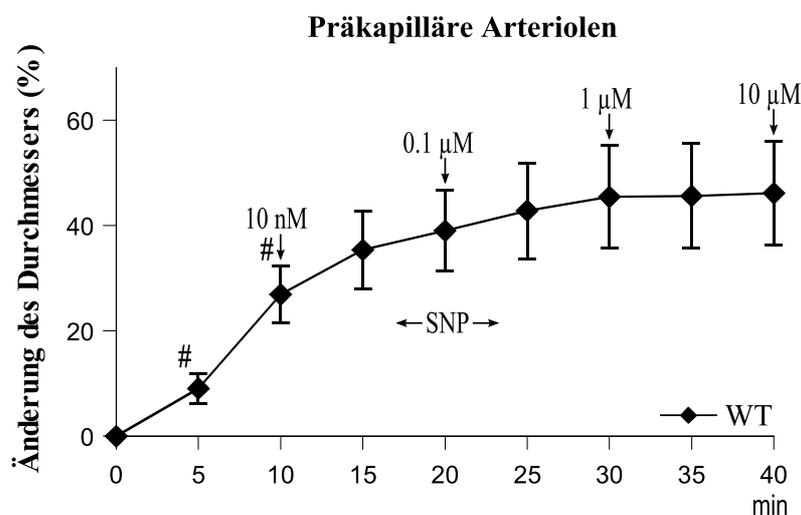


Abb. 3.10: Auswertung aller Versuche mit einer SNP-Superfusion bei Wildtyptieren: In diesem Diagramm ist die prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers über einen Beobachtungszeitraum von 40 Minuten dargestellt. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 5 Minuten. Nach jeweils 10 Minuten wurde die Konzentration um eine Größenordnung erhöht. Es wurden die Gefäßdurchmesser von 11 präkapillären Arteriolen an 5 Wildtyptieren (WT) ausgewertet ($N = 5$, $A = 11$). Eine signifikante Zunahme des Gefäßdurchmessers wurde bereits beim ersten Messwert 5 Minuten nach Beginn der Superfusion mit SNP festgestellt ($\#p < 0.05$ Zeitpunkt $t = 0$ vor SNP Gabe vs. SNP).

Fazit: Im Gegensatz zu ANP zeigt sich bei Superfusion mit SNP der ausgeprägte dilatierende Effekte des, aus SNP spontan freigesetzten Stickstoffmonoxid (NO) auf die glatte Gefäßmuskulatur. NO führt schon in den ersten fünf Minuten nach Superfusionsbeginn zu einer signifikanten Zunahme des Gefäßdurchmessers (Abb. 3.10). Da eine SNP-Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ einen reproduzierbaren vasodilatatorischen Effekt hatte, wurde diese Konzentration in allen späteren Versuchen verwendet. SNP fungierte hierbei als Positivkontrolle für den auch für ANP vermuteten vasodilatatorischen Effekt.

3.2.4 Ang II führt bei Wildtyptieren zu einer deutlichen Vaso-konstriktion

Um für die folgenden Versuche zur Interaktion von ANP und Ang II eine geeignete Konzentration von Angiotensin II (Ang II) zu bestimmen, wurde eine Konzentrationswirkungskurve (KWK) für Wildtypmäuse erstellt. Ziel dieser Versuche war, die Schwellenkonzentration zu ermitteln, bei der eine Ang II-

vermittelte Vasokonstriktion sicher nachgewiesen werden kann. Wie bereits in den Versuchen 3.2.1 - 3.2.3 wurde der M. cremaster von Wildtyptieren für eine Stabilisierungsphase von 30 Minuten mit Krebs-Lösung superfundiert. Danach wurde 0.01 nM Ang II zugegeben und die Konzentration des Peptids im Abstand von 10 Minuten gesteigert, bis nach 30 Minuten eine Endkonzentration von 1 nM erreicht war. Abbildung 3.11 ist ein Beispiel eines solchen Versuches.

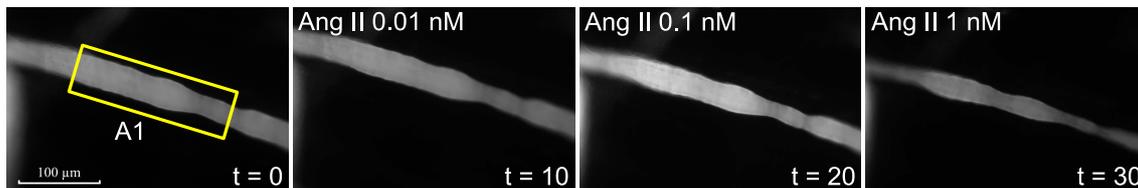


Abb. 3.11: Ang II-Effekt auf den Gefäßdurchmesser einer Wildtypmaus: Auf dem Bild zu Versuchsbeginn ($t = 0$) ist der in Abb. 3.12 näher analysierte Bereich gelb markiert. Die bei den Aufnahmen vorliegende Konzentration von Ang II ist jeweils auf den einzelnen Bildern dokumentiert. Schon hier ist der vasokonstriktive Effekt von Ang II zu erkennen.

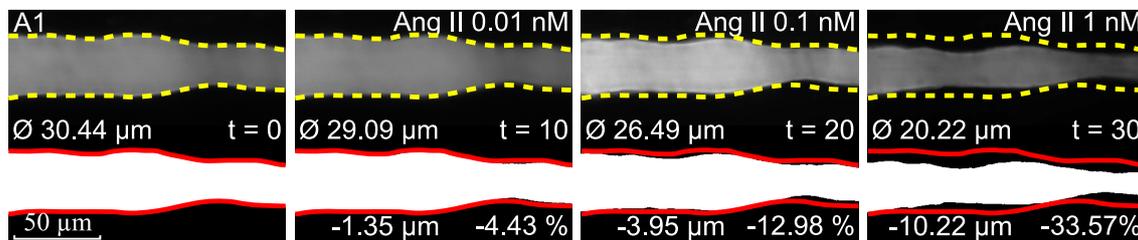


Abb. 3.12: Analyse des Ang II-Effektes auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer Wildtypmaus: Bei der hier dargestellten Arteriole war nach 10 Minuten ($t = 10$) nur eine geringe Vasokonstriktion zu erkennen. Erst nach weiteren 10 Minuten ($t = 20$) war eine deutliche Vasokonstriktion von annähernd 13 Prozent zu detektieren. Die Veränderungen des Gefäßdurchmessers sind sehr gut im Vergleich mit der Gefäßwandmarkierung des Ausgangsbildes bei $t = 0$ zu beurteilen und offensichtlich nicht gleichmäßig über die Längsachse des untersuchten Gefäßausschnittes verteilt.

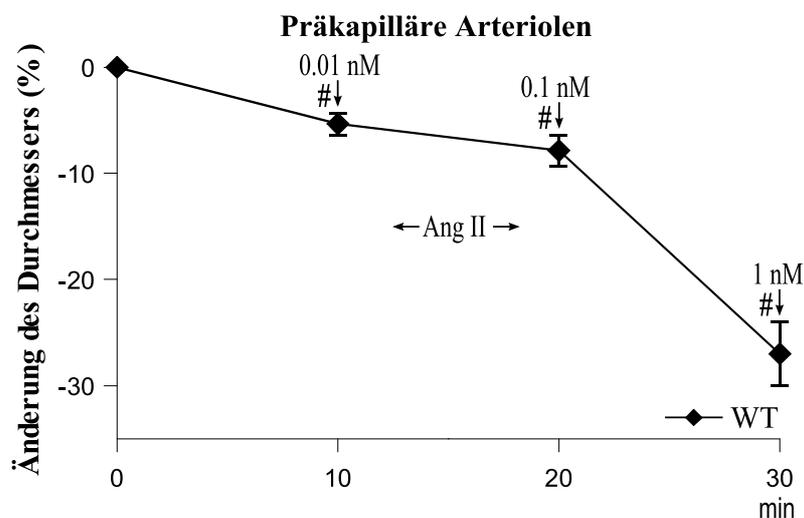


Abb. 3.13: Auswertung aller Versuche mit einer Ang II-Superfusion bei Wildtyptieren: In diesem Diagramm ist die prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers über einen Beobachtungszeitraum von 30 Minuten dargestellt. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 10 Minuten. Nach jeweils 10 Minuten wurde die Ang II Konzentration erhöht. Es wurden die Gefäßdurchmesser von 38 präkapillären Arteriolen an 5 Wildtyptieren (WT) ausgewertet ($N = 5$, $A = 38$). Eine signifikante Veränderung des Gefäßdurchmessers wurde direkt nach Beginn der Superfusion mit Ang II festgestellt ($\#p < 0.05$ Krebs vs. Ang II). Auch bei allen weiteren Konzentrationssteigerungen konnte eine erneute signifikante Verringerung des Durchmesser im Vergleich zur vorherigen Konzentration festgestellt werden.

Fazit: Bei diesen Versuchen zeigte Ang II in einer Konzentration von 1 nM einen sehr ausgeprägten vasokonstriktorisches Effekt. Für die folgenden Versuche wurde eine Ang II-Konzentration von 0.1 nM gewählt, um einen möglichen vasodilatatorischen Effekt von ANP nach vorheriger Ang II-Gabe noch erkennen zu können.

3.2.5 Superfusion mit 0.1 nM Ang II führt zu anhaltender Vasokonstriktion

Ziel der folgenden Versuche war, die zeitliche Stabilität und Dauer des vasokonstriktorisches Effekts von Ang II zu prüfen.

Der M. cremaster wurde über eine Stabilisierungsphase von 30 Minuten nur mit Krebs-Lösung superfundiert. Anschließend wurde der Muskel mit Ang II in einer konstanten Konzentration von 0.1 nM Ang II über 45 Minuten superfundiert. In Abbildung 3.14 ist die entsprechende Reaktion einer Arteriole dargestellt.

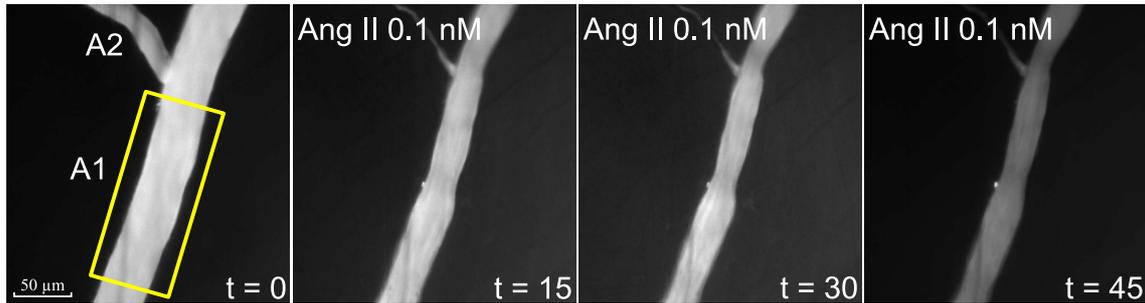


Abb. 3.14: Langzeiteffekt von 0.1 nM Ang II auf den Gefäßdurchmesser einer Wildtypmaus: Die selektierte Arteriole A1 zeigte unter konstanter Einwirkung von 0.1 nM Ang II über die gesamte Versuchsdauer (45 min) eine anhaltende Vasokonstriktion. Am oberen linken Rand der Aufnahme ist eine weitere Verzweigung des Gefäßes A1 zu sehen. Bei diesem Gefäß (A2) kam es bereits kurz nach Versuchsbeginn zu einem vollständigen Verschluss des Gefäßlumens. Arteriolen, die ein solches Verhalten zeigten, wurden generell nicht in die Auswertung aufgenommen.

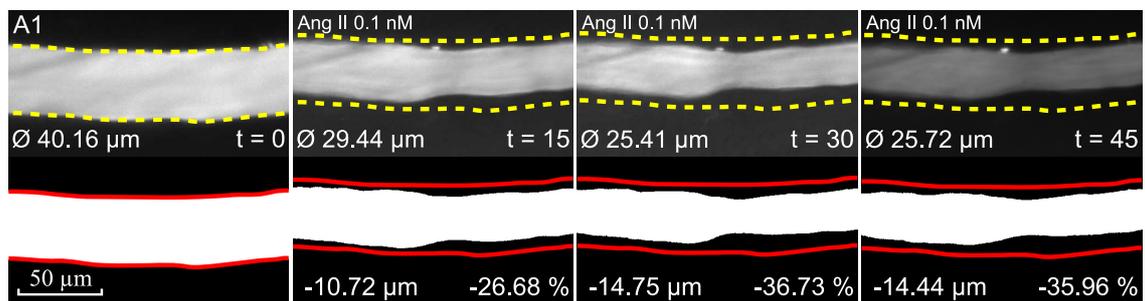


Abb. 3.15: Analyse des Langzeiteffektes von 0.1 nM Ang II auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer Wildtypmaus: Bei der Auswertung dieses Arteriolenabschnittes ist der vasokonstriktorische Effekt von Ang II zu erkennen, welcher nach 30 Minuten stabil bleibt. Ähnlich wie in Abb. 3.12 sind auch hier die Veränderungen des Gefäßdurchmessers nicht gleichmäßig über die Arteriolenwand verteilt.

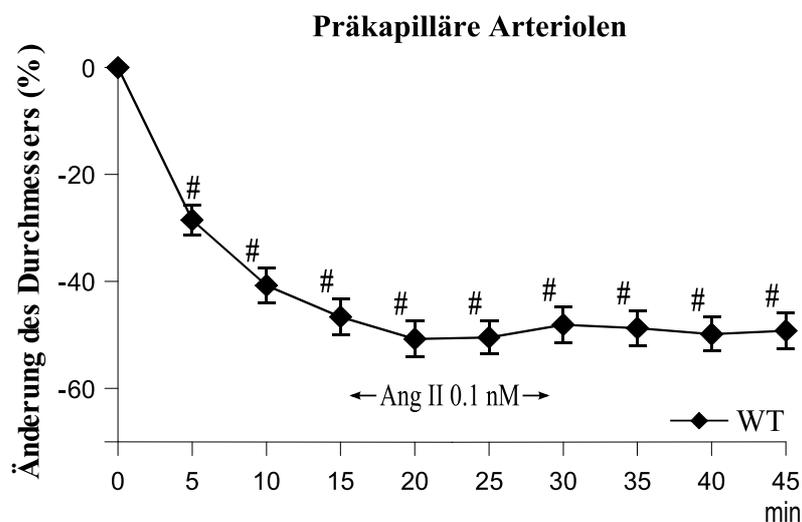


Abb. 3.16: Auswertung aller Superfusionsversuche mit 0.1 nM Ang II bei Wildtyptieren: Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers über einen Beobachtungszeitraum von 45 Minuten. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 5 Minuten. Es wurden die Gefäßdurchmesser von 46 präkapillären Arteriolen an 8 Wildtyptieren (WT) ausgewertet (N = 8, A = 46). Eine signifikante Veränderung des Gefäßdurchmessers wurde bereits nach Beginn der Superfusion mit Ang II festgestellt (#p < 0.01 Krebs vs. Ang II). Dieser Effekt blieb über den gesamten Versuchszeitraum bestehen.

Fazit: Ang II zeigt in einer Konzentration von 0.1 nM eine anhaltende, stabile vasokonstriktorische Wirkung. In allen folgenden Versuchen wurde daher generell eine Ang II Konzentration von 0.1 nM eingesetzt.

3.2.6 ANP hebt den vasokonstriktorisches Effekt von Ang II bei Wildtyptieren auf

Nach den in 3.2.1 - 3.2.5 beschriebenen Vorversuchen zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen für die Superfusionslösungen, wurde nun die eigentliche Fragestellung dieser Dissertation untersucht. Zunächst sollte geprüft werden, ob ANP in der Lage ist, die von Ang II hervorgerufene arterielle Konstriktion aufzuheben.

Wie zuvor wurde, nach einer anfänglichen Stabilisierungsphase von 30 Minuten, der M. cremaster von Wildtypmäusen über 45 Minuten mit 0.1 nM Ang II superfundiert. Nach Einstellung einer moderaten Vasokonstriktion wurde anschließend ab der zehnten Minute zusätzlich ANP in einer Konzentration von 0.1 μ M superfundiert. Nach 20 Minuten wurde die Superfusion von ANP auf SNP, in einer Konzentration von 0.1 μ M gewechselt.

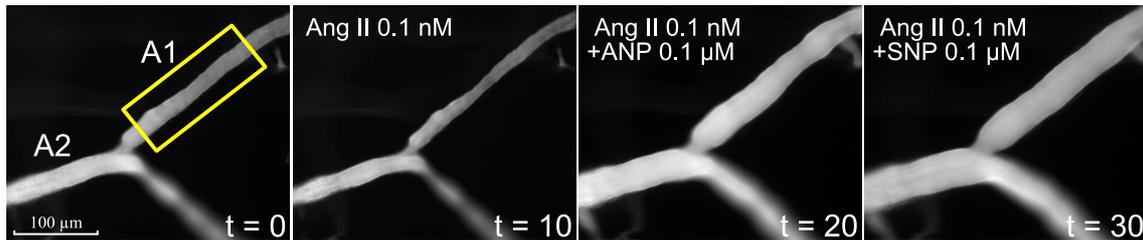


Abb. 3.17: Änderungen im Gefäßdurchmesser einer Wildtypmaus nach Superfusion mit Ang II und ANP: 10 Minuten nach Beginn der Superfusion mit Ang II ($t = 10$) tritt an beiden Gefäßen ein vasokonstriktiver Effekt auf. Dieser wird durch anschließende 10-minütige Superfusion mit ANP wieder aufgehoben.

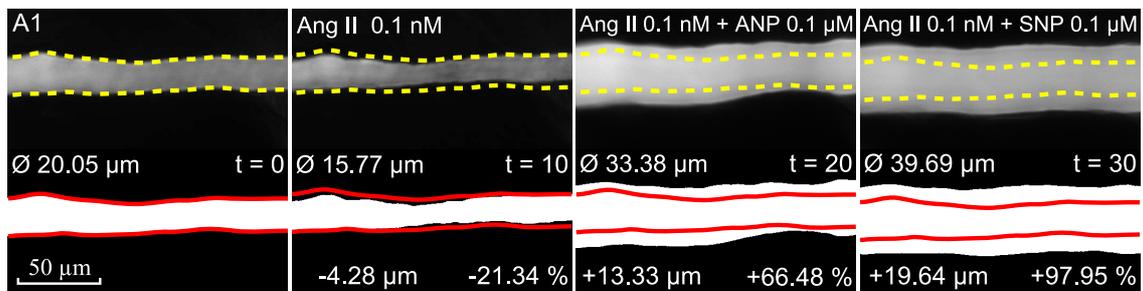


Abb. 3.18: Analyse des Effektes einer Superfusion mit Ang II, ANP und SNP auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer Wildtypmaus: Die Auswertung des Gefäßes A1 zeigt, dass der konstriktive Effekt von Ang II durch ANP nicht nur vollständig aufgehoben wird, sondern dass sich das Gefäßlumen über den Basalwert hinaus (bei $t = 0$) weitet. Mit SNP als Positivkontrolle der Vasodilatation konnte eine weitere Dilatation des Blutgefäßes ausgelöst werden.

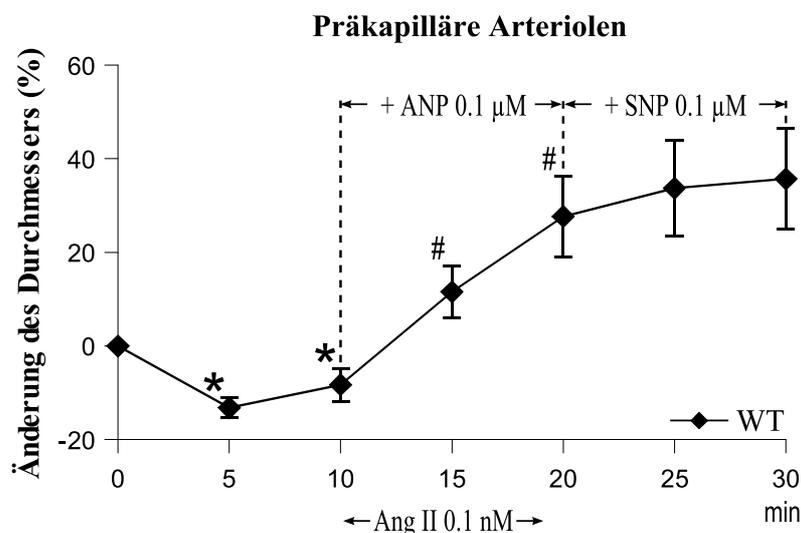


Abb. 3.19: Auswertung aller Ang II-/ ANP-/ SNP-Superfusionsversuche bei Wildtyptieren: Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers über einen Beobachtungszeitraum von 30 Minuten. Es wurden die Gefäßdurchmesser von 12 präkapillären Arteriolen an 6 Wildtyptieren (WT) ausgewertet (N = 6, A = 12). Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 5 Minuten. Eine signifikante Verringerung des Gefäßdurchmessers wurde bereits nach Beginn der Superfusion mit Ang II festgestellt (* $p < 0.05$ Krebs vs. Ang II). Nach 10 Minuten wurde zusätzlich ANP superfundiert. Der Effekt von Ang II wurde dadurch sowohl aufgehoben als auch eine darüber hinausgehende Vasodilatation ausgelöst (# $p < 0.05$ Ang II vs. ANP). Nach 20 Minuten wurde die Superfusion von ANP auf SNP umgestellt. Daraufhin war eine weitere, aber nicht signifikante, Vasodilatation im Vergleich zu ANP festzustellen.

Fazit: ANP ist somit in der Lage bei Wildtypmäusen den vasokonstriktorischen Effekt von Ang II vollständig aufzuheben. SNP hat nach ANP-Gabe keinen zusätzlichen Effekt.

3.2.7 RGS2-defiziente Mäuse zeigen einen konstanten arteriolären Gefäßdurchmesser

Auch bei RGS2-defizienten Mäusen wurden Kontrollversuche durchgeführt. Ziel war zunächst nachzuweisen, ob auch hier nach Superfusion des M. cremasters mit reiner Krebslösung die präkapillären Arteriolen über den geforderten Versuchszeitraum einen konstanten Gefäßdurchmesser beibehalten.

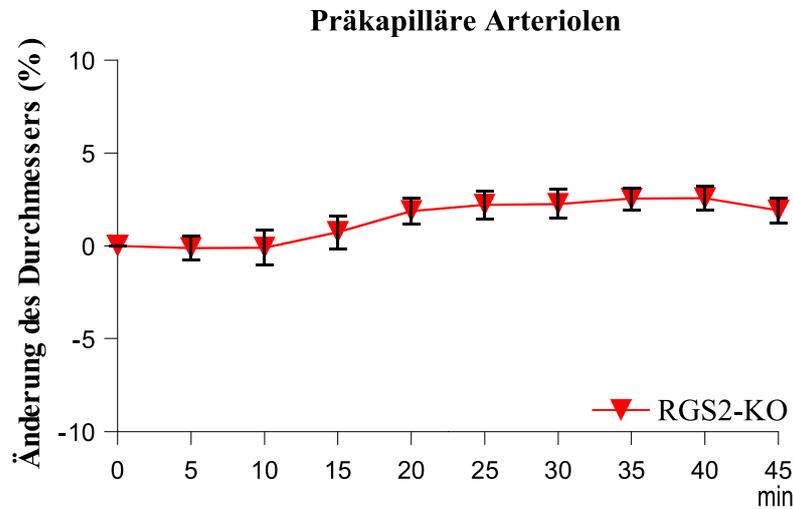


Abb. 3.20: Auswertung aller Kontrollversuche bei RGS2-KO Tieren: Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers über den Beobachtungszeitraum von 45 Minuten. Es wurden die Gefäßdurchmesser von 14 präkapillären Arteriolen an 5 RGS2-KO Tieren ausgewertet (N = 5, A = 14). Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 5 Minuten.

Fazit: Diese Versuche haben gezeigt, dass, wie vorher schon bei den Wildtyptieren, auch bei dieser Tiergruppe unter Basalbedingungen der Gefäßdurchmesser über den gesamten Versuchszeitraum von 45 Minuten konstant bleibt. Auch beim Vergleich der Gefäßdurchmesser beider Tiergruppen war kein signifikanter Unterschied festzustellen. Wildtyptiere besitzen in den hier durchgeführten Versuchen für präkapilläre Arteriolen einen mittleren Durchmesser von $23,38 \mu\text{m}$ ($\pm 4,92 \mu\text{m}$) und RGS2-KO Mäusen einen Durchmesser von $20,57 \mu\text{m}$ ($\pm 2,64 \mu\text{m}$).

3.2.8 An RGS2-KO Tieren hat ANP keinen Effekt auf die Ang II-vermittelte arterioläre Vasokonstriktion

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Effekte (d. h. Aufhebung von Ang II-vermittelter Vasokonstriktion durch ANP) auch bei RGS2-KO Tieren auftraten.

Analog zu 3.2.6 wurde daher auch bei Tieren dieser Mauslinie der M. cremaster zunächst ausschließlich mit Ang II (Endkonzentration 0.1 nM) superfundiert. Nach dem Einstellen einer moderaten Vasokonstriktion wurde dann ab der zehnten Minute zusätzlich ANP in einer Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ über 20 Minuten superfundiert. Nach 20 Minuten wurde SNP statt ANP in einer Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ bei beibehaltener Ang II Superfusion superfundiert.

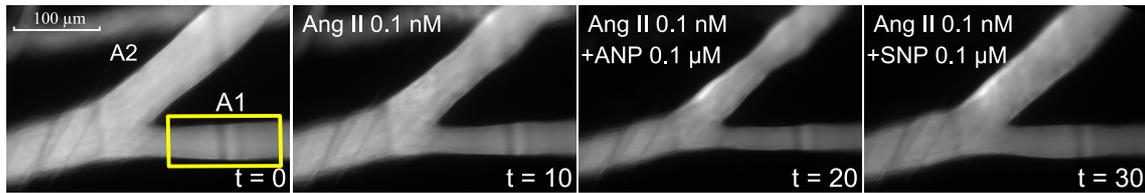


Abb. 3.21: Änderung im Gefäßdurchmesser einer RGS2-KO Maus nach Superfusion mit Ang II, ANP und SNP: 10 Minuten nach Beginn der Superfusion mit Ang II ($t = 10$) trat ein deutlicher vasokonstriktiver Effekt auf, der auch durch zusätzliche 10-minütige Superfusion mit ANP nicht aufgehoben werden konnte. Auch durch SNP konnte im Gegensatz zu den Wildtyparten der Effekt von Ang II nicht vollständig kompensiert werden.

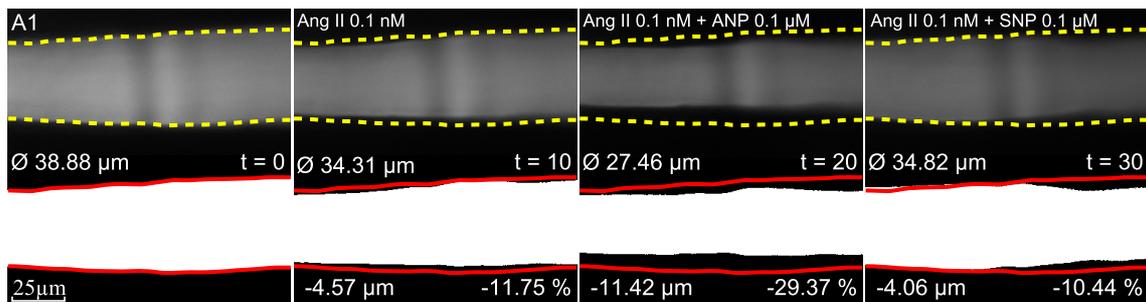


Abb. 3.22: Analyse des Effektes einer Superfusion mit Ang II, ANP und SNP auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer RGS2-KO Maus: Bei der Auswertung des Gefäßes A1 ist zu erkennen, dass der konstriktive Effekt von Ang II durch ANP nicht kompensiert werden konnte. Es zeigt sich darüber hinaus sogar zum Zeitpunkt $t = 20$ eine weitere Vasokonstriktion, die nur durch SNP abgemildert, aber nicht vollständig kompensiert werden konnte.

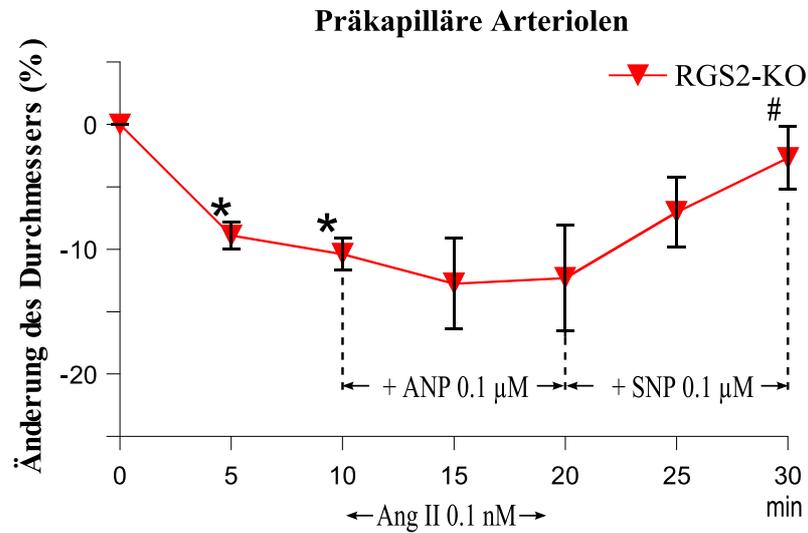


Abb. 3.23: Auswertung aller Ang II-/ ANP-/ SNP-Superfusionsversuche bei RGS2-KO Tieren: Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers über einen Beobachtungszeitraum von 30 Minuten. Es wurden die Gefäßdurchmesser von 14 präkapillären Arteriolen an 7 RGS2-KO Tieren ausgewertet ($N = 7$, $A = 14$). Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 5 Minuten. Eine signifikante Verringerung des Gefäßdurchmessers wurde direkt nach Beginn der Ang II-Superfusion festgestellt (* $p < 0.05$ Krebs vs. Ang II). Nach 10 Minuten wurde zusätzlich ANP superfundiert, was allerdings zu keine Veränderung des Gefäßdurchmessers führte. Eine abschließende Superfusion mit SNP (nach 20 Minuten) führte erst nach 10 Minuten zu einer signifikanten Vasodilatation (# $p < 0.05$ ANP vs. SNP).

Fazit: Bei RGS2-KO Tieren hat ANP keinen Effekt auf die durch Ang II ausgelöste Vasokonstriktion. Nur durch SNP konnte eine signifikante Vasodilatation bewirkt werden.

3.2.9 Wirkung von ANP auf durch Ang II vorkontrahierte Arteriolen bei WT und RGS2-KO Mäusen im Vergleich

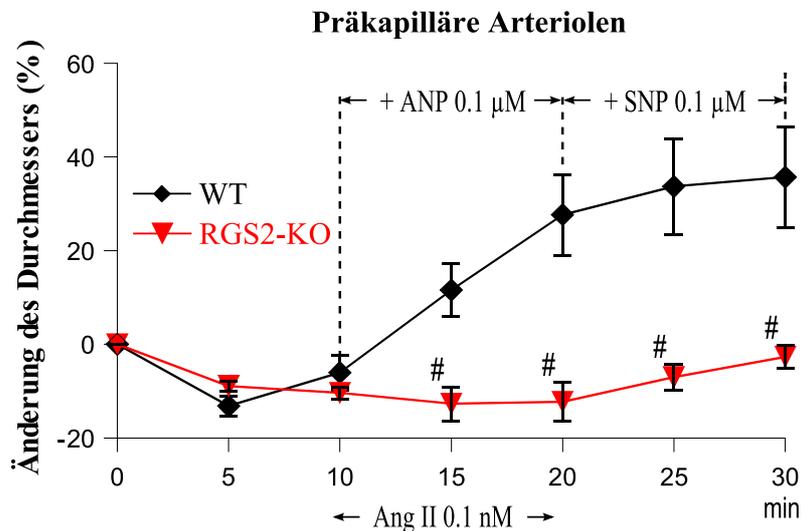


Abb. 3.24: Vergleich aller Versuche von Wildtyp- und RGS2-KO Tieren: Dargestellt sind alle ausgewerteten Versuche bei Wildtyp- und RGS2-KO Tieren im Vergleich. Dies waren für die Wildtyp-tiere (N = 6, A = 12) und für die RGS2-KO Tiere (N = 7, A = 14). Die alleinige Wirkung (d. h. Vasokonstriktion) von Ang II ist in beiden Versuchsgruppen identisch. Ab Beginn der zusätzlichen ANP-Superfusion ist ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festzustellen (# $p < 0.05$ WT vs. RGS2-KO). An Wildtyp-tieren heben ANP und SNP die durch Ang II ausgelöste Vasokonstriktion auf. Dieser vasodilatierende Effekt ist an RGS2-KO Mäusen aufgehoben.

Fazit: Beim Vergleich der Versuche am M. cremaster an beiden Mausgruppen ist festzustellen, dass für den Zeitraum der alleinigen Ang II Superfusion kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und RGS2-KO Mäusen besteht. Nach dem Beginn der zusätzlichen Superfusion von ANP ist hingegen bereits nach 5 Minuten ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgruppen zu erkennen. Die RGS2-KO Tiere verbleiben weiterhin in der durch Ang II ausgelösten Vasokonstriktion. Im Gegensatz dazu ist bei den Wildtyp-tieren eine deutliche Dilatation zu erkennen. Dies legt die Vermutung nahe, dass RGS2 bei der durch ANP vermittelten Hemmung der Ang II bedingten Vasokonstriktion eine bedeutende Rolle spielt.

3.3 Invasive Messungen des Blutdrucks in der A. carotis

3.3.1 Effekte einer ANP-Infusion auf den mittleren arteriellen Blutdruck von Wildtyp- und RGS2-KO Mäusen

Um zu untersuchen, ob ANP in der Lage ist, den mittleren Blutdruck zu senken, wurden invasive Blutdruckmessungen an Wildtyp- und RGS2-KO Mäusen durchgeführt.

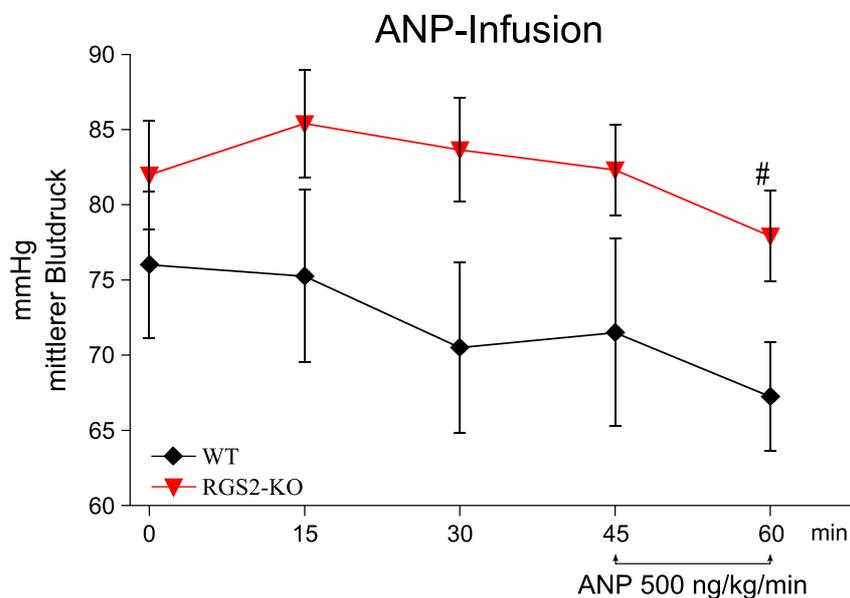


Abb. 3.25: Auswertung aller invasiven Blutdruckmessungen vor und während ANP-Infusion bei Wildtyp- und RGS2-KO Mäusen: Für beide Genotypen wurden je neun Versuche ($N = 9$) durchgeführt. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Blutdruckmessungen betrug 15 Minuten. Zu Beginn der Versuche konnte ein leicht erhöhter Blutdruck bei den RGS2-KO Mäusen festgestellt werden, der sich aber statistisch nicht von den WT-Tieren unterschied. Unter intravenöser ANP Infusion kam es direkt zu einem Blutdruckabfall bei beiden Tiergruppen. Dieser Blutdruckabfall war aber nicht signifikant aufgrund der relativ großen Streuung der Versuche. 60 Minuten nach Beginn des Versuches wurde schließlich ein minimaler mittlerer Blutdruck von 67 mmHg (± 4) bei Wildtypmice und damit ein Abfall um 9 mmHg gemessen, bei RGS2-KO Tieren ein Blutdruck von 78 mmHg (± 3) und ein Abfall um 4 mmHg. Damit war ein signifikanter Unterschied beim Vergleich beider Tiergruppen festzustellen ($\#p < 0.05$ WT vs. RGS2-KO).

Dazu erhielten die Wildtypmäuse zunächst für 45 Minuten eine Ringer-Lactat Infusion, sodass sich nach der Präparation ein gleichmäßiger mittlerer Blutdruck

von 72 mmHg (+/- 6) einstellen konnte. Danach wurde auf eine Ringer-Lactat Infusion mit ANP in einer Konzentration von 500 ng/kg/min umgestellt und über 15 Minuten aufrechterhalten. Ebenso wurde mit den RGS2-KO Mäusen verfahren, wobei sich hier ein mittlerer Blutdruck von 82 mmHg (+/- 3) nach der Präparation einstellte.

Fazit: Bei den hier durchgeführten Versuchen konnte kein Unterschied des basalen mittleren Blutdrucks festgestellt werden. Unter einer Infusion von ANP war nur im Vergleich beider Tiergruppen ein Unterschied und damit eine Wirkung von ANP auf den Blutdruck festzustellen.

3.3.2 Bei WT-Tieren wird der systemische hypertensive Effekt von exogenem Ang II durch ANP antagonisiert

Wie zuvor in den Superfusionsversuchen des M. cremaster (Kapitel 3.2.6 ff) wurde nun die Interaktion von Ang II und ANP zur Regulation des arteriellen Blutdrucks untersucht. Damit sollte ermittelt werden, ob die zuvor in der Mikrozirkulation beobachteten Effekte auch systemische Auswirkungen zeigen.

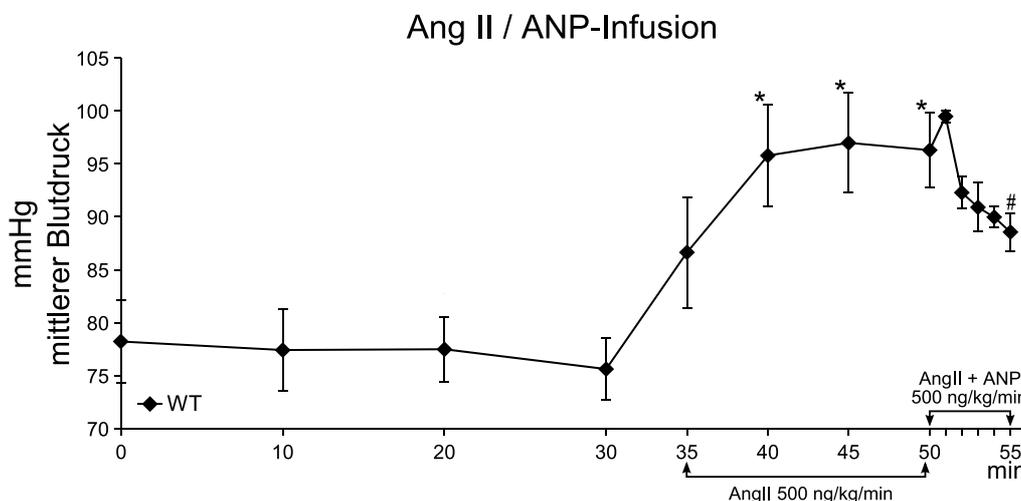


Abb. 3.26: Auswertung aller invasiven Blutdruckmessungen nach Ang II- und ANP-Infusion bei Wildtyp-Tieren: Es wurden insgesamt sieben Versuche (N = 7) durchgeführt. Unter der Infusion von Ang II kam es sofort zu einem signifikanten Blutdruckanstieg (* $p < 0.05$ Krebs vs. Ang II). Nach 50 Minuten wurde ein Blutdruck von 96 mmHg (+/- 4) gemessen (Anstieg um ~19 mmHg). Zum Abschluss des Versuchs wurde die Infusion auf Ang II und ANP umgestellt. Es zeigte sich anschließend über einen Zeitraum von 5 Minuten eine stetige Abnahme des Blutdrucks auf 89 mmHg (+/- 2), der bis zum Erreichen des ersten signifikanten Wertes dargestellt ist (# $p < 0.05$ Ang II vs. Ang II + ANP).

Die Versuche wurden zunächst an Wildtypmäusen durchgeführt. Diese erhielten für 30 Minuten eine Ringer-Lactat Infusion, sodass sich ein gleichmäßiger mittlerer Blutdruck von 77 mmHg (+/- 3) nach der Präparation einstellen konnte. Danach wurde auf eine Ringer-Lactat Infusion mit Ang II in einer Konzentration von 500 ng/kg/min umgestellt und über 20 Minuten aufrechterhalten. Zum Abschluss des Experiments wurde für 5 Minuten auf eine Ringer-Lactat Infusion mit Ang II in einer Konzentration von 500 ng/kg/min und ANP in einer Konzentration von 500 ng/kg/min umgestellt.

Fazit: Eine Infusion von Ang II führt somit zu einem nachweisbaren signifikanten Blutdruckanstieg bei den Wildtypmäusen. Dieser Ang II-vermittelte Effekt kann durch zusätzliche Infusion von ANP zum Teil aufgehoben werden. Da sowohl Ang II als auch ANP durch die Infusion über den gesamten Blutkreislauf verteilt wirken können, lässt sich in diesem Zusammenhang von systemischen Effekten sprechen.

3.3.3 Bei RGS2-KO Tieren wird der hypertensive Effekt von Ang II durch ANP nicht signifikant vermindert

Jetzt wurde ebenso der Effekt von Ang II und anschließend ANP auf den arteriellen Blutdruck von RGS2-KO Tieren untersucht. Es wurden mit RGS2-KO Tieren invasive Blutdruckexperimente wie in Kapitel 3.3.2 durchgeführt. Auch hier wurde untersucht, ob der in der Mikrozirkulation beobachtete Effekt bei RGS2-KO Tieren nachgewiesen werden konnte. Entsprechend erhielten RGS2-KO Mäuse zunächst für 30 Minuten eine Ringer-Lactat Infusion, sodass sich ein gleichmäßiger mittlerer Blutdruck von 84 mmHg (+/- 3) nach der Präparation einstellen konnte. Danach wurde die Infusion auf Ang II gewechselt und weitere 20 Minuten fortgeführt. Zum Abschluss des Experiments wurde die Infusion für 5 Minuten auf Ang II und ANP gewechselt.

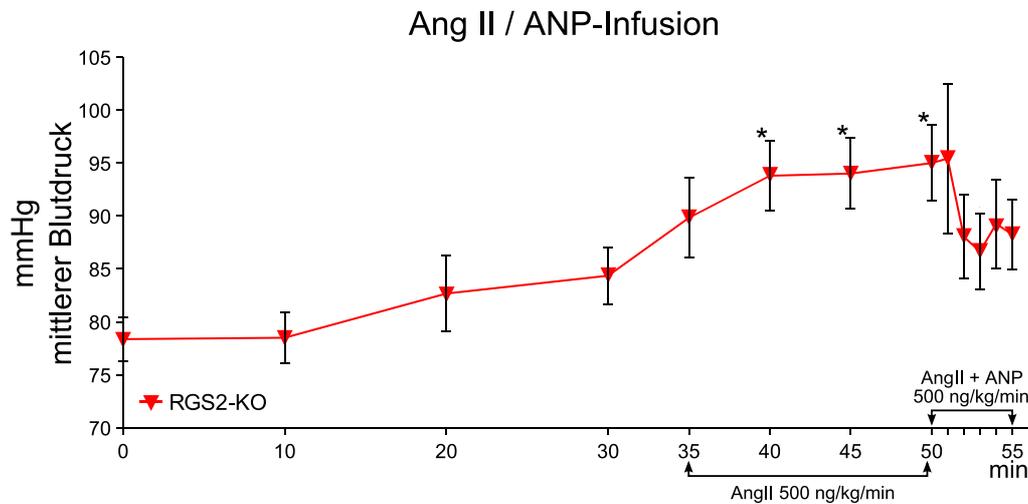


Abb. 3.27: Auswertung aller invasiven Blutdruckmessungen nach Ang II- und ANP-Infusion bei RGS2-KO Tieren: Es wurden insgesamt sieben Versuche ($N = 7$) durchgeführt. Nach der Infusion von Ang II kam es direkt zu einem signifikanten Blutdruckanstieg 5 Minuten nach Beginn der Infusion im Vergleich zur vorhergehenden mit Ringer-Lösung (* $p < 0.05$ Krebs vs. Ang II). Nach 50 Minuten wurde ein maximaler Blutdruck von 95 mmHg (± 4) gemessen (Anstieg um ~ 11 mmHg). Zum Abschluss des Versuchs wurde die Infusion auf Ang II und ANP gewechselt. Daraufhin zeigte sich über einen Zeitraum von 5 Minuten eine stetige aber statistisch nicht gesicherte Abnahme des Blutdrucks auf 88 mmHg (± 3). Durch die höhere Streuung der RGS-KO Versuche konnte hierbei kein statistisch gesicherter Abfall nachgewiesen werden.

Fazit: Eine Infusion von Ang II führt somit auch bei RGS2-KO Tieren zu einem nachweisbaren signifikanten Blutdruckanstieg. Eine anschließende zusätzliche Infusion von ANP hatte hier allerdings nur eine milde aber statistisch nicht gesicherte Hemmung des Ang II-Effektes zur Folge.

3.3.4 Systemische Effekte einer Ang II-/ ANP-Infusion bei Wildtyp- und RGS2-KO Tieren im Vergleich

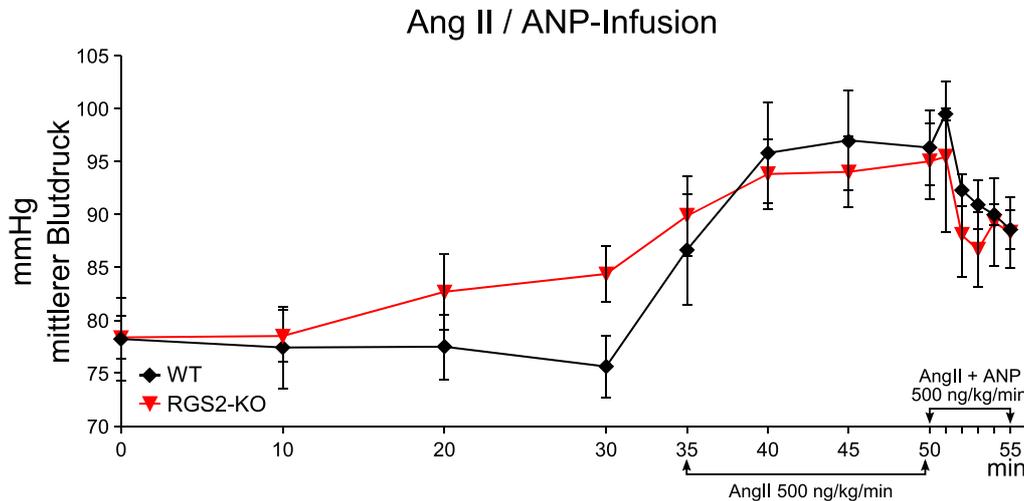


Abb. 3.28: Vergleich aller Blutdruckexperimente von Wildtyp- und RGS2-KO Tieren: Dargestellt sind alle ausgewerteten Versuche an Wildtyp und RGS2-KO Tieren mit je sieben Versuchen ($N = 7$) im Vergleich. Wenn man beide Gruppen betrachtet wird deutlich, dass der mittlere Blutdruck bei RGS2-KO Tieren nach der Einstellung eines gleichmäßigen Blutdrucks stets etwas höher als der von Wildtypmäusen war. Dies war aber nicht signifikant. Mit Beginn der Ang II Infusion ist bei beiden ein deutlicher Blutdruckanstieg zu verzeichnen. Dieser ist aber bei den RGS2-KO Tieren weniger stark ausgeprägt, da ihr Ausgangswert nach der Stabilisierungsphase höher war. Er beträgt bei RGS2-KO Mäusen +11 mmHg (84-95 mmHg) und bei den Wildtyptieren +19 mmHg (77-96 mmHg). Nach der Umstellung auf eine Ang II und ANP-Infusion kam es bei beiden Tiergruppen zu einem Blutdruckabfall um ~7 mmHg. Aufgrund der Streuung konnte insgesamt kein Unterschied bei beiden Tiergruppen festgestellt werden.

Fazit: RGS2-KO Tiere weisen nach der Einstellung eines gleichmäßigen Blutdrucks nach 30 Minuten einen höheren statistisch nicht gesicherten Blutdruck auf als Wildtyptiere. Ang II löst bei RGS2-KO Tieren im direkten Vergleich einen niedrigeren Blutdruckanstieg aus als bei den Wildtyptieren, der sich aber nicht signifikant unterscheidet. Wie in den einzelnen Versuchen dargestellt, war der Effekt von ANP nur bei den Wildtyptieren signifikant nachzuweisen (siehe Abb. 3.26 und 3.27). Grundsätzlich war hier kein signifikanter Unterschied des mittleren Blutdrucks bei beiden Tiergruppen festzustellen.

4 Diskussion

4.1 Intravitalmikroskopie am M. Cremaster zur Darstellung der Effekte von Ang II und ANP in der Mikrozirkulation

Am M. cremaster der Maus wurden Studien zur Interaktion von Ang II und ANP durchgeführt. Diese intravitalmikroskopischen Experimente erfolgten nach der von Baez (1973)[6] etablierten Methode. Bisher wurden nur Studien an isolierten Makrogefäßen und Mikrogefäßen *ex vivo* publiziert. Auch wurde bis jetzt die Wechselwirkung von Ang II und ANP nicht an Widerstandsgefäßen *in vivo* untersucht. Daher wurden im Rahmen dieser Dissertation Untersuchungen an präkapillären Arteriolen durchgeführt. Von Lopez (Lopez et al., 1997)[51] wurden Experimente an isolierten, vorgespannten und mit KCl vorkontrahierten Aortenringen durchgeführt. Hierbei kam es zu einer Relaxation der Aortenringe durch ANP. Auch in dieser Studie wurde darauf hingewiesen, dass die beobachteten Ergebnisse sich nicht zwingend auf die Wirkung von ANP auf Arteriolen in der Mikrozirkulation übertragen lassen. Des Weiteren ist dazu anzumerken, dass Makrogefäße nicht relevant für die Blutdruckregulation sind. Auch von Wei (Wei et al., 1994)[89] wurde der relaxierende Effekt von ANP auf durch Phenylephrin vorgespannte Aortenringe festgestellt. Von Hughes (Hughes et al., 1989)[39] erfolgten Experimente an isolierten präkapillären Arteriolen, auf die auch in dieser Arbeit das Augenmerk gerichtet wurde. Die Versuche erfolgten an isolierten Widerstandsgefäßen des Menschen verschiedener Organherkunft. Nur bei Arterien der Niere und des Skelettmuskels konnte ein Effekt von ANP auf vorkontrahierte Gefäße festgestellt werden. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. Auch hier wurden, wie bei Lopez (Lopez et al., 1997)[51], die Blutgefäße durch KCl vorkontrahiert.

Vorteil der hier beschriebenen Untersuchungen ist, dass die Experimente *in vivo* durchgeführt werden und die Versuchstiere eine intakte Mikrozirkulation aufweisen. Außerdem konnten wir mit monogenetisch veränderten Mausmodellen arbeiten. Ein Nachteil der intravitalmikroskopischen Experimente ist die Narkose der Tiere, durch die eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse nicht definitiv ausgeschlossen werden kann. Es musste eine Narkose gefunden werden, die durch ihre Bestandteile keinen signifikanten Effekt auf den Gefäßdurchmesser hervorruft. Bei den invasiven Versuchen erfolgte die Narkose mit einer Tripel-Narkose. Diese

besteht aus Fentanyl, Midazolam und Medetomidin (Tab. 2.1, S.13). Bei der Verwendung von Fentanyl konnte kein Effekt auf den Gefäßdurchmesser von Arteriolen der Mikrozirkulation des M. cremaster festgestellt werden (Brookes et al., 2002)[12]. In der Studie von Brookes wurden aber Effekte auf die Herzrate und den Blutdruck beschrieben. Die Herzrate verblieb über den Verlauf der Experimente von 130 Minuten stabil und beim arteriellen und diastolischen Blutdruck zeigte sich ein leichter Rückgang um 15-20 mmHg. Ebenso zeigte sich die Wirkung von SNP als Vasodilatator unter einer Narkose mit Fentanyl, wie auch hier nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.10, S.33). Midazolam hat wie alle Benzodiazepine nur geringe kardiopulmonäre Nebenwirkungen wie eine Atemdepression und ebenso einen Abfall des Blutdrucks (Stegmann et al., 1998)[82]. Nebenwirkungen von Medetomidin sind eine Bradykardie, ein unregelmäßiger Herzschlag und eine Hypothermie. Diese Tripel-Narkose hat sich für Versuche am M. cremaster, bei denen der Gefäßdurchmesser bestimmt wurde, bewährt (Wölflé et al., 2005; Wölflé et al., 2009; Jobs et al., 2012)[90][91][41]. Auch durch die Temperatur kann der Gefäßdurchmesser bei den Versuchen beeinflusst werden. Der M. cremaster musste eine konstante gleichbleibende Temperatur während des gesamten Experiments besitzen, da es bei einem Temperaturabfall zu einer Konstriktion der Gefäße kommt. Dies würde letztendlich zu einem völligen Verschluss bei einem weiteren Absinken der Temperatur führen. Somit wäre die Versuchsdurchführung unmöglich gewesen. Dieser Effekt wurde von Faber (Faber, J.E., 1988)[22] für ein Abkühlen des M. cremaster beschrieben. Auch kleinere Schwankungen würden zu einer Veränderung der Gefäßdurchmesser führen, was im Endeffekt die Ergebnisse verfälscht. Effekte dieser Art konnten bei mehreren Versuchen beobachtet werden, die aufgrund zu starker Blutungen nach der Präparation abgebrochen werden mussten. Deswegen befand sich die Maus auf einer beheizten Wärmeplatte, um die Temperatur während der Versuche konstant zu halten.

4.1.1 Etablierung einer neuen softwaregestützten Methode zur Quantifizierung des Gefäßdurchmessers

Wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben, wurde im Rahmen dieser Dissertation ein Verfahren entwickelt, mit dem es möglich war, das aus den Versuchen gewonnene Bildmaterial automatisiert auszuwerten. Hierbei wurde das Bildmaterial automatisch rotiert, zugeschnitten und der mittlere Gefäßdurchmesser des auszuwertenden Gefäßes bestimmt. Die Analyse erfolgte über den kompletten ausgewählten Gefäßausschnitt. Dadurch war es möglich, die Gefäße standardisiert

und sehr genau *in toto* auszuwerten. In anderen publizierten Arbeiten wurden nur einzelne Teile von Bild und Videoaufnahmen per Hand ausgewertet. Dazu wurden die Gefäßwände manuell markiert, bei manchen Arbeiten an einzelnen (VanTeeffelen et al., 2005)[88], oder mehreren Stellen (Orth et al., 2005)[63]. Bei Orth wurde auch darauf hingewiesen, dass besonders sorgfältig darauf achtgegeben wurde, die gleichen Gefäßabschnitte des M. cremaster auszuwerten. Dies ist vor allem schwierig, wenn kein klarer Bezugspunkt gefunden werden kann, wie z. B. die Aufgabelung von Arteriolen, Venolen oder Kapillaren. So kann es vorkommen, dass bei der mehrmaligen Auswertung des gleichen Gefäßes verschiedene Ergebnisse zustande kommen. Eine weitere Rolle spielt hierbei auch die Veränderung des Aussehens des Gefäßlumens, wie sie bei einer Vasokonstriktion oder Vasodilatation erfolgt. Auch ist an dem hier gezeigten Bildmaterial oft gut zu erkennen und äußerst interessant, dass die Kontraktion über den untersuchten Gefäßausschnitt unterschiedlich verläuft (siehe z. B. Abb. 3.15, S.36). Dies kann wiederum zu einer weiten Diskrepanz bei der Auswertung führen, je nachdem welchen Gefäßabschnitt man zur lokalen Auswertung wählen würde. Da für die hier durchgeführten Experimente eine äußerst genaue Auswertung nötig war und es versucht wurde, mit annähernd physiologischen Konzentrationen der Hormone zu arbeiten, führte dies zur Überlegung der Entwicklung eines Programms zur automatisierten Auswertung. Vorteile der Bestimmung des Gefäßdurchmessers mit diesem Programm sind, dass durch das Programm mögliche Fehler bei der Bestimmung des Durchmessers und der Position der Gefäßwand größtenteils ausgeschlossen werden. Damit ist es möglich, ein Gefäß *in toto* zu analysieren, lediglich durch das Auflösungsvermögen des Mikroskops und der Kamera begrenzt. Auch eine Analyse einzelner Abschnitte des Gefäßes sind möglich, da durch die Festlegung von Bezugspunkten einzelne Positionen sicher aufgefunden werden können. Das Verfahren hat sich hier als eine schnelle und genaue Methode bewährt, um den Durchmesser von Blutgefäßen zu bestimmen.

4.1.2 Untersuchungen zu den vasokonstriktorischen Effekten von Ang II

In den hier durchgeführten Versuchen (Kapitel 3.2.5) hat sich gezeigt, dass Ang II schon in einer sehr niedrigen Konzentration (0.1 nM) eine starke und stabile Kontraktion von präkapillären Arteriolen hervorrufen kann. Im Gegensatz zu den Gefäßen der Makrozirkulation reagiert dieses Gefäßbett also viel sensibler auf Ang II, wie z. B. bei isolierten Aortenringen und Arterien zu erkennen ist. Bei Berk konnte erst ab der dreifachen Konzentration ein Effekt auf Aortenringe festgestellt werden (Berk et al., 1985)[8]. Bei kleineren Gefäßen hingegen war es schon möglich, einen

Effekt in dieser Konzentration nachzuweisen (Touyz et al., 1999)[86]. Dies erklärt gut die Schlüsselposition von Ang II bei der Aufrechterhaltung des Blutdrucks. Aus diesem Grund wurde eine relativ niedrige Konzentration (0.1 nM) von Ang II gewählt, durch die eine stabile Konstriktion durch Ang II aufgebaut werden konnte, ein möglicher vasodilatierender Effekt von ANP aber noch nachweisbar sein sollte.

4.1.3 Untersuchungen zu den vasodilatierenden Effekten von ANP

Bei den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen, hatte ANP bei lokaler Superfusion des M. cremasters keinen Effekt auf den basalen Gefäßdurchmesser präkapillärer Arteriolen (Abb. 3.7, S.31). Dieses Ergebnis stimmt mit denen in anderen Studien erhobenen Daten überein. Von Proctor (Proctor & Bealer, 1987)[69] wurde beispielsweise kein vasodilatierender Effekt von ANP am M. cremaster nachgewiesen, von Faber (Faber et al., 1988)[23] wurde nur ein minimaler Effekt sehr hoher unphysiologischer ANP-Konzentrationen beobachtet. Beide Studien wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, am M. cremaster von narkotisierten Mäusen durchgeführt. Von Faber (Faber et al., 1988)[23] konnte aber ein dilatatorischer Effekt von ANP an durch Noradrenalin vorkontrahierten Gefäßen nachgewiesen werden. Dies entspricht auch den weiteren Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche, bei denen sich der vasodilatierende Effekt von ANP an durch Ang II kontrahierten Gefäßen gezeigt hat (Abb. 3.19, S.39). In Übereinstimmung dazu ist in der Literatur beschrieben, dass eine Anwendung von ANP an isolierten, vorgespannten und mit KCl vorkontrahierten Aortenringen ebenso eine Relaxation dieser Blutgefäße hervorruft. Dies wurde unter anderem von Lopez (Lopez et al., 1997)[51] bei Wildtypmäusen publiziert. Auch gefäßerweiternde Effekte auf Blutgefäße der Niere wurden beobachtet (Aalkjaer et al., 1985)[1]. Diese wurden durch KCl, Noradrenalin oder Serotonin vorkontrahiert. Es scheint also, dass ANP vor allem im Zustand einer Gefäßkonstriktion den gefäßverengenden Effekt abmildern oder aufheben kann. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Beobachtungen an isolierten Kardiomyozyten überein. ANP hatte hier keinen Effekt auf die basalen Calciumtransienten und die Kontraktion der isolierten Muskelzellen. Im Gegensatz dazu hemmte ANP die Calcium-stimulierenden Effekte von Ang II (Klaiber et al., 2010)[44]. Auch ist anzumerken, dass die zuvor erwähnten intravitalen Experimente ebenso an anästhesierten Mäusen durchgeführt wurden. Eine Nebenwirkung ist, wie schon zuvor bei der hier verwendeten Tripel-Narkose (Kapitel 4.1) erwähnt, die Hypotension. Deswegen erscheint es sinnvoll, dass durch eine weitere Gefäßrelaxation der Blutdruck nicht noch weiter gesenkt wird und dies

nur, wie von Faber beschrieben, durch unphysiologisch hohe ANP-Konzentrationen ausgelöst werden kann (Faber et al., 1988)[23]. Nachdem kein direkter Effekt von ANP auf den basalen Gefäßdurchmesser der Arteriolen des M. cremaster nachzuweisen war, wurden nun Versuche an durch Ang II vorkontrahierten Gefäßen von Wildtypmäusen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass ANP die Wirkung von Ang II aufhebt und eine darüber hinausgehende Vasodilatation hervorruft (Abb. 3.19, S.39). Dieser Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass ANP über den GC-A-Rezeptor und die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK α) nicht nur die RGS2-Signalkaskade moduliert sondern auch auf ATP-abhängige Calciumpumpen in der Zellmembran wirken könnte. Darüber hinaus hemmt ANP bekanntermaßen die Myosin-leichte-Kette (MLK) der glatten Muskulatur (Hofmann et al., 2000; Schlossmann et al., 2003)[37][76]. Beide Aspekte könnten so zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führen und dadurch die Dilatation verstärken. Die hier durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass ANP in der Lage ist, den vasokonstriktiven Effekt von Ang II an Wildtypmäusen aufzuheben. ANP und Ang II sind in vielen physiologischen Systemen funktionelle Antagonisten. Wichtige Funktionen der beiden Hormone finden sich unter anderem in der Niere (Haneda et al., 1991)[31], dem Herzen (Dostal et al., 1999)[19], bei der Entstehung des Durstgefühls (McKinley et al., 2004)[56], der Regulation des Sympathikustonus (Ukowska et al., 1986)[99] und der Blutdruckregulation. Mit den hier durchgeführten Versuchen konnte bestätigt werden, dass auch in der Mikrozirkulation ANP und Ang II funktionelle Antagonisten sind. Es konnte des Weiteren festgestellt werden, dass der NO-Donor SNP nach ANP Gabe keinen zusätzlichen vasodilatatorischen Effekt besitzt. Dies lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass beide Liganden (NO, ANP) über ihren sGC- und GC-A-Rezeptor durch die intrazelluläre Bildung von cGMP die gleichen Zielproteine in glatten Muskelzellen regulieren. In glatten Gefäßmuskelzellen aktiviert cGMP die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) und diese hemmt die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine. Es wird der Einstrom von Calcium und die Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum gehemmt (Bahnon et al., 1993; Lucas et al., 2000)[7][52]. Hierbei spielen verschiedene Prozesse eine Rolle. Durch die Phosphorylierung des Inositol-1,4,5-trisphosphat-assoziierten-cGKI-Substrats (IRAG) wird die Calciumkonzentration gesenkt. IRAG ist ein mit dem IP₃-Rezeptor verknüpftes cGMP-Kinase Substrat und bildet gemeinsam mit cGKI und dem IP₃-Rezeptor I einen trimeren Komplex aus. Es befindet sich an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Schlossmann et al., 2000, Ammendola et al.,

2001)[75][4]. cGKI phosphoryliert IRAG und hemmt damit den Calciumausstrom aus dem ER. Ebenso wird die Phosphorylierung von BK_{Ca}-Kanälen durch cGKI vermittelt. Dies führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle und bewirkt einen verstärkten Ausstrom von Kalium aus der Zelle. Dadurch kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Das so gesenkte Potential der Membran verringert die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungskontrollierter L-Typ Calciumkanäle (Hofmann et al., 2000; Bolz et al., 2003; Munzel et al., 2003)[37][10][58]. Außerdem hemmt cGKI die Funktion der Myosin-leichten-Kette (MLK) der glatten Muskulatur. cGKI phosphoryliert hierbei die Myosin-bindende Untereinheit der Myosinphosphatase und aktiviert so die Phosphatase (Hofmann et al., 2000; Schlossmann et al., 2003)[37][76]. Dann wird das kontraktile Protein Myosin dephosphoryliert und seine Interaktion mit Aktin beendet.

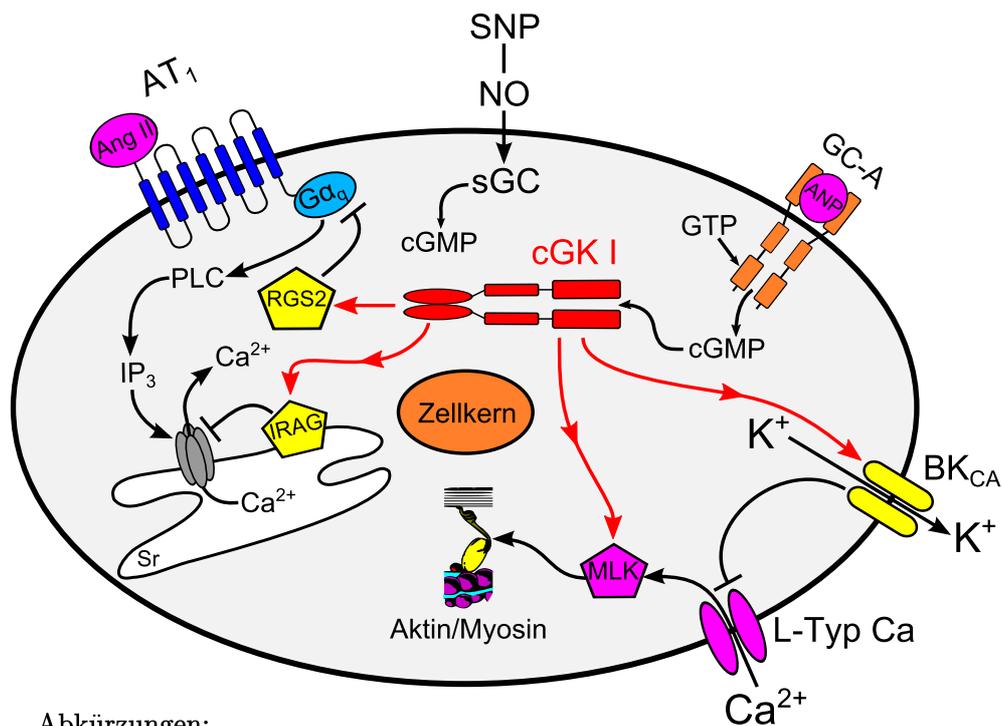
4.2 Untersuchungen zur Bedeutung von RGS2 als mögliche Schnittstelle für die reziproken Interaktionen zwischen Ang II und ANP

Von ANP ist bekannt, dass seine vasodilatierenden Effekte über den GC-A-Rezeptor, der Bildung von cGMP und die Aktivierung von cGKI vermittelt werden (Kapitel 1.4.1). Die möglichen Zielproteine in den glatten Gefäßmuskelzellen wurden in einer Übersichtsarbeiten von Schlossmann beschrieben (Schlossmann et al., 2000, 2003)[75][76] (Abb. 4.1, S.55). Darunter befindet sich auch RGS2. Von RGS2 ist bekannt, dass es den Signalweg des AT₁-Rezeptors inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass die durch Ang II stimulierte Expression von RGS2 in der Lage ist, den Ang II Signalweg (Li et al., 2005) [49] zu hemmen. Dies wird durch *in vivo* Studien untermauert, die zeigen, dass Tiere mit fehlendem RGS2-Protein empfindlicher auf den durch Ang II ausgelösten Bluthochdruck reagieren als Wildtypiere (Hercule et al., 2007)[34]. RGS2 ist ein Substrat von cGKI in vaskulären Muskelzellen und besitzt nach seiner Phosphorylierung eine erhöhte GTPase Aktivität für G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Dies führt dann zu einer Inhibierung dieser Rezeptoren (Tang et al., 2003)[85]. Da es keine pharmakologischen Inhibitoren für RGS2 gibt, wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit ein monogenetisches Mausmodell verwendet. Mäuse mit fehlendem RGS2 Protein (RGS2-KO) wurden zuerst von Oliveira-dos-Santos (Oliveira-dos-Santos et al., 2000)[62] generiert und von verschiedenen Forschungsgruppen weiter charakterisiert z. B. (Heximer et al., 2003; Tang et al., 2003; Gross et al., 2005; Obst et al., 2006)[35][85][28][61]. Der

basale Phänotyp ist charakterisiert durch Bluthochdruck (Heximer et al., 2003; Tang et al., 2003; Gross et al., 2005)[35][85][28], Erkrankungen des Herzens (Tsang et al., 2010)[87] wie Herzhypertrophie und Herzversagen (Takimoto et al., 2009)[84] und Verhaltensstörungen, die sich in einer verstärkten Ängstlichkeit (Yalcin al., 2004)[95], depressionsartigem Verhalten und verminderter sozialer Interaktion (Lifschytz et al., 2011)[50] zeigen.

Aufgrund dieser Beobachtungen und den bekannten Funktionen von RGS2 waren unsere Hypothesen, dass:

1. der vasokonstriktorische Effekt von Ang II an RGS2-KO Arteriolen gesteigert ist.
2. der vasodilatierende Effekt von ANP abgeschwächt oder sogar aufgehoben ist.



Abkürzungen:

AngII: Angiotensin II	MLK: Myosin-leichte-Kette-Kinase
ANP: Atriales natriuretisches Peptid	NO: Stickstoffmonoxid
AT ₁ : Angiotensin II Rezeptor Typ1	PLC: Phospholipase C
cGKI: cGMP Proteinkinase I	RGS2: G-Protein Regulator 2
GC-A: Guanylcyclase A	sGC: lösliche Guanylatzyklase
IP ₃ : Inositoltrisphosphat	SNP: Natrium-Nitroprussid
IRAG: Inositol-1,4,5-trisphosphat-assoziertes-cGKI-Substrat	SR: sarkoplasmatisches Retikulum

Abb. 4.1: Reaktionswege Ang II, ANP, SNP, NO

4.2.1 Mäuse mit globaler Deletion von RGS2 haben einen leicht erhöhten arteriellen Blutdruck und signifikante Bradykardie

Über eine Aktivierung von G-Protein-gekoppelten (GPCR) Signalwegen kann der Blutdruck innerhalb normaler Parameter gehalten werden, trotz einer großen Veränderung der Auswurfleistung des Herzens, die sich innerhalb von Sekunden ändern kann. Deshalb ist für die Blutdruckregulation eine genaue Regulation der GPCR-Signalwege nötig. Welche Rolle hierbei RGS2 spielt, wurde von Heximer (Heximer et al., 2003)[35] an Mäusen mit RGS2-KO untersucht. Bei unseren Versuchen an Mäusen mit fehlendem RGS2 Protein (RGS2-KO) war der mittels Tail-Cuff Plethysmographie und invasiver Messung über die A. carotis gemessene systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruck nicht signifikant erhöht (Abb. 3.1, S.25). Die Herzfrequenz hingegen war bei RGS2-KO signifikant erniedrigt. Dies steht im Widerspruch zu den zuvor erwähnten Publikationen, bei denen eine eindeutige Hypertonie beschrieben wurde (Heximer et al., 2003; Tang et al., 2003; Gross et al., 2005)[35][85][28]. RGS2-KO weisen hier einen ausgeprägten hohen Blutdruck auf, haben renovaskuläre Fehlbildungen, eine ständige Vorkonstriktion der Widerstandsgefäße und eine verlängerte und gesteigerte Reaktion der Blutgefäße auf Vasokonstriktoren wie Endothelin. Im Folgenden wird versucht zu erklären, wieso diese Hypertonie bei den hier durchgeführten Versuchen nicht signifikant nachzuweisen war. Als Einführung wird die wechselseitige Beziehung zwischen dem Herzen, den Blutgefäßen und der Blutdruckregulation erklärt, um die späteren Ausführungen besser einordnen zu können. Über eine Messung des arteriellen Blutdrucks ist es möglich, den peripheren Widerstand und das Herzzeitvolumen zu beurteilen. Der aktuelle Blutdruck wird durch beide Parameter bestimmt. Durch die Veränderung eines dieser beiden Parameter kann es zur kompensatorischen Änderung des anderen Parameters kommen. Das autonome Nervensystem mit seinen Regulationsmechanismen ist hieran beteiligt. Eine zusätzliche Messung der Herzfrequenz lässt Schlüsse über den Aktivierungsgrad des autonomen Nervensystems am Herzen zu. Bei einer gleichbleibenden Herzfrequenz ist es wahrscheinlich, dass auch die Kontraktionskraft des Herzens dieselbe geblieben ist. Deshalb lassen Veränderungen des arteriellen Blutdrucks eine Anpassung des peripheren Widerstands vermuten, wenn sie nicht mit einer Veränderung der Herzfrequenz verbunden sind. Um eine exakte Aussage zu treffen, müsste mit einer invasiven Methode noch zusätzlich das Herzminutenvolumen bestimmt werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde dies nicht durchgeführt. Von Mattson wurde gezeigt, dass der arterielle Mitteldruck zwischen unterschiedlichen Mausstämmen

variieren kann (Mattson, 2001)[54]. Aus diesem Grund wurden Mäuse mit gleichem genetischen Hintergrund (C57BL/6) zur Untersuchung herangezogen. Damit können beim Vergleich die basalen hämodynamischen Parameter zwischen den verschiedenen Genotypen direkt verglichen werden. Die hier erwähnte Bradykardie der RGS2-KO Mäuse lässt im Vergleich zum Wildtyp auf eine wohl vorbestehende Kontraktion der Gefäßmuskulatur und damit einem erhöhten peripheren Widerstand schließen, der nötig ist, um einen gleichbleibenden Blutdruck aufrechtzuerhalten. Diese Bradykardie mag auch durch das Alter der Mäuse beeinflusst werden, denn für RGS2-KO wird in der Literatur eine sich entwickelnde Herzhyperthrophie und Insuffizienz beschrieben, die durch den zuvor bestehenden Bluthochdruck ausgelöst wurde (Zhang et al., 2006; Takimoto et al., 2009; Tsang et al., 2010)[97][84][87]. Die hier durchgeführten Versuche wurden an Mäusen mit einem Mindestalter von drei Monaten durchgeführt. Diese Tatsachen können einen möglichen arteriellen Hypertonus, der durch den Gendefekt bedingt ist, verschleiern. Bei sehr jungen Tieren hingegen ist der Blutdruck drastisch erhöht, das wurde in anderen Studien belegt (Heximer et al., 2003; Tang et al., 2003)[35][85]. Von Heximer (Heximer et al., 2003)[35] wurde bei RGS2-KO ein Anstieg des mittleren Blutdrucks von ~50 mmHg gegenüber Wildtypmäusen C57BL/6 von 84 mmHg (+/- 6) gemessen. Diese arterielle Hypertonie wurde sowohl an wachen als auch narkotisierten Mäusen nachgewiesen. Wie in den hier durchgeführten Versuchen wurde für die invasive Blutdruckbestimmung Isofluran als Anästhetikum verwendet. Bei Heximer hat sich somit keine Wirkung von Isofluran auf den Blutdruck gezeigt. Allgemein haben die RGS2-KO Tiere einen schlechteren Gesundheitszustand. Das Körpergewicht ist vermindert, was auf einen schlechteren Ernährungszustand der Mäuse schließen lässt, da sie bei freiem Zugang zu Nahrung und Wasser gehalten wurden. Dies konnte von Nunn (Nunn et al., 2011)[60] bei RGS2-KO Tieren schon ab einem Alter von 4 Wochen nachgewiesen werden und verblieb so über die ganze Lebensperiode der Versuchstiere (21 - 24 Monate). Die Regulation des arteriellen Blutdrucks ist sehr wichtig und so ist es auch denkbar, dass bei den RGS2-KO Mäusen andere blutdruckregulierende Systeme kompensatorisch verändert sind. So sind unter Umständen kompensatorische Mechanismen entstanden, durch die sich der zunächst sehr stark hypertone Maustyp (+50 mmHg mittlerer Blutdruck)(Heximer et al., 2003)[35] in einen Typ mit einem weniger stark ausgeprägten Hypertonus entwickelt hat (+10 mmHg mittlerer Blutdruck)(Gross et al., 2005)[28]. Bei weiteren Studien von Obst (Obst et al., 2006)[61] wurde nur noch eine Erhöhung des mittleren Blutdrucks von 7 mmHg ebenso im Mittel aus Tag und Nachtwerten festgestellt. In noch späteren Studien

von Hercule (Hercule et al., 2007)[34] war tagsüber kein signifikanter Unterschied des mittleren arteriellen Blutdrucks der RGS2-KO Mäuse mehr festzustellen (109-107 mmHg). Es differierten nur noch die Nachtwerte signifikant (117-112 mmHg). Auch in unseren Versuchen konnten ähnliche Blutdruckunterschiede bei der Blutdruckmessung am Tag festgestellt werden. Die Daten der oben genannten Zitate wurden jeweils an wachen, nicht narkotisierten Mäusen mittels Telemetrie erhoben. Dies könnte auch eine weitere Erklärung für die hier festgestellte und signifikante Bradykardie der RGS2-KO Mäuse sein. Durch die Bradykardie des Herzens wird der Spannungszustand des Blutgefäßsystems ausgeglichen, was sich hier in einem leicht erhöhten, aber nicht mehr signifikant nachzuweisenden Blutdruckunterschied zeigt. Diese Vermutung wurde auch von Obst (Obst et al., 2006)[61] geäußert, denn in diesen Studien zeigte sich eine konstant erniedrigte Herzrate bei dem RGS2-KO Maustyp. In späteren Studien zeigte sich bei Hercule (Hercule et al., 2007)[34] dieser Effekt noch ausgeprägter. Dies stand auch in Verbindung mit einem weiteren Rückgang des Blutdrucks (s. o.), was diese Hypothese, der Gegenregulation des Blutdrucks über die Herzschlagrate, noch weiter stützt. Der Unterschied der Herzfrequenz konnte aber bisher nicht als signifikant nachgewiesen werden. Durch die genaue Auswertung konnte in unseren Versuchen der Unterschied der Herzschlagrate nun als signifikant bestätigt werden.

4.2.2 Die vasokonstriktorisches und hypertensiven Effekte von Ang II waren an RGS2-KO Tieren unverändert

Beim Vergleich der beiden Mausgruppen konnte für RGS2-KO Mäuse kein verstärkter vasokonstriktorisches Effekt von Ang II in der Mikrozirkulation nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu unserer zuvor aufgestellten Hypothese. Von Sun (Sun et al., 2005)[83] wurden Versuche an kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta und von Widerstandsgefäßen des Mesenteriums von Mäusen durchgeführt. Hierbei wurden Calcium-stimulierende Effekte von verschiedenen GPCR-Antagonisten untersucht. Für Ang II wurde hierbei ermittelt, dass ein abgeschwächter und nicht homogener Effekt auf die isolierten Muskelzellen festzustellen war. Es gab nur eine Zellantwort von 30 % der kultivierten Zellen. Für andere Antagonisten zeigten sich bedeutend höhere Effekte. Diese Tatsache mag es erschweren, die vasokonstriktiven Effekte von Ang II bei beiden Maustypen unterscheiden zu können. Ein weiterer Grund kann auch die relativ niedrige Konzentration von Ang II (0.1 nM) sein, durch die mögliche Unterschiede des vasokonstriktiven Effekts von Ang II bei beiden Mausgruppen nicht unterschieden

werden konnten. Unsere eigene Gruppe konnte hingegen beobachten, dass Calciumstimulierende Effekte von Ang II an Kardiomyozyten von RGS2-KO Mäusen gesteigert sind (Klaiber et al., 2010)[44]. Bei der invasiven Blutdruckmessung konnte ebenso kein Unterschied von Ang II bei RGS2-KO festgestellt werden. Dies steht im Widerspruch zu anderen Publikationen. Von Hercule konnte ein erhöhter Blutdruck für RGS2-KO festgestellt werden (Hercule et al., 2007)[34]. Diese Versuche wurden aber mittels Telemetrie an wachen Mäusen durchgeführt. Unsere Versuche waren hingegen an durch Isofluran narkotisierten Mäusen. Möglich ist, dass die Narkose einen starken Effekt auf den Vasotonus und Blutdruck hatte. Dieser Vermutung wird auch durch Versuche von Heximer (Heximer et al., 2003)[35] gestützt, denn es wurde an durch Ketamin und Xylazin narkotisierten Mäusen ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Bei einer Infusion von Ang II in sehr hohen Konzentrationen war nur bei dem Wildtyp ein deutlicher Effekt in Form eines Blutdruckanstieges zu erkennen. Als mögliche Erklärung hierfür wurde von Heximer erwähnt, dass bei RGS2-KO möglicherweise eine Vorkonstriktion der Blutgefäße besteht und somit durch Ang II kein Effekt mehr auf RGS2-KO erzielt werden konnte. Es ist auch möglich, dass sich der Effekt der Narkose vor allem auf den RGS2-KO Typ stärker ausgewirkt hat, denn wie oben beschrieben, konnte von Hercule (Hercule et al., 2007)[34] an wachen Mäusen mittels Telemetrie ein verstärkter Effekt von Ang II auf RGS-KO nachgewiesen werden.

4.2.3 Die vasodilatierenden und hypotensiven Effekte von ANP waren an RGS2-KO Tieren vermindert

Die Versuche mittels intravitaler Mikroskopie an RGS2-KO Mäusen zeigten, dass der vasokonstriktorische Effekt von Ang II in der Mikrozirkulation von ANP nicht aufgehoben wurde (Abb. 3.23). Bei den invasiven Blutdruckmessungen konnte ebenso festgestellt werden, dass der hypertensive Effekt von Ang II durch ANP nicht signifikant inhibiert wurde. Die Kontraktion der glatten Muskulatur wird von Ang II über den G_{α_q} gekoppelten AT_1 -Rezeptor ausgelöst (Abb. 1.3). Der Regulator des G-Protein Signalwegs 2 (RGS2) ist ein negativer Regulator von G_{α_q} . Von RGS2 ist bekannt, dass eine Stimulation und Membrantranslokation über die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) induziert wird (Osei-Owusu et al., 2007)[64]. Die hier geschilderten Ergebnisse deuten darauf hin, dass ANP dem vasokonstriktorischen Effekt von Ang II über die Aktivierung von RGS2 entgegenwirkt. Dieser Effekt wurde auch in unserer Forschungsgruppe von Klaiber (Klaiber et al., 2010)[44] an isolierten Kardiomyozyten nachgewiesen. Es

konnte gezeigt werden, dass ANP den Calcium-stimulierenden Effekt von Ang II hemmt. Erstaunlicherweise hatte im Gegensatz zu ANP SNP/NO durchaus noch einen vasodilatierenden Effekt an RGS2-KO Tieren. Dieses Ergebnis passt zu anderen publizierten Beobachtungen. Vom GC-A-Rezeptor produziertes cGMP bleibt an der Membran kompartmentalisiert, während die NO-stimulierte lösliche Guanylylzyklase (sGC) zu cGMP Anstiegen im Zytosol der glatten Muskelzellen führt und somit auch viele weitere Zielproteine erreicht (Piggott et al., 2006)[66].

4.2.4 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

1. ANP hat keinen Effekt auf den basalen Gefäßtonus in der Mikrozirkulation.
2. ANP ist in der Lage, die durch Ang II ausgelöste Gefäßkontraktion an Wildtypmäusen aufzuheben und darüber hinaus eine Dilatation zu bewirken.
3. Bei RGS2-KO Mäusen ist ANP nicht in der Lage, den vasokonstriktorisches Effekt von Ang II aufzuheben. RGS2 ist somit eine wichtige Schnittstelle zur Regulation des peripheren Widerstands und des Blutdrucks durch Ang II und ANP.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion von ANP und Ang II im Bereich der blutdruckbestimmenden Widerstandsgefäße zu untersuchen. Ein besonderer Augenmerk wurde hierbei auch auf die Bedeutung von RGS2 gerichtet. Durch das Zusammenspiel der beiden funktionellen Antagonisten ANP und Ang II wird der Blutdruck reguliert. ANP und Ang II üben hierbei jeweils gegenteilige Effekte aus. Ang II hat vasokonstriktorische Effekte auf die Blutgefäße, vermindert die Natriurese und Diurese und erhöht den Sympathikustonus. ANP hingegen besitzt blutdruckmindernde Effekte, hervorgerufen durch Vasodilatation, gesteigerte Diurese, die Erhöhung der endothelialen Durchlässigkeit und der Hemmung des Sympathikustonus. Da nichts über die Interaktion dieser beiden Hormone in der Mikrozirkulation bekannt ist, wurden im Rahmen der Dissertation intravitalmikroskopische Studien der Mikrozirkulation des Musculus cremaster der Maus, in Anlehnung an der von Baez (1973)[6] publizierte Methode, durchgeführt. Darüber hinaus wurden auch die Effekte von Ang II und ANP auf den Blutdruck durch invasive Blutdruckmessung untersucht.

Der Durchmesser von präkapillären Arteriolen des M. cremaster wurde vor und während lokaler Superfusion von Ang II oder ANP gemessen. Ang II löste eine konzentrationsabhängige stabile Konstriktion aus. Bei der ausschließlichen Superfusion von ANP in verschiedenen Konzentrationen hingegen, zeigte sich kein Effekt auf den basalen Vasotonus. ANP war jedoch in der Lage, an Ang II-vorkontrahierten Arteriolen, den konstriktorischen Effekt von Ang II aufzuheben und sogar darüber hinaus eine ausgeprägte Vasodilatation zu bewirken. Dieser Effekt konnte auch bei der invasiven Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks nachgewiesen werden. Der durch Ang II ausgelöste Blutdruckanstieg wurde durch die zusätzliche Infusion von ANP gemindert. Ang II aktiviert die Kontraktion von glatten Gefäßmuskelzellen durch den G_{α_q} -gekoppelten AT_1 -Rezeptor. RGS2 hingegen ist ein negativer Regulator von G_{α_q} . Da von RGS2 bekannt ist, dass er von cGKI phosphoryliert und stimuliert wird (Osei-Owusu et al., 2007)[64], stellte sich die Frage, ob ANP über RGS2 dem vasokonstriktiven Effekt von Ang II entgegenwirkt. Bei den Versuchen an RGS2-KO Mäusen zeigt sich hierbei, dass ANP nicht mehr in der Lage ist, den vasokonstriktiven Effekt von Ang II aufzuheben. Daraus ist nun der Schluss zu ziehen, dass RGS2 eine bedeutende Rolle für die Wechselwirkung zwischen ANP und Ang II in der Mikrozirkulation spielt und somit eine wichtige Aufgabe bei der Regulation des peripheren Widerstands und des Blutdrucks hat (Höhne et al., 2012)[38].

5.1 Abstract

The aim of this dissertation was the investigation of the interactions between ANP and Ang II in the regulation of the tone of resistance vessels, with special focus on the role of RGS2. Arterial blood pressure is regulated by the interactions of ANP and Ang II, hormones which act as functional counterparts. Ang II leads to vasoconstriction, reduces natriuresis and diuresis, and enhances sympathetic tone. ANP on the contrary has hypotensive effects, mediated by vasodilatation, diuresis, increased endothelial permeability, and inhibition of sympathetic tone. Because nothing is known about the interaction of both hormones in resistance vessels, we performed intravital microscopy studies of the mouse cremaster microcirculation. The cremaster muscle was prepared as described by Baez (1973)[6]. Furthermore the effects of ANP and Ang II on arterial blood pressure were investigated by invasive blood pressure measurements.

Arteriolar diameters were measured before and during local superfusion of Ang II or ANP. Ang II induced concentration dependent stable arteriolar constrictions. ANP did not affect diameters of unstimulated arterioles. However the peptide completely reversed the vasoconstrictory effect of Ang II. Moreover, in Ang II-precontracted arterioles, ANP provoked a prominent dilatation. The interaction between ANP and Ang II was collaborated by invasive arterial blood pressure measurements. The hypertensive effect of Ang II was partly reversed by ANP. Ang II activates smooth muscle contraction through the the $G_{\alpha q}$ -coupled AT_1 -receptor. The regulator of G protein signalling RGS2 is a negative regulator of $G_{\alpha q}$. Because RGS2 is known to be phosphorylated and thereby stabilized by cGMP-dependent protein kinase (cGKI) (Osei-Owusu et al., 2007)[64], we hypothesized that ANP counteracts the vasoconstrictory actions of Ang II by activation of RGS2. Indeed in RGS2-KO mice ANP failed to reverse the vasoconstrictory actions of Ang II. We conclude that RGS2 mediates the interplay between ANP and Ang II, which is critically involved in the regulation of peripheral resistance and arterial blood pressure (Höhne et al., 2012)[38].

In reference to:

Höhne C., Chen W., Völker K., Gaßner B., Kuhn M.

Atrial Natriuretic Peptide counteracts the microvascular vasoconstrictory effect of angiotensin II via activation of RGS2

Acta Physiologica 2012; Volume 204, Supplement 689 :P048

Literaturverzeichnis

- [1] C. Aalkjaer, M. Mulvany, and N. Nyborg. Atrial natriuretic factor causes specific relaxation of rat renal arcuate arteries. *British journal of pharmacology*, 86(2):447–453, 1985.
- [2] A. Allen, J. Zhuo, and F. Mendelsohn. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *American journal of hypertension*, 13:31S–38S, 2000.
- [3] F. Almeida, M. Suzuki, R. Scarborough, J. Lewicki, and T. Maack. Clearance function of type c receptors of atrial natriuretic factor in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 256(2):R469–R475, 1989.
- [4] A. Ammendola, A. Geiselhöringer, F. Hofmann, and J. Schlossmann. Molecular determinants of the interaction between the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *Journal of Biological Chemistry*, 276(26):24153–24159, 2001.
- [5] M. Anand-Srivastava and G. Trachte. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacological reviews*, 45(4):455–497, 1993.
- [6] S. Baez. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvascular research*, 5(3):384, 1973.
- [7] T. Bahnson, S. Pandol, and V. Dionne. Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca²⁺ entry in pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15):10808–10812, 1993.
- [8] B. Berk, T. Brock, R. C. Webb, M. Taubman, W. Atkinson, M. Gimbrone Jr, and R. W. Alexander. Epidermal growth factor, a vascular smooth muscle mitogen, induces rat aortic contraction. *Journal of Clinical Investigation*, 75(3):1083, 1985.
- [9] D. Berman, T. Kozasa, and A. Gilman. The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44):27209–27212, 1996.
- [10] S. Bolz, L. Vogel, D. Sollinger, R. Derwand, C. de Wit, G. Loirand, and U. Pohl. Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation*, 107(24):3081–3087, 2003.

- [11] B. Brenner, B. Ballermann, M. Gunning, and M. Zeidel. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological reviews*, 70(3):665–699, 1990.
- [12] Z. L. Brookes, N. J. Brown, and C. S. Reilly. Response of the rat cremaster microcirculation to hemorrhage in vivo: differential effects of intravenous anesthetic agents. *Shock*, 18(6):542–548, 2002.
- [13] L. Calò, E. Pagnin, P. Davis, M. Sartori, G. Ceolotto, A. Pessina, and A. Semplicini. Increased expression of regulator of G protein signaling-2 (RGS-2) in Bartter’s/Gitelman’s syndrome. A role in the control of vascular tone and implication for hypertension. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(8):4153–4157, 2004.
- [14] W. Cheung et al. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science (New York, NY)*, 207(4426):19, 1980.
- [15] H. Cho, K. Harrison, O. Schwartz, and J. Kehrl. The aorta and heart differentially express RGS (regulators of G-protein signalling) proteins that selectively regulate sphingosine 1-phosphate, angiotensin II and endothelin-1 signalling. *Biochemical Journal*, 371(Pt 3):973, 2003.
- [16] A. De Bold, H. Borenstein, A. Veress, and H. Sonnenberg. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life sciences*, 28(1):89–94, 1981.
- [17] A. de Bold, K. Ma, Y. Zhang, L. Mercedes, K. de Bold, M. Bensimon, and A. Khoshbaten. The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 79(8):705–714, 2001.
- [18] E. R. Derbyshire and M. A. Marletta. Biochemistry of soluble guanylate cyclase. *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications*, pages 17–31, 2009.
- [19] D. E. Dostal and K. M. Baker. The Cardiac Renin-Angiotensin System Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? *Circulation research*, 85(7):643–650, 1999.
- [20] S. D’Souza, M. Davis, and G. Baxter. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacology & therapeutics*, 101(2):113–129, 2004.
- [21] F. Epstein, E. Levin, D. Gardner, and W. Samson. Natriuretic peptides. *New England Journal of Medicine*, 339(5):321–328, 1998.

- [22] J. Faber. Effect of local tissue cooling on microvascular smooth muscle and postjunctional alpha 2-adrenoceptors. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 255(1):H121, 1988.
- [23] J. Faber, D. Gettes, and D. Gianturco. Microvascular effects of atrial natriuretic factor: interaction with alpha 1-and alpha 2-adrenoceptors. *Circulation Research*, 63(2):415, 1988.
- [24] T. Flynn, M. de Bold, and A. de Bold. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochemical and biophysical research communications*, 117(3):859–865, 1983.
- [25] D. Garbers. Guanylyl cyclase-linked receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 50(3):337–345, 1991.
- [26] D. Garbers, D. Koesling, and G. Schultz. Guanylyl cyclase receptors. *Molecular biology of the cell*, 5(1):1, 1994.
- [27] S. Grant, B. Lassègue, K. Griendling, M. Ushio-Fukai, P. Lyons, and R. Alexander. Specific regulation of RGS2 messenger RNA by angiotensin II in cultured vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology*, 57(3):460–467, 2000.
- [28] V. Gross, J. Tank, M. Obst, R. Plehm, K. Blumer, A. Diedrich, J. Jordan, and F. Luft. Autonomic nervous system and blood pressure regulation in RGS2-deficient mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(5):R1134–R1142, 2005.
- [29] S. Gu, C. Cifelli, S. Wang, and S. Heximer. RGS proteins: identifying new GAPs in the understanding of blood pressure regulation and cardiovascular function. *Clinical Science*, 116:391–399, 2009.
- [30] J. Hamzah, M. Jugold, F. Kiessling, P. Rigby, M. Manzur, H. Marti, T. Rabie, S. Kaden, H. Gröne, G. Hämmerling, et al. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature*, 453(7193):410–414, 2008.
- [31] M. Haneda, R. Kikkawa, S. Maeda, M. Togawa, D. Koya, N. Horide, N. Kajiwara, Y. Shigeta, et al. Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation. *Kidney Int*, 40(2):188–194, 1991.

-
- [32] L. Hein, L. Meinel, R. Pratt, V. Dzau, and B. Kobilka. Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Molecular Endocrinology*, 11(9):1266–1277, 1997.
- [33] J. Hepler, D. Berman, A. Gilman, and T. Kozasa. RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq α and block activation of phospholipase C β by γ -thio-GTP-Gq α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2):428, 1997.
- [34] H. C. Hercule, J. Tank, R. Plehm, M. Wellner, A. C. da Costa Goncalves, M. Gollasch, A. Diedrich, J. Jordan, F. C. Luft, and V. Gross. Regulator of G protein signalling 2 ameliorates angiotensin II-induced hypertension in mice. *Experimental Physiology*, 92(6):1014–1022, 2007.
- [35] S. Heximer, R. Knutsen, X. Sun, K. Kaltenbronn, M. Rhee, N. Peng, A. Oliveirados Santos, J. Penninger, A. Muslin, T. Steinberg, et al. Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 111(4):445–452, 2003.
- [36] S. Heximer, N. Watson, M. Linder, K. Blumer, and J. Hepler. RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gq α function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26):14389, 1997.
- [37] F. Hofmann, A. Ammendola, and J. Schlossmann. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of cell science*, 113(10):1671–1676, 2000.
- [38] C. Höhne, W. Chen, K. Völker, B. Gaßner, and M. Kuhn. Atrial natriuretic peptide counteracts the microvascular vasoconstrictory effect of angiotensin II via activation of RGS2. *Acta Physiologica, Supplement 689 :P048*, 204, 2012.
- [39] A. Hughes, H. Nielsen, and P. Sever. The effect of atrial natriuretic peptide on human isolated resistance arteries. *British journal of pharmacology*, 97(4):1027–1030, 1989.
- [40] H. Ito, Y. Hirata, S. Adachi, M. Tanaka, M. Tsujino, A. Koike, A. Nogami, F. Murumo, and M. Hiroe. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 92(1):398, 1993.
- [41] A. Jobs, K. Schmidt, V. J. Schmidt, I. Lübke-meier, T. A. van Veen, A. Kurtz, K. Willecke, and C. de Wit. Defective Cx40 Maintains Cx37 Expression but Intact Cx40 Is Crucial for Conducted Dilations Irrespective of Hypertension Novelty and Significance. *Hypertension*, 60(6):1422–1429, 2012.

- [42] K. Kangawa and H. Matsuo. Purification and complete amino acid sequence of α -human atrial natriuretic polypeptide (α -hANP). *Biochemical and biophysical research communications*, 118(1):131–139, 1984.
- [43] U. N. Khot, G. M. Novaro, Z. B. Popović, R. M. Mills, J. D. Thomas, E. M. Tuzcu, D. Hammer, S. E. Nissen, and G. S. Francis. Nitroprusside in critically ill patients with left ventricular dysfunction and aortic stenosis. *New England Journal of Medicine*, 348(18):1756–1763, 2003.
- [44] M. Klaiber, M. Kruse, K. Völker, J. Schröter, R. Feil, M. Freichel, A. Gerling, S. Feil, A. Dietrich, J. E. C. Londoño, et al. Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic research in cardiology*, 105(5):583–595, 2010.
- [45] M. Kuhn. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation research*, 93(8):700–709, 2003.
- [46] M. Kuhn. Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic research in cardiology*, 99(2):76–82, 2004.
- [47] M. Kuwahara, S. Sugano, K. Yayou, H. Tsubone, and H. Kobayashi. Evaluation of a new tail-cuff method for blood pressure measurements in rats with special reference to the effects of ambient temperature. *Jikken dobutsu. Experimental animals*, 40(3):331, 1991.
- [48] J. Lewicki, B. Greenberg, M. Yamanaka, G. Vlasuk, M. Brewer, D. Gardner, J. Baxter, L. Johnson, and J. Fiddes. Cloning, sequence analysis, and processing of the rat and human atrial natriuretic peptide precursors. In *Federation proceedings*, volume 45, page 2086, 1986.
- [49] Y. Li, S. Hashim, and M. Anand-Srivastava. Angiotensin II-evoked enhanced expression of RGS2 attenuates Gi-mediated adenylyl cyclase signaling in A10 cells. *Cardiovascular research*, 66(3):503–511, 2005.
- [50] T. Lifschytz, E. C. Broner, P. Zozulinsky, A. Slonimsky, R. Eitan, L. Greenbaum, and B. Lerer. Relationship between rgs2 gene expression level and anxiety and depression-like behaviour in a mutant mouse model: serotonergic involvement. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2011.

- [51] M. Lopez, D. Garbers, and M. Kuhn. The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 272(37):23064, 1997.
- [52] K. Lucas, G. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Schulz, K. Chepenik, and S. Waldman. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological reviews*, 52(3):375–414, 2000.
- [53] T. Maack, M. Suzuki, F. Almeida, D. Nussenzweig, R. Scarborough, G. McEnroe, and J. Lewicki. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science*, 238(4827):675–678, 1987.
- [54] D. Mattson. Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. *American journal of hypertension*, 14(5):405–408, 2001.
- [55] L. Mazzolai, J. Nussberger, J. Aubert, D. Brunner, G. Gabbiani, H. Brunner, and T. Pedrazzini. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension*, 31(6):1324–1330, 1998.
- [56] M. J. McKinley and A. K. Johnson. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *Physiology*, 19(1):1–6, 2004.
- [57] D. Mistry and C. Garland. Nitric oxide (no)-induced activation of large conductance ca^{2+} -dependent k^{+} channels (bkca) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *British journal of pharmacology*, 124(6):1131–1140, 2009.
- [58] T. Munzel, R. Feil, A. Mulsch, S. Lohmann, F. Hofmann, and U. Walter. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by cyclic guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation*, 108(18):2172–2183, 2003.
- [59] K. Nakao, Y. Ogawa, S. Suga, and H. Imura. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. ii: Natriuretic peptide receptors. *Journal of hypertension*, 10(10):1111, 1992.
- [60] C. Nunn, P. Zhao, M. Zou, K. Summers, C. Guglielmo, and P. Chidiac. Resistance to age-related, normal body weight gain in *rgs2* deficient mice. *Cellular Signalling*, 2011.
- [61] M. Obst, J. Tank, R. Plehm, K. Blumer, A. Diedrich, J. Jordan, F. Luft, and V. Gross. No-dependent blood pressure regulation in *rgs2*-deficient

- mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(4):R1012–R1019, 2006.
- [62] A. Oliveira-dos Santos, G. Matsumoto, B. Snow, D. Bai, F. Houston, I. Wishaw, S. Mariathasan, T. Sasaki, A. Wakeham, P. Ohashi, et al. Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by RGS2. *Science Signalling*, 97(22):12272, 2000.
- [63] T. Orth, J. A. Allen, J. G. Wood, and N. C. Gonzalez. Plasma from conscious hypoxic rats stimulates leukocyte-endothelial interactions in normoxic cremaster venules. *Journal of Applied Physiology*, 99(1):290–297, 2005.
- [64] P. Osei-Owusu, X. Sun, R. Drenan, T. Steinberg, and K. Blumer. Regulation of rgs2 and second messenger signaling in vascular smooth muscle cells by cgmp-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43):31656–31665, 2007.
- [65] I. H. Page and O. Helmer. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *The Journal of experimental medicine*, 71(1):29–42, 1940.
- [66] L. A. Piggott, K. A. Hassell, Z. Berkova, A. P. Morris, M. Silberbach, and T. C. Rich. Natriuretic peptides and nitric oxide stimulate cgmp synthesis in different cellular compartments. *The Journal of general physiology*, 128(1):3–14, 2006.
- [67] L. Potter, S. Abbey-Hosch, and D. Dickey. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine reviews*, 27(1):47–72, 2006.
- [68] L. Potter and T. Hunter. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9):6057, 2001.
- [69] K. Proctor and S. Bealer. Selective antagonism of hormone-induced vasoconstriction by synthetic atrial natriuretic factor in the rat microcirculation. *Circulation Research*, 61(1):42, 1987.
- [70] D. Romero, M. Plonczynski, E. Gomez-Sanchez, L. Yanes, and C. Gomez-Sanchez. Rgs2 is regulated by angiotensin ii and functions as a negative feedback of aldosterone production in h295r human adrenocortical cells. *Endocrinology*, 147(8):3889–3897, 2006.

- [71] E. Ross and T. Wilkie. Gtpase-activating proteins for heterotrimeric g proteins: regulators of g protein signaling (rgs) and rgs-like proteins. *Annual review of biochemistry*, 69(1):795–827, 2000.
- [72] I. Ruiz de Azua, M. Scarselli, E. Rosemond, D. Gautam, W. Jou, O. Gavrilova, P. Ebert, P. Levitt, and J. Wess. Rgs4 is a negative regulator of insulin release from pancreatic β -cells in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17):7999–8004, 2010.
- [73] H. Ruskoaho. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacological reviews*, 44(4):479–602, 1992.
- [74] Y. SAAD, M. GARRETT, and J. RAPP. Multiple blood pressure qtl on rat chromosome 1 defined by dahl rat congenic strains. *Physiological Genomics*, 4(3):201–214, 2001.
- [75] J. Schlossmann, A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G. Wang, H. Allescher, M. Korth, M. Wilm, et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of irag, ip3 receptor and cgmp kinase $i\beta$. *Nature*, 404(6774):197–201, 2000.
- [76] J. Schlossmann, R. Feil, and F. Hofmann. Signaling through no and cgmp-dependent protein kinases. *Annals of medicine*, 35(1):21–27, 2003.
- [77] J. Sealey. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. *Hypertension; Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, pages 1287–1317, 1990.
- [78] N. Seki, S. Sugano, Y. Suzuki, A. Nakagawara, M. Ohira, M. Muramatsu, T. Saito, and T. Hori. Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of human rgs5, a novel g-protein signaling regulator gene. *Journal of human genetics*, 43(3):202–205, 1998.
- [79] D. Siderovski, S. Heximer, and D. Forsdyke. A human gene encoding a putative basic helix-loop-helix phosphoprotein whose mrna increases rapidly in cycloheximide-treated blood mononuclear cells. *DNA and cell biology*, 13(2):125–147, 1994.
- [80] D. Sierra, D. Gilbert, D. Householder, N. Grishin, K. Yu, P. Ukidwe, S. Barker, W. He, T. Wensel, G. Otero, et al. Evolution of the regulators of g-protein signaling multigene family in mouse and human. *Genomics*, 79(2):177–185, 2002.

- [81] L. T. Skeggs Jr, J. R. Kahn, and N. P. Shumway. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *The Journal of experimental medicine*, 103(3):295–299, 1956.
- [82] G. Stegmann. Observations on the use of midazolam for sedation, and induction of anaesthesia with midazolam in combination with ketamine in the goat. *Journal of the South African Veterinary Association*, 69(3):89–92, 1998.
- [83] X. Sun, K. Kaltenbronn, T. Steinberg, and K. Blumer. Rgs2 is a mediator of nitric oxide action on blood pressure and vasoconstrictor signaling. *Molecular pharmacology*, 67(3):631–639, 2005.
- [84] E. Takimoto, N. Koitabashi, S. Hsu, E. Ketner, M. Zhang, T. Nagayama, D. Bedja, K. Gabrielson, R. Blanton, D. Siderovski, et al. Regulator of g protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of pde5 inhibition in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(2):408, 2009.
- [85] M. Tang, G. Wang, P. Lu, R. Karas, M. Aronovitz, S. Heximer, K. Kaltenbronn, K. Blumer, D. Siderovski, Y. Zhu, et al. Regulator of g-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nature medicine*, 9(12):1506–1512, 2003.
- [86] R. M. Touyz, D. Endemann, G. He, J.-S. Li, and E. L. Schiffrin. Role of at2 receptors in angiotensin ii-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young shr. *Hypertension*, 33(1):366–372, 1999.
- [87] S. Tsang, A. Y.-H. Woo, W. Zhu, and R.-P. Xiao. Deregulation of rgs2 in cardiovascular diseases. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 2:547, 2010.
- [88] J. W. VanTeeffelen, A. A. Constantinescu, H. Vink, and J. A. Spaan. Hypercholesterolemia impairs reactive hyperemic vasodilation of 2A but not 3A arterioles in mouse cremaster muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(1):H447–H454, 2005.
- [89] C.-M. Wei, C. H. Kim, A. A. Khraibi, V. M. Miller, and J. Burnett. Atrial natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats and their vasorelaxing actions in vitro. *Hypertension*, 23(6 Pt 2):903–907, 1994.

- [90] S. Wölfle and C. de Wit. Intact endothelium-dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo. *Journal of vascular research*, 42(6):475–482, 2005.
- [91] S. E. Wölfle, V. J. Schmidt, J. Hoyer, R. Köhler, and C. De Wit. Prominent role of KCa_{3.1} in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation in vivo. *Cardiovascular research*, 82(3):476–483, 2009.
- [92] K. Wollert and H. Drexler. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovascular research*, 43(4):838–849, 1999.
- [93] H. Wu, H. Heng, X. Shi, D. Forsdyke, L. Tsui, T. Mak, M. Minden, and D. Siderovski. Differential expression of a basic helix-loop-helix phosphoprotein gene, G0S8, in acute leukemia and localization to human chromosome 1q31. *Leukemia*, 9(8):1291–1298, 1995.
- [94] Z. Xie, M. Gong, W. Su, J. Turk, and Z. Guo. Group VIA phospholipase A2 (iPLA2 β) participates in angiotensin II-induced transcriptional up-regulation of regulator of G-protein signaling-2 in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35):25278–25289, 2007.
- [95] B. Yalcin, S. A. Willis-Owen, J. Fullerton, A. Meesaq, R. M. Deacon, J. N. P. Rawlins, R. R. Copley, A. P. Morris, J. Flint, and R. Mott. Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *rgs2* modulates anxiety in mice. *Nature genetics*, 36(11):1197–1202, 2004.
- [96] T. Yandle, A. Richards, M. Nicholls, R. Cuneo, E. Espiner, and J. Livesey. Metabolic clearance rate and plasma half life of alpha-human atrial natriuretic peptide in man. *Life sciences*, 38(20):1827–1833, 1986.
- [97] W. Zhang, T. Anger, J. Su, J. Hao, X. Xu, M. Zhu, A. Gach, L. Cui, R. Liao, and U. Mende. Selective loss of fine tuning of Gq/11 signaling by RGS2 protein exacerbates cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9):5811, 2006.
- [98] R. Zivin, J. Condra, R. Dixon, N. Seidah, M. Chretien, M. Nemer, M. Chamberland, and J. Drouin. Molecular cloning and characterization of DNA sequences encoding rat and human atrial natriuretic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(20):6325, 1984.

- [99] Z. Zukowska-Grojec, M. Haass, I. J. Kopin, and N. Zamir. Interactions of atrial natriuretic peptide with the sympathetic and endocrine systems in the pithed rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 239(2):480–487, 1986.

7 Anhang

7.1 Material

7.1.1 Hersteller der Reagenzien / Substanzen

Substanzen	Hersteller
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Germany
Fluoresceinisothiocyanat-Dextran	Sigma-Aldrich, MW ~120 kDa
Natrium-Nitroprussid	Sigma-Aldrich
Atriales natriuretisches Peptid	Bachem, Weil am Rhein, Germany

Narkose	Hersteller
Isofluran	Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany

Dreier-Narkose: (Bestandteile)	
Fentanyl	Janssen CILAG GmbH, Neuss, Germany
Midazolam	Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln, Germany
Medetomidin	Pfizer GmbH, Berlin, Germany

Gase zum Einstellen des Puffers

Technisches Gas N ₂ , CO ₂	Linde Ag, Pullach, Germany
--	----------------------------

7.1.2 Hersteller der Versuchsaufbauten

Invasive Blutdruckmessung der A. carotis:

Geräte	Hersteller
Gerät zur Isoflurannarkose	Vip TM 3000 - Isofluran, Matrx, NewYork, USA
Pumpen für Narkose und Infusion	Syringe Pump 11 Plus, Harvard Apparatus, USA
Heizplatte für Versuchstiere	TKM-0903 Temperature-Control-Module
Schreiber zur Datenaufzeichnung	WeKagraph ALFOS WK-480K MIO-0501 DC-Brückenverstärker bezogen bei FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, D

Nichtinvasive plethysmographische Messung des arteriellen Blutdrucks:

Gerät	Hersteller
Blutdruck-Schwanzmanschette	Softtron TM BP-98A + TN-60 & TMC-203 Heizelement

Intravitalmikroskopie am Musculus cremaster:

Geräte	Hersteller
Mikroskop	Olympus BX41, Objektiv 20x
Lichtquelle für das Mikroskop	Olympus MT10 MTARC/Hg 150W Mercury/He
Kamera für Aufnahmen	OBS MegaView
Heizung Platte, Puffer	2x LAUDA A103 + A100 Temp.Regler, LAUDA, Lauda-Königshofen, Germany
Temperaturmesser	Voltcraft® K101 Digital Thermometer
Pumpen für Infusion/Superfusion	2x Syringe Pump 11 Plus, Harvard Apparatus, USA

Instrumente zur Präparation der Versuchstiere:

Geräte	Hersteller
Lupenbrille 2.5x	SandyGrendel, Aarburg, Switzerland
Lichtquelle	KL1500 LCD von Schott
Kauter zur Blutstillung	Bovie® Aaron Medical, Florida, USA

Mikrochirurgische Instrumente:

Irisschere, Nadelhalter, Irispinzette bezogen bei F.S.T. GmbH, Heidelberg, Germany

7.1.3 Verbrauchsmaterial

Fäden	Hersteller
Fäden aus Polypropylen	Ethicon INC Somerville, New Jersey, USA
Fäden zum Abbinden der Gefäße	0.4 mm Seide steril geflochten, Vömel, Kronberg, D

Spritzen/Kanülen	Hersteller
1 ml, 2ml	Dispomed Witt OHG, Gelnhausen, Germany Primo, Codan Medical Aps, Rødby, Denmark
Einmal-Kanülen	B.Braun Melsungen Ag, Melsungen, Germany Dispomed Witt OHG, Gelnhausen, Germany
Deckgläser	Ø12 mm von Hecht-Assistent, Sondheim, Germany

7.2 Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen

7.2.1 Krebs-Pufferlösung

Der präparierte Cremastermuskel wurde mit einer Krebs-Pufferlösung folgender Zusammensetzung superfundiert:

Bestandteile:		
Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM/l]
NaCl	58.44	120
KCl	74.56	4.7
KH ₂ PO ₄	136.1	1.2
CaCl ₂ x 2H ₂ O	147.0	2.5
MgSO ₂ x7H ₄ O	246.5	1.2
NaHCO ₃	84.01	20
Glucose	198.2	5.5

Tabelle 7.1: Zusammensetzung der Krebs-Pufferlösung

Diese Lösung wurde mit einem Gemisch aus 95 % N₂ und 5 % CO₂ begast, um einen pCO₂ von ca. 40 mmHg zu erreichen. Die durch diesen Druck eingestellte CO₂-Konzentration und die in der Lösung vorhandene HCO₃⁻-Konzentration führt zu einem pH-Wert von 7.4, der im Verlauf der Experimente kontrolliert wurde.

7.2.2 Narkoselösung

Substanz	Konzentration	Dosierung initial	Dosierung Perfusor
Fentanyl	0.004 mg/ml	0.032 mg/kg KGW	0.01 mg/kg KGW/h
Midazolam	0.440 mg/ml	3.520 mg/kg KGW	1.10 mg/kg KGW/h
Medetomidin	0.044 mg/ml	0.352 mg/kg KGW	0.11 mg/kg KGW/h

Tabelle 7.2: Zusammensetzung der Narkoselösung

Aus diesem Ansatz wurden Initial 8 μ l pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Während der Intravitalmikroskopie wurde durch eine Infusionspumpe, über einen Katheter in der rechten Vena jugularis, kontinuierlich mit einer Infusionsrate von 2.5 μ l je Gramm Körpergewicht pro Stunde die Tiefe der Anästhesie aufrecht erhalten.

7.2.3 Fluoresceinisothiocyanat-Dextran Lösung

Zur Darstellung der Blutgefäße der Mikrozirkulation des M. cremaster wurde nach der Präparation der Maus zu Versuchsbeginn über die Schwanzvene FITC-Dextran injiziert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde durch eine Lichtquelle bei einer Wellenlänge von 496 nm angeregt und gab dadurch grünes Licht bei einer Wellenlänge von 520 bis 530 nm ab. Um den Effekt des Photobleichens, also ein Rückgang des Fluoreszenzeffektes entgegenzuwirken, wurden die Versuche in Dunkelheit durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde im Dunkeln aufbewahrt, um ein vorzeitiges Ausbleichen zu verhindern. Der Bleicheffekt war für die Beleuchtung während der Versuche nicht von Bedeutung, da nur ein eng fokussierter Bereich des Muskels beleuchtet wurde und der sich in diesem Bereich befindliche Farbstoff durch die Zirkulation des Blutes, in dem sich der Farbstoff befand, ausgetauscht wurde. Von diesem Farbstoff wurden 10 mg in 1 ml 0.9 % NaCl gelöst und 3 μ l pro Gramm Körpergewicht injiziert.

7.3 Abkürzungen

A

A	Anzahl der Arteriolen
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Aqua.dest.	destilliertes Wasser
AT ₁	Angiotensin II Rezeptor Typ1
AT ₂	Angiotensin II Rezeptor Typ2
ATP	Adenosin-Triphosphat

B

BK _{Ca}	durch Calcium aktivierter Kanal für Kalium
------------------	--

C

Ca ²⁺	Calciumion zweifach positiv geladen
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-Monophosphat
cGKs	cGMP-abhängige Proteinkinasen
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase I
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase II
cGMP	cyclisches Guanosin-5'-Monophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

D

DBD	diastolischer Blutdruck
-----	-------------------------

E

ER	endoplasmatisches Retikulum
----	-----------------------------

F

FITC-D	Fluoresceinisothiocyanat-Dextran
--------	----------------------------------

G

GAP	GTPase aktivierendes Protein
G _{αq}	α-Untereinheit des G-Proteins
GC-A	Guanylylcyclase-Rezeptor vom Typ A
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat

H

HF	Herzfrequenz
----	--------------

I

IMBA	Institut für molekulare Biotechnologie in Wien
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRAG	Inositol-1,4,5-trisphosphat-assoziierten-cGKI-Substrats

K

KCl	Kaliumchlorid
KWK	Konzentrationswirkungskurve

L

Lsg.	Lösung
------	--------

M

MBD	mittlerer arterieller Blutdruck
MLK	Myosin-leichte-Kette

N

N	Anzahl der Versuche
N ₂	Stickstoff
N ₂ O	Lachgas
NO	Stickstoffmonoxid
NPs	Natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP)
NPRC-C	ANP-Clearance-Rezeptor

O

O₂ Sauerstoff

P

PBS phosphatgepufferte Salzlösung

PDEII Phosphodiesterase II

PDEIII Phosphodiesterase III

PLA₂ Phospholipase A₂

PLC Phospholipase C

R

RAAS Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RAS Renin-Aldosteron-System

RGS Regulatoren des G-Protein Signalwegs

RGS2 Regulator des G-Protein Signalwegs 2

RGS4 Regulator des G-Protein Signalwegs 4

RGS5 Regulator des G-Protein Signalwegs 5

S

SBD systolischer Blutdruck

SEM Standardfehler des Mittelwerts

sGC lösliche (soluble) Guanylylcyclase

SNP Natrium-Nitroprussid, NO-Donator

SR sarkoplasmatisches Retikulum

T

T Zeitabstand zwischen Messwerten

techn. technisch

V

VSCM glatte Gefäßmuskelzelle

W

WT Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

1.1	Wandaufbau Arteriole	2
1.2	Aminosäuresequenz des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) . . .	5
1.3	Schematische Darstellung der Rezeptoren von ANP und Ang II . . .	8
2.1	Versuchsordnung der plethysmographischen Blutdruckmessung . . .	12
2.2	Aufbau des Versuchstisches und Positionierung der Maus mit freigelegtem M. cremaster	15
2.3	Schematischer Aufbau der Superfusionsanlage	16
2.4	Beispiel der Auswertung eines Blutgefäßes	19
2.5	Beispiel der Auswertung eines Superfusionsversuchs mit SNP	20
2.6	Versuchsaufbau der invasiven Blutdruckmessung	23
3.1	Plethysmographische Blutdruckmessung	25
3.2	Vitalmikroskopie des M. cremaster, Kontrollversuch bei einer Wildtypmaus	27
3.3	Analyse des Kontrollversuchs bei einer Wildtypmaus	28
3.4	Auswertung aller Kontrollversuche bei Wildtyptieren	29
3.5	Einfluss von ANP auf den Blutgefäßdurchmesser des M. cremaster bei einer Wildtypmaus	30
3.6	Analyse des ANP-Effektes auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes	30
3.7	Auswertung aller ANP-Superfusionsversuche bei Wildtyptieren	31
3.8	Einfluss von SNP auf den Blutgefäßdurchmesser des M. cremaster bei einer Wildtypmaus	32
3.9	Analyse des SNP-Effektes auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer Wildtypmaus	32
3.10	Auswertung aller Versuche mit SNP-Superfusion bei Wildtyptieren . .	33
3.11	Ang II-Effekt auf den Gefäßdurchmesser einer Wildtypmaus	34
3.12	Analyse des Ang II-Effektes auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer Wildtypmaus	34
3.13	Auswertung aller Ang II-Superfusionsversuche bei Wildtyptieren . . .	35
3.14	Langzeiteffekt von 0.1 nM Ang II auf den Gefäßdurchmesser einer Wildtypmaus	36
3.15	Analyse des Langzeiteffektes von 0.1 nM Ang II auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer Wildtypmaus	36

3.16	Auswertung aller Superfusionsversuche mit 0.1 nM Ang II bei Wildtyptieren	37
3.17	Änderungen im Gefäßdurchmesser einer Wildtypmaus nach Superfusion mit Ang II und ANP	38
3.18	Analyse des Effektes einer Superfusion mit Ang II, ANP und SNP auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer Wildtypmaus .	38
3.19	Auswertung aller Ang II-/ ANP-/ SNP-Superfusionsversuche bei Wildtyptieren	39
3.20	Auswertung aller Kontrollversuche bei RGS2-KO Tieren	40
3.21	Änderung im Gefäßdurchmesser einer RGS2-KO Maus nach Superfusion mit Ang II, ANP und SNP	41
3.22	Analyse des Effektes einer Superfusion mit Ang II, ANP und SNP auf den Durchmesser eines ausgewählten Gefäßes bei einer RGS2-KO Maus	41
3.23	Auswertung aller Ang II-/ ANP-/ SNP-Superfusionsversuche bei RGS2-KO Tieren	42
3.24	Vergleich aller Versuche von Wildtyp- und RGS2-KO Tieren	43
3.25	Auswertung aller invasiven Blutdruckmessungen vor und während ANP-Infusion bei Wildtyp- und RGS2-KO Mäusen	44
3.26	Auswertung aller invasiven Blutdruckmessungen nach Ang II- und ANP-Infusion bei Wildtyptieren	45
3.27	Auswertung aller invasiven Blutdruckmessungen nach Ang II- und ANP-Infusion bei RGS2-KO Tieren	47
3.28	Vergleich aller Blutdruckexperimente von Wildtyp- und RGS2-KO Tieren	48
4.1	Reaktionswege Ang II, ANP, SNP, NO	55

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Physiologischen Institut der Universität Würzburg am Lehrstuhl I für vegetative Physiologie in der Arbeitsgruppe von Frau Prof.Dr.med. Michaela Kuhn durchgeführt.

Frau **Prof.Dr.med. Michaela Kuhn** möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die fachliche Betreuung danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für die Vermittlung des nötigen Fachwissens und die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten gilt mein besonderer Dank.

Herrn **Dr.Wen Chen** möchte ich für die Einführung in die Präparation des M. cremaster und die Verwendung des Intravitalmikroskops danken.

Frau **Katharina Völker** möchte ich für die Einführung in die invasive Blutdruckmessung, Präparationen an Vena iugularis und Arteria carotis danken.

Frau **Alexandra Gazinski** möchte ich für die Einführung in die Tail-Cuff Plethysmographie danken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts für die freundliche Aufnahme bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn **Markus Leimbach** für seine langjährige Freundschaft und seiner Hilfe bei Fragen zu L^AT_EX.

Ebenso danke ich Herrn **Dr.med.dent. Jörn Haase** für seine Unterstützung und dafür, dass er mir immer den nötigen Freiraum gegeben hat, um diese Arbeit fertigzustellen.

Vielen Dank an meine Eltern und meine Freunde, die mich während meines Studiums und der vorliegenden Dissertation unterstützt haben.