

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

***Der Einfluss des Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 2 auf das kardiovaskuläre  
Remodeling nach experimentellem Myokardinfarkt***

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
An der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Martha Maria Kirstein  
aus Gdingen (Polen)

Hamburg, 2010

**Widmung**

**Meinen Eltern.**

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. med. R. Böger

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. med. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

PD Dr. med. K. Sydow

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1. Angiotensin II .....	7
1.2. Angiotensin II und seine Rezeptoren .....	8
1.3. Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und ihre Bedeutung für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen .....	9
1.4. Wachstum und Remodeling von Blutgefäßen.....	11
1.5. Kardiovaskuläres Remodeling nach Myokardinfarkt .....	12
1.6. Rolle der Angiotensin II-Rezeptorsubtypen im Prozess des kardialen Remodelings und der Gefäßneubildung .....	13
1.6.1. Der Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1 .....	13
1.6.2. Der Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 2 .....	14
1.7. Ziele der Arbeit .....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1. AT2-Rezeptor-Knockout-Modell.....	17
2.2. Versuchsaufbau.....	17
2.3. Operatives Verfahren.....	19
2.3.1. Narkose.....	19
2.3.2. Myokardinfarktinduktion durch permanente Ligatur der LAD (Left Artery Descending) .....	19
2.3.3. Implantation von osmotischen Minipumpen .....	20
2.3.3. Postoperative Prozedur.....	20
2.3.4. Analgesie .....	21
2.4. Echokardiographie .....	21
2.5. Invasive Blutdruckmessung .....	21
2.6. Tötung der Tiere und Organentnahme .....	22
2.7. Histologie .....	22
2.7.1. Herstellung von Paraffinschnitten.....	22
2.7.2. Sirius-Rot-Färbung .....	24
2.7.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	24
2.7.4. Immunhistochemie .....	25
2.7.4.1. Visualisierung des AT2-R mittels Immunhistochemie.....	25
2.7.4.2. Endothelzellfärbung mittels eines CD31-Antikörpers.....	26

2.7.4.3. Färbung glatter Gefäßmuskelzellen mittels eines $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin-Antikörpers.....	27
2.7.4.4. Färbung von Monozyten- und Makrophagen mittels eines Mac-2-Antikörpers .....	27
2.7.4.5. T-Zellfärbung mittels eines CD3-Antikörpers .....	28
2.8. Morphometrie nach histologischer Färbung.....	28
2.8.1. Analyse kardialer Fibrose.....	28
2.8.2. Dichtebestimmung CD31-positiver Blutgefäße.....	29
2.8.3. Dichtebestimmung $\alpha$ -SMA-positiver Blutgefäße.....	29
2.8.4. Analyse der Monozyteninfiltration in die Infarktregion .....	30
2.8.5. Analyse der T-Zellinfiltration in die Infarktregion .....	30
2.9. RNA-Analysen .....	30
2.9.1. Isolation von RNA .....	30
2.9.2. Reverse Transkription .....	31
2.9.3. Qualitative RT-PCR.....	31
2.9.4. Quantitative RT-PCR.....	32
2.10. Statistik .....	33
2.10.1. Überlebensanalyse nach Myokardinfarktinduktion .....	33
2.10.2. T-Test.....	33
2.11. Material.....	34
2.11.1. Chemikalien .....	34
2.11.2. Antikörper.....	36
2.11.3. Hilfsmittel und Geräte.....	36
2.11.4. Lösungen .....	37
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
3.1 Überlebensanalyse .....	42
3.2. Echokardiographie.....	43
3.3. Invasive Blutdruckmessung .....	44
3.4. Histologie.....	46
3.4.1. Ergebnis der immunhistochemischen Färbung des AT2-R .....	46
3.4.2. Analyse kardialer Fibrose.....	48
3.4.3. Gefäßdichteanalyse .....	50
3.4.3. Analyse inflammatorischer Infiltrate des Herzens .....	54
3.5. Analysen der mRNA-Expression von AT1-R, AT2-R, TGF- $\beta$ und MCP-1.....	56

<b>4. Diskussion</b> .....	<b>59</b>
4.1. Diskussion der Methodik.....	59
4.1.1. Mausmodell.....	59
4.1.2. Operative Induktion des Myokardinfarkts .....	60
4.1.3. Echokardiographie .....	61
4.1.4. Invasive Blutdruckmessung.....	61
4.1.5. Immunhistochemie .....	61
4.1.6. Fibroseanalyse.....	62
4.1.7. <i>Real-Time</i> -PCR.....	63
4.2. Diskussion der Ergebnisse .....	64
4.2.1. Mortalität .....	64
4.2.2. Einfluss des AT2-R auf die kardiale Funktion.....	65
4.2.3. Einfluss des AT2-R auf den Blutdruck.....	66
4.2.4. Kardiale Fibrose und Expression von TGF- $\beta$ .....	67
4.2.5. Kardiale AT1- und AT2-R-Expression .....	68
4.2.6. Gefäßwachstum .....	69
4.2.7. Einfluss des AT2-R auf kardiale Inflammation und die MCP-1-Expression .....	69
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>71</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
<b>7. Literatur</b> .....	<b>74</b>
<b>8. Danksagung</b> .....	<b>90</b>
<b>9. Lebenslauf</b> .....	<b>91</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>92</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Angiotensin II

Bei Angiotensin II (Ang II) handelt es sich um den zentralen Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Ang II ist ein aus acht Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, welches enzymatisch aus dem Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) durch das Angiotensin-Conversions-Enzym (ACE) gespalten wird. Ang II ist ein wesentlicher Regulator akuter und chronischer sowie physiologischer und pathologischer Vorgänge des kardiovaskulären Systems. Es ist ein potenter Vasokonstriktor peripherer und renaler Arteriolen und Stimulator der Aldosteronfreisetzung aus der Zona Glomerulosa der Nebennierenrinde, der bedeutende Einflüsse auf die systemische Hämodynamik, Wasser- und Elektrolythaushalt ausübt und auch Langzeitwirkungen auf Herz und Blutgefäße durch direkte Stimulation von Hypertrophie und Proliferation verschiedener Zelltypen vermittelt (Matsubara, 1998; Horiuchi et al., 1999; Forth et al., 2001; Mehta et al., 2007). Darüber hinaus ist Ang II ein wichtiger Mediator von Inflammationsgeschehen: Es fungiert als chemotaktischer Faktor und Aktivator für Monozyten/Makrophagen und T-Zellen, die ihrerseits mit Elementen des RAAS und damit der Fähigkeit ausgestattet sind Ang II zu produzieren und dessen lokale Konzentration zu erhöhen (Hanh et al., 1994; Diet et al., 1996; Chen et al., 1998; Jurewicz et al., 2007; Hoch et al., 2009). Des Weiteren moduliert Ang II Fibrosegeschehen, indem es Wachstumsfaktoren stimuliert, wie z. B. den *Transforming Growth Factor-Beta1* (TGF- $\beta$ 1), mit anschließender Verstärkung der Kollagensynthese (Sun et al., 1998). Seit langem ist auch seine Beteiligung in die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen und die Progression des *Remodelings* nach Myokardinfarkt bekannt. So konnte in zahlreichen experimentellen Studien gezeigt werden, dass myokardiale Hypoxie mit einer Aktivierung des RAAS mit Steigerung der lokalen Ang II-Konzentrationen und verstärkter Expression von Angiotensin-Rezeptoren einhergeht und das RAAS-Blockade durch ACE-Inhibitoren bzw. Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1-Antagonisten (AT1-R-Antagonisten) das kardiale *Remodeling* positiv beeinflusst (Hirsch et al., 1991; Pfeffer, 1991; Lindpainter et al., 1993; Meggs et al., 1993; Schieffer et al., 1994). Belegen lässt sich die Bedeutung des RAAS für kardiales *Remodeling* zudem durch den klinischen Erfolg der ACE-inhibitoren und AT1-R-Antagonisten, welche nachgewiesenermaßen die kardiale Funktion verbessern und das Überleben von Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer

Funktion nach Myokardinfarkt oder mit chronischer Herzinsuffizienz verlängern (The SOLVD Investigators, 1991; Pfeffer et al., 1992; Lindpainter et al., 1993; ISIS-4 Collaborative Group, 1995; Ichiki, 2004).

## 1.2. Angiotensin II und seine Rezeptoren

Ang II entfaltet seine Wirkungen vornehmlich über mindestens zwei Rezeptorsubtypen: den Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1 (AT1-R) und den Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 2 (AT2-R). Beide sind heptahelikale Rezeptorsubtypen, die allerdings nur zu 32% in ihrer Aminosäuresequenz miteinander übereinstimmen und unterschiedliche biochemische und pharmakologische Eigenschaften besitzen (de Gasparo et al., 2000).

Der AT1-R wird ubiquitär über den gesamten Entwicklungszeitraum bis zum adulten Organismus relativ kontinuierlich exprimiert (Harada et al., 1999; de Gasparo et al., 2000). Die meisten gut bekannten Effekte von Ang II werden dem AT1-R zugeschrieben. So vermittelt Ang II über den AT1-R Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde, Hypertrophie von Kardiomyozyten, Proliferation von Fibroblasten, inflammatorische Effekte, interstitielle Kollagenablagerung und Katecholaminfreisetzung (Weber et al., 1991; Matsubara, 1998; Wolf et al., 2003).

Im Gegensatz zum AT1-R ist die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des AT2-R im kardiovaskulären und renalen System weniger gut charakterisiert. Die AT2-R-Expression erreicht bei der Maus zu Beginn der Neonatalentwicklung ein Maximum und fällt im adulten Organismus auf kaum detektierbare Werte ab (Matsubara, 1998; Horiuchi et al., 1999). Nach Ereignissen mit vaskulären Schäden wird allerdings vermutlich eine Re-Expression des AT2-R in betroffenen Geweben beobachtet (Nio et al., 1995; Henrion et al., 2001; Volpe et al., 2003). Bekannte physiologische Funktionen des AT2-R betreffen die Regulation von Blutdruck (Vasodilatation) sowie exploratorische Verhaltensweisen (Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995). So wurde in zwei unabhängig voneinander generierten AT2-R-*Knockout*(KO)-Modellen ein verstärkter Blutdruckeffekt von exogen zugeführtem Ang II in AT2-R-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp(WT)-Mäusen beobachtet (Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995). Basal allerdings waren die Blutdrücke in beiden Modellen nicht oder nur marginal erhöht. Des Weiteren wurden für den AT2-R anti-proliferative, pro-apoptische und migrationshemmende Effekte auf Endothelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten *in vitro* beschrieben (Stoll et al., 1995;

Yamada et al., 1998; Nadal et al., 2002; Benndorf et al., 2003; Falcon et al., 2005; Kou et al., 2007; Kang et al., 2008). Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte in vielen Studien eine AT<sub>2</sub>-R-vermittelte Aktivitätsminderung der ERK-1/-2 bzw. Akt-Kinase/Protein Kinase B in verschiedenen Zelltypen beobachtet werden, die möglicherweise durch Aktivierung von Phosphatasen, wie z. B. MAP Kinase Phosphatase-1 (MKP-1), Src Homology 2 Domain-Containing Protein-Tyrosine Phosphatase 1 (SHP-1) und Protein Phosphatase 2A (PP2A) verursacht wird (Matsubara et al., 1998; de Gasparo et al., 2000; Cui et al., 2002; Benndorf et al., 2003; Kou et al., 2007; Kang et al., 2008). Interessanterweise wurde zudem über eine G Protein-unabhängige direkte Interaktion des AT<sub>2</sub>-R mit dem AT<sub>2</sub>-R-Interacting Protein (ATIP) berichtet, über die der AT<sub>2</sub>-R eine Hemmung von Rezeptortyrosinkinasen vermitteln kann (Nouet et al., 2004; Wruck et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass der AT<sub>2</sub>-R die Aktivierung der kleinen monomeren GTPase RhoA inhibiert und so vermutlich einen Einfluss auf die vaskuläre Integrität und Induktion endothelialer Permeabilität ausüben kann (Ereso et al., 2007; Guilluy et al., 2008). Auch ein direkter molekularer AT<sub>1</sub>-R-Antagonismus wurde bereits für den AT<sub>2</sub>-R beschrieben, der die überwiegend AT<sub>1</sub>-R-antagonistischen Effekte des AT<sub>2</sub>-R erklären könnte (AbdAlla et al., 2001).

### **1.3. Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und ihre Bedeutung für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen**

Laut WHO sind rund ein Drittel aller Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen. Jährlich sterben geschätzte 17 Millionen Menschen weltweit an kardiovaskulären Erkrankungen, davon 7,2 Millionen Menschen allein an Myokardinfarkten. Kardiovaskuläre Erkrankungen nehmen stark an Bedeutung zu, sowohl in Industrie- als auch Entwicklungsländern. Ursächlich dafür gemacht werden eine Zunahme der Lebenserwartung, Urbanisierung und Wandel des Lebensstils mit Zunahme der Risikofaktoren wie Bewegungsmangel, Adipositas, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Rauchen und Hypertonus (World Health Organization: The Atlas of heart disease and stroke, 2004).

Nach aktuellen Leitlinien werden als Mittel der Wahl zur antihypertensiven Therapie bei Hochrisikopatienten mit chronischer Herzinsuffizienz, koronarer Herzerkrankung oder Nephropathie, Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) empfohlen. So zählen die Angiotensin-Conversions-Enzym(ACE)-Inhibitoren und AT<sub>1</sub>-

R-Antagonisten in diesem Zusammenhang zu den sehr häufig verordneten Arzneimitteln. Als neuestes Medikament aus der Gruppe der RAAS-Inhibitoren ist der Renininhibitor Aliskiren seit 2007 zugelassen. Vorteile gegenüber ACE-Inhibitoren und AT1-R-Antagonisten sind bisher nicht beschrieben worden, so dass der therapeutische Stellenwert vorerst unklar bleibt (Gradman et al., 2005; Birkenhager und Staessen, 2007; Oparil et al., 2007; Schwabe und Paffrath, Arzneimittelverordnungs-Report, 2009). Die breite therapeutische Bedeutung der ACE-Inhibitoren und AT1-R-Antagonisten zeigt sich in der steten Zunahme ihrer praktischen Anwendung. Ihr Verordnungsvolumen ist in den letzten zehn Jahren um den Faktor 3,2 gestiegen und der Zuwachs im Verschreibungsvolumen von ACE-Inhibitoren und AT1-R-Antagonisten war im Jahre 2008 mit 12 % bzw. 15 % höher als die aller übrigen Antihypertensiva. ACE-Inhibitoren und AT1-R-Antagonisten machen somit 50% des Verordnungsvolumens aller Antihypertensiva aus. Insbesondere ACE-Inhibitoren gehören mit 6,2 Milliarden Tagesdosen (2008) zu den am häufigsten angewendeten Arzneimittelgruppen in Deutschland. AT1-R-Antagonisten sind bei therapeutischer Äquivalenz, aber einer Überlegenheit hinsichtlich des Auftretens unerwünschter Ereignisse, wie z. B. des Reizhustens und des angioneurotischen Ödems, bei Unverträglichkeiten gegenüber ACE-Inhibitoren als *Second-Line*-Medikamente indiziert (Schwabe und Paffrath, Arzneimittelverordnungs-Report, 2009). Allerdings wurde erst kürzlich über ein möglicherweise carcinogenes Potential der AT1-R-Antagonisten berichtet, so dass die Sicherheit und Verträglichkeit einer Therapie mit AT1-R-Antagonisten noch nicht abschließend beurteilt werden kann (Nissen SE, 2010). Die verschiedenen Aspekte der Pharmakodynamik von AT1-R-Antagonisten sind bis dato noch nicht abschließend geklärt. So wurde beispielsweise über eine Aktivierung des *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR)- $\gamma$  durch den AT1-R-Antagonisten Telmisartan berichtet (Benson et al., 2004; Schupp et al., 2004; Benndorf et al., 2006). Zudem ist insbesondere die Bedeutung der im Rahmen der Therapie mit AT1-R-Antagonisten auftretende isolierte Stimulation des AT2R bislang eher unklar (Lévy, 2005). Dieser pharmakodynamische Aspekt ist allerdings von großer Bedeutung, da es unter der Therapie mit AT1-R-Antagonisten durch Unterbrechung der negativen *Feedbacks* auf die Renin-produzierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates zu einer Vervierfachung der Angiotensin II- Plasmaspiegel kommt (Müller et al., 1997; Azizi et al., 2004; Lévy, 2005; Strauss und Hall, 2006).

#### 1.4. Wachstum und *Remodeling* von Blutgefäßen

Man unterscheidet drei hauptsächliche Prozesse der Gefäßbildung und des Gefäßumbaus: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese (Carmeliet, 2000). Vaskulogenese bezeichnet die *de novo* Bildung von Blutgefäßen während der Embryonalentwicklung. Hierbei migrieren angiogene oder endotheliale Progenitorzellen (EPCs) zum Ort der Vaskularisation, differenzieren sich dort zu Endothelzellen und bilden den initialen Gefäßplexus (Carmeliet, 2000). Lange Zeit war dieser Prozess ausschließlich der embryonalen Entwicklung zugeschrieben. Heutzutage weiß man, dass er auch im adulten Organismus unter pathologischen Umständen wie Ischämie, Malignität oder Inflammation auftritt (Carmeliet, 2000 und 2003). So konnte in der frühen Phase nach Myokardinfarkt eine größere Anzahl im Blut zirkulierender EPCs beobachtet werden als unter physiologischen Bedingungen (Massa et al., 2005). Zudem ging aus einer anderen Arbeit hervor, dass die spezifisch auf einen Stimulus wie Gewebeischämie aus dem Knochenmark mobilisierten EPCs zur Neovaskularisation im ischämischen Gewebe beitragen können (Takashi et al., 1999). Unter Angiogenese versteht man das Ausprossen neuer kapillärer Äste aus präexistenten Blutgefäßen. Tragender Stimulus der Angiogenese ist Hypoxie (Heil et al., 2006). Im Zentrum des regenerativen Gefäßwachstums nach Ischämie steht der *Hypoxia-Inducible-Factor 1* (HIF-1), ein globaler Regulator der Sauerstoffhomöostase. Dieser akkumuliert unter hypoxischen Bedingungen und reguliert die Expression verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren, wie z. B. den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), Angiopoietin (ANGPT) und Angiopoietin 2 (ANGPT2), welche in der Folge parakrin Endothelzellen stimulieren und Angiogenese-Prozesse induzieren (Carmeliet, 2000; Kelly et al., 2003; Semenza et al., 2007). Die entstehenden Gefäße muskularisieren durch Einsprossen und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, welche durch chemotaktisch wirkende Faktoren wie den *Platelet-derived Growth Factor Subunit B* (PDGF-B) oder VEGF rekrutiert werden. Der Ursprung glatter Gefäßmuskelzellen kann sehr verschieden sein. Glatte Gefäßmuskelzellen der Koronarvenen beispielsweise entspringen dem atrialen Myokard und die der Koronararterien dem Epikard, wobei sie sich entlang der präexistenten Gefäße vom Epi- zum Endokard hin ausrichten (Carmeliet, 2000 und 2003). Für die vaskuläre Reifung sind außerdem Perizyten essentiell, die durch Hemmung endothelialer Proliferation und Migration und durch Stimulation der Produktion von

Extrazellulärmatrix zu Stabilisierung der entstehenden Gefäße führen (Carmeliet, 2000).

Arteriogenese bezeichnet Kollateralarterienwachstum, d.h. den Umbau einer Kollateralarterie mit Erweiterung ihres intraluminalen Durchmessers als Antwort auf physikalische Kräfte wie gesteigerten Blutfluss nach (meist langsam progredienter) Okklusion eines großen Versorgungsgefäßes. Die so stimulierten Endothelzellen der Arterien exprimieren unter anderem Chemokine und Adhäsionsmoleküle, welche chemotaktisch auf inflammatorische Zelltypen, insbesondere Monozyten, wirken. Diese infiltrieren schließlich die Gefäßwand und setzen verschiedene Wachstumsfaktoren, Proteinase wie den *Urokinase-type Plasminogene Activator* (uPA) und *Matrix Metalloproteinases* (MMPs) sowie Nekrosefaktoren (TNF- $\alpha$ ) frei, die die Struktur der Media enzymatisch verändern (Carmeliet, 2000 und 2003). Vermehrte Expression von auf Monozyten chemotaktisch wirkenden Zytokinen wie des *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1) verstärken somit Kollateralarterienwachstum, anti-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) wirken dagegen hemmend (Carmeliet, 2003). Aktivierte Endothelzellen exprimieren und sezernieren außerdem verschiedene Wachstumsfaktoren wie den *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), den *Platelet-derived Growth Factor Subunit B* (PDGF-B) und den *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ), welche die Migration und das lokale Wachstum von glatten Muskelzellen stimulieren und letztlich die Gefäßerweiterung induzieren (Carmeliet, 2000; Heil et al., 2006).

### **1.5. Kardiovaskuläres *Remodeling* nach Myokardinfarkt**

Der akute Myokardinfarkt induziert globale und komplexe Umbauvorgänge der ventrikulären Architektur, die unter dem Oberbegriff des kardialen *Remodelings* zusammengefasst werden (Pfeffer et al., 1990; Pfeffer et al., 1991).

Der Prozess des *Remodelings* des infarzierten Gewebes beginnt dabei mit Ödembildung und einer Entzündungsreaktion mit Infiltration durch Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen, die eine Reihe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren sowie Proteasen freisetzen (Fishbein et al., 1978; Frangiogannis et al., 2002). In der Frühphase des Infarkts kommt es im Rahmen der Bildung des Nekroseareals zu einer Verdünnung der Infarktregion mit Dilatation des Ventrikels, der sogenannten *Infarct-Expansion* (Hutchins and Bulkley, 1978). Anschließend folgt die Wochen bis Monate

andauernde Langzeitphase der Wundheilung und Narbenbildung mit Proliferation von Fibroblasten und Kollagenablagerung sowie der kompensatorischen Hypertrophie nicht-nekrotischen Myokards (Fishbein et al., 1978; Pfeffer et al., 1991). Die ventrikuläre Hypertrophie, die starke Akkumulation von fibrillärem Kollagen, die interstitielle und perivaskuläre Fibrosierung sowie der Verlust von kontraktilen Gewebe resultieren in einer abnormen Steifigkeit der Ventrikel und ventrikulärer Dysfunktion. Der chronische Gebrauch kompensatorischer Mechanismen mit systolischer und diastolischer Reserveausschöpfung kann schließlich zu einer chronischen Herzinsuffizienz führen (Pfeffer et al., 1991; Harada et al., 1999; Ozono, 2000).

Eine weitere, integrale Komponente des kardialen *Remodelings* nach Infarkt ist die Gefäßadaptation des Myokards: Hypoxieregulierte Mediatorsubstanzen und hämodynamische Veränderungen nach Koronararterienverschluss führen zu Dilatation der vorhandenen Gefäße und einem regenerativen Gefäßwachstum, was eine Induktion von Angiogenese (Ausprossen neuer kapillärer Äste aus präexistenten Blutgefäßen) und Arteriogenese (Kollateralerterienwachstum) beinhaltet. (Nelissen-Vrancken et al., 1996; Carmeliet, 2000 und 2003). Zusätzlich wird nach Myokardinfarkt eine Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark beobachtet, die vermutlich direkt (Vaskulogenese) bzw. indirekt durch parakrine Effekte kardiales Gefäßwachstum stimulieren (Rafii und Lyden, 2003; Losordo und Dimmeler, 2004; Massa et al., 2005).

## **1.6. Rolle der Angiotensin II-Rezeptorsubtypen im Prozess des kardialen *Remodelings* und der Gefäßneubildung**

### **1.6.1. Der Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1**

Nach Myokardinfarkt partizipiert der AT1-R ganz wesentlich an der Progression des kardialen und vermutlich auch des vaskulären *Remodelings* (Weber, 1991; Oishi et al., 2003). Angiotensin II vermittelt über den AT1-R die Hypertrophie von Kardiomyozyten sowie die Proliferation von kardialen Fibroblasten und übt pro-inflammatorische Effekte nach Myokardinfarkt aus (Pfeffer, 1994; de Gasparo et al., 2000; Richard et al., 2000; Frangiogannis et al., 2002). So konnte gezeigt werden, dass AT1-R-*Knockout*-Mäuse (AT1-R-KO-Mäuse) nach Infarkt eine weniger stark ausgeprägte linksventrikuläre Ausdehnung und Dysfunktion sowie Fibrose aufwiesen als WT-Mäuse. Allerdings geht dieser Effekt mit einer Reduktion der Gefäßneubildung im Infarktgebiet einher (Harada

et al., 1999; Toko et al., 2004). Inzwischen wird zudem davon ausgegangen, dass durch AT1-R-Blockade mit AT1-R-Antagonisten die Funktion nach Myokardinfarkt verbessert und das ventrikuläre *Remodeling* reduziert werden kann (Ichiki, 2004). Allerdings wird in diesem Zusammenhang auch über eine Zunahme der Myokardinfarkt-Inzidenz in kardiovaskulären Hochrisikopatienten, welche mit AT1-R-Antagonisten behandelt wurden, spekuliert (Strauss und Hall, 2006). Diese Risikozunahme könnte über anti-angiogenetische Effekte von AT1-R-Antagonisten vermittelt werden (Strauss and Hall, 2006). So weiß man, dass Ang II über den AT1-R Hypoxie-induziertes Gefäßwachstum und mikrovaskuläre Angiogenese *in vivo* sowie Angiogenese-Vorgänge *in vitro* stimulieren kann (Bell et al., 1990; Munzenmaier und Green, 1996; Sasaki et al., 2002; Mehta et al., 2007; Rakusan et al., 2007). Anti-angiogenetische Effekte von AT1-R-Antagonisten könnten somit die Sicherheit dieser Substanzen in der anti-hypertensiven Langzeittherapie kardiovaskulärer Hochrisikopatienten beeinträchtigen (Strauss und Hall, 2006).

### **1.6.2. Der Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 2**

Das kardiovaskuläre *Remodeling* nach Myokardinfarkt betreffend werden dem AT2-R hauptsächlich AT1-R antagonistische Effekte zugeschrieben, allerdings sind in diesem Zusammenhang die Eigenschaften des AT2-R noch nicht abschließend geklärt und werden zum Teil kontrovers diskutiert. So wurde von anti-hypertrophen, anti-fibrotischen, anti-inflammatorischen, pro-apoptischen und anti-angiogenetischen und somit AT1-R-entgegengesetzten Einflüssen des AT2-R am Herzen berichtet (Yamada et al., 1998; Wu et al., 2001). Allerdings gibt es Hinweise, dass sich beide Rezeptoren in ihren Effekten nicht nur antagonisieren, sondern auch verstärken können (Lévy, 2004). So wurde beispielsweise über einen AT2-R-vermittelten Signaltransduktionsweg berichtet, der kardiomyozytäre Hypertrophie *in vitro* induziert und somit einen dem AT1-R gleichgerichteten Effekt ausübt (Senbonmatsu et al., 2003; D'Amore et al., 2005). Zudem wurde über Fibrose-induzierende Effekte des Rezeptors spekuliert (Brilla et al., 1993; Mifune et al., 2000; Senbonmatsu et al., 2000; Henrion et al., 2001; Ichihara et al., 2002). Im Kontext des Myokardinfarkts unter *in vivo*-Bedingungen scheint der AT2-R kardioprotektive Effekte auszuüben. So berichteten Oishi und Kollegen von einer signifikant stärkeren linksventrikulären Schädigung und höheren Mortalität nach Myokardinfarkt in AT2-R-KO- als in WT-Mäusen (Oishi et al., 2003). Auch Adachi und Kollegen beobachteten eine signifikant niedrigere 7-Tages-

Überlebensrate nach Myokardinfarkt von AT<sub>2</sub>-R-KO- im Vergleich zu WT-Mäusen (Adachi et al., 2003). Zudem wurde erst kürzlich über einen kardioprotektiven Effekt eines neuartigen hochselektiven nicht-peptidergen AT<sub>2</sub>-R-Agonisten, Compound 21, im experimentellen Myokardinfarkt-Modell der Ratte berichtet (Kaschina et al., 2008).

Über den Einfluss des AT<sub>2</sub>-R auf das kardiale vaskuläre *Remodeling* (Angiogenese bzw. Arteriogenese) nach Myokardinfarkt ist bis dato allerdings wenig bekannt. *In vivo* ist hauptsächlich von anti-angiogenetischen aber auch von pro-angiogenetischen Effekten des AT<sub>2</sub>-R berichtet worden (Munzenmaier und Green, 1996; Sasaki et al., 2002; Silvestre et al., 2002; Walther et al., 2003). Wir und andere konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass der AT<sub>2</sub>-R *in vitro* wichtige VEGF-induzierte Schritte des Angiogenese-Prozesses, wie z. B. die Migration und Kapillarröhrenbildung von humanen Endothelzellen, sowie essentielle VEGF-induzierte pro-angiogenetische Signaltransduktionswege in Endothelzellen hemmt (Benndorf et al., 2003; Falcon et al., 2005, Kou et al., 2007; Kang et al., 2008). So könnten neben den beschriebenen positiven Auswirkungen des AT<sub>2</sub>-R potentiell hemmende Effekte auf das ischämieinduzierte Gefäßwachstum des Herzens zur Rarefizierung des Gefäßbetts vor allem im Infarkttrandgebiet beitragen und somit den chronischen Verlauf der in der Regel zugrunde liegenden koronaren Herzerkrankung negativ beeinflussen. Die Entschlüsselung der durch den AT<sub>2</sub>-R-vermittelten positiven (vermutlich anti-inflammatorische und anti-proliferative) wie potentiell negativen (z. B. anti-angiogenetische) Effekte könnte zur Identifikation neuer therapeutischer Ansätze in der Behandlung des Myokardinfarkts führen. Vor allem vor dem Hintergrund der Verwendung von AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten in der medikamentösen Therapie des Myokardinfarkts (aufgrund einer relativen Überstimulation von AT<sub>2</sub>-R unter AT<sub>1</sub>-R-Blockade) war ein besseres Verständnis AT<sub>2</sub>-R-vermittelter Effekte auf das kardiale Gefäßwachstum aus unserer Sicht nicht nur von großer wissenschaftlicher, sondern auch klinischer Bedeutung.

### **1.7. Ziele der Arbeit**

Das Hauptziel dieser Arbeit war es daher herauszufinden, wie sich AT<sub>2</sub>-R-Defizienz bzw. AT<sub>2</sub>-R-Stimulation mit dem peptidergen partiellen AT<sub>2</sub>-R-Agonisten CGP-42112A als therapeutisches Prinzip auf das kardiovaskuläre *Remodeling* nach Myokardinfarkt auswirkt. Die Fragestellungen dieses Versuchsvorhabens wurden im experimentellen Myokardinfarkt-Modell der Maus überprüft. Hierbei führten wir vergleichende

Untersuchungen zwischen AT2-R-KO- und WT-Mäusen durch, in denen wir mit Hilfe funktioneller (Echokardiographie, invasive Blutdruckmessung) und histologischer Methoden (Gefäßdichte-Analyse, Analyse inflammatorischer Infiltrate, Analyse kardialer Fibrose) das kardiovaskuläre *Remodeling* nach Myokardinfarkt untersuchten. Des Weiteren führten wir in beiden Genotypen eine Analyse der Frühmortalität nach Myokardinfarkt durch, um den berichteten mortalitätssenkenden Effekt des AT2-R nach Myokardinfarkt zu verifizieren. Zudem untersuchten wir in diesem Zusammenhang den Einfluss einer Therapie mit dem partiellen AT2-R-Agonisten CGP-42112A in WT-Mäusen auf die gleichen Zielparameter, um das therapeutische Potential von AT2-R-Agonisten zur Behandlung des Myokardinfarkts abzuschätzen. Des weiteren wurden die Expressionen des AT1- und des AT2-R sowie des Chemokins MCP-1 und des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  auf mRNA-Ebene mittels *Real-Time-PCR* untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. AT2-Rezeptor-Knockout-Modell**

Der Einfluss des AT2-R auf das ischämieassoziierte *Remodeling* am Herzen wurde untersucht an operativ infarzierten AT2-R-Knockout (AT2-R-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen. Das AT2-R-KO-Mausmodell wurde für 10 Generationen auf den FVB/N-Hintergrund rückgekreuzt (Hein et al., 1995). Als adäquate Kontrollgruppe wurden daher WT-Mäuse des FVB/N-Hintergrundes verwendet. Für die Versuche wurden ausschließlich Männchen verwendet. Alle Tiere wurden vor Einschluss in die Studie nochmals genotypisiert.

### **2.2. Versuchsaufbau**

Der Zeitpunkt der operativen Myokardinfarktinduktion wurde als Tag 0 definiert. Am Tag 7 fanden Echokardiographien und invasive Blutdruckmessungen statt. Im Anschluss erfolgte die Tötung der Tiere mit Herzentnahmen für Genexpressions- und histologische Analysen. Während der 7 Tage wurden die Tiere beobachtet und ihre 7-Tages-Mortalität dokumentiert (Abbildung 1).

Es fanden zwei Versuchsreihen statt. In einer Versuchsreihe wurden AT2-R-KO- mit WT-Mäusen verglichen. In der anderen wurden mit dem AT2-R-Agonisten CGP-42112A stimulierte WT-Mäuse mit WT-Mäusen verglichen, die mit isotoner Kochsalzlösung behandelt wurden. In beiden Versuchsreihen wurde ein Teil der Tiere schein(*Sham*)operiert (Abbildungen 2-3).

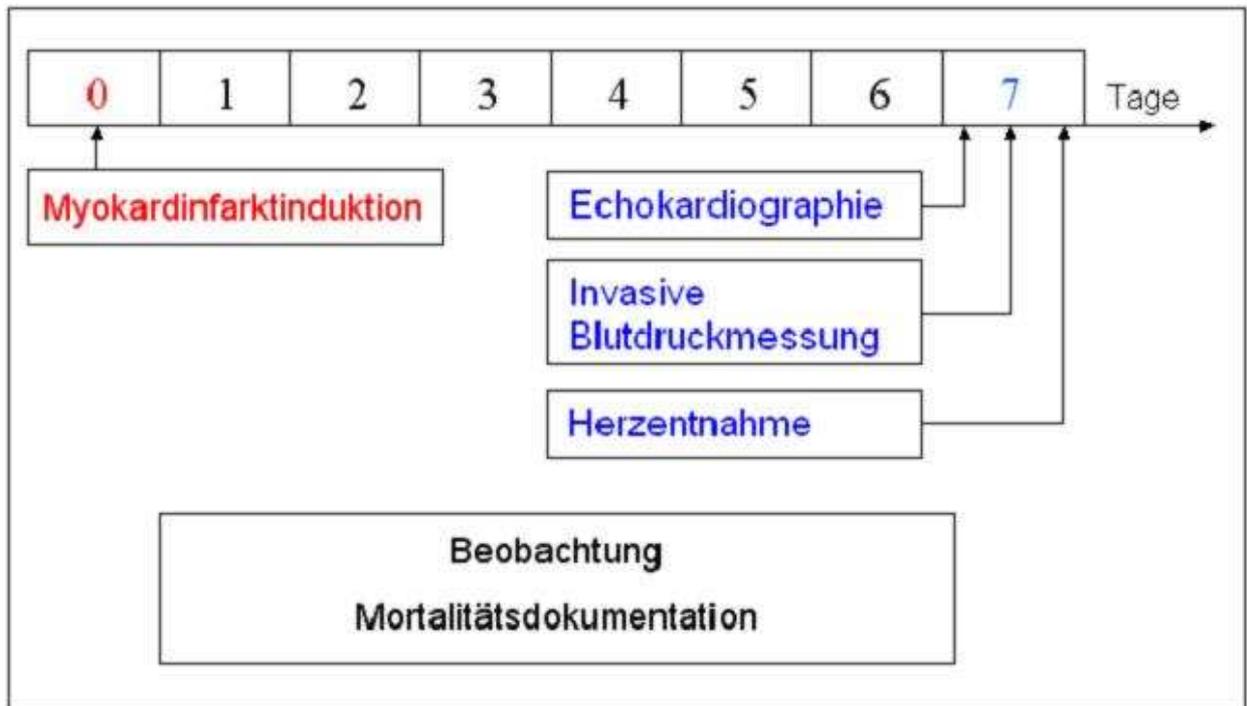


Abbildung 1: Versuchsaufbau

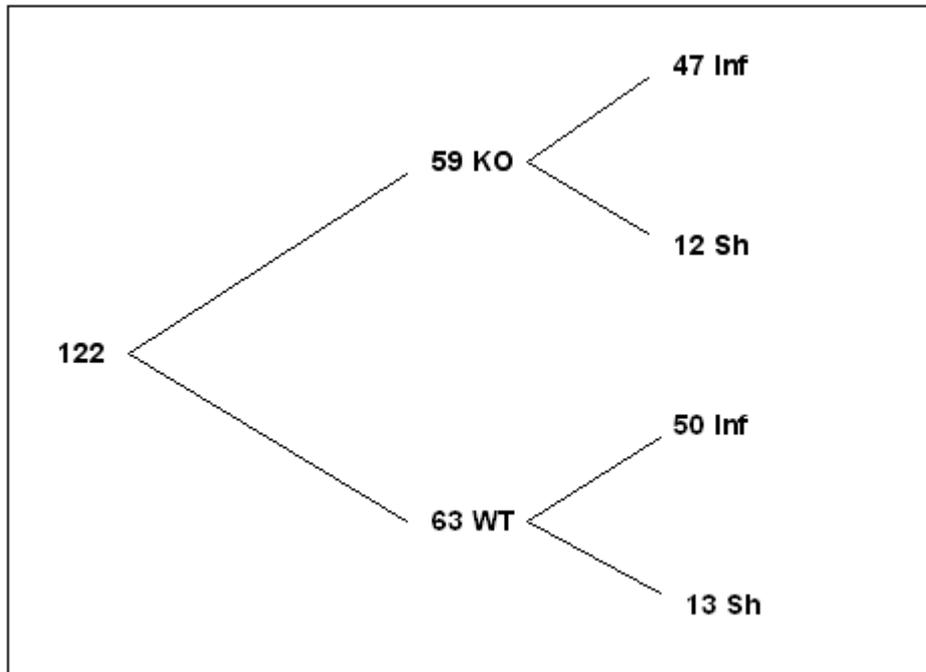
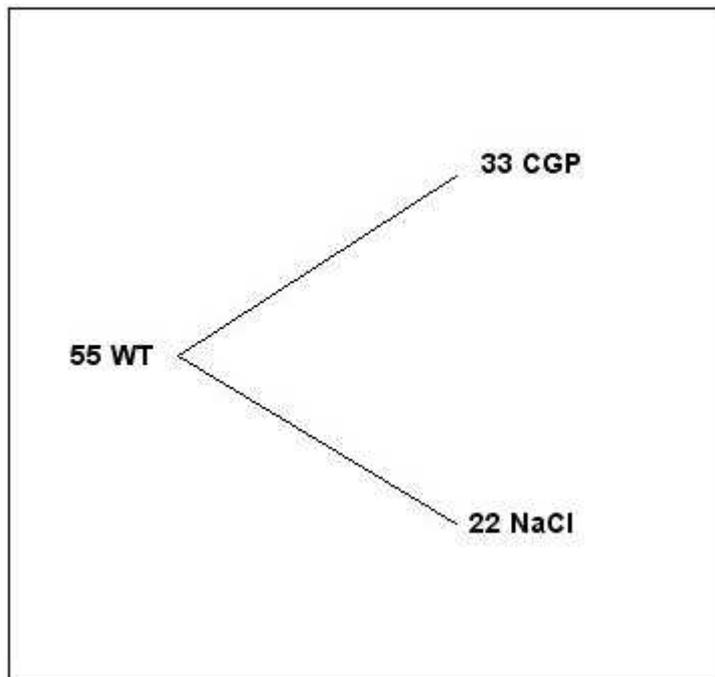


Abbildung 2: Vergleich AT2-R-KO/WT, Ausgangszahl an Mäusen 122, davon 59 KO- und 63 WT- Mäuse. Von den 59 KO-Mäusen wurden 47 infarziert und 12 Sham-operiert. Von den 63 WT-Mäusen wurden 50 infarziert und 13 Sham-operiert.



**Abbildung 3:** Vergleich AT-2-R-Stimulation in WT (CGP-42112A)/Kontrolle in WT (0,9% NaCl), Ausgangszahl an WT-Mäusen 55, davon haben 33 den AT2-R-Agonisten CGP-42112A und 22 isotone Kochsalzlösung über osmotische Minipumpen erhalten.

## **2.3. Operatives Verfahren**

### **2.3.1. Narkose**

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Narkosekammer mit 3-%igem Isofluran. Die Beatmung und Aufrechterhaltung der Narkose während der Operation erfolgte mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch (2 % Isofluran, 0,5 l/min O<sub>2</sub>, 120 mmH<sub>2</sub>O, 140 Atemzüge/min). In Narkose wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere durch eine Wärmeplatte konstant bei 37 °C gehalten.

### **2.3.2. Myokardinfarktinduktion durch permanente Ligatur der LAD (Left Artery Descending)**

Die Induktion des Myokardinfarktes erfolgte nach publizierter Methodik unter Isofluran-Intubationsnarkose (Zolotareva und Kogan, 1978; Michael et al., 1995). Nach Narkoseeinleitung erfolgte die chemikalische Enthaarung des Brust- und Halsbereiches mittels Rasierschaum und anschließender Hautdesinfektion. Nach medianer Schnittsetzung am Hals wurde die Trachea freigelegt und unter Sicht intubiert. Als Tubus diente eine Venenkanüle (27 Gauge). Anschließend wurde ein ca. 8 mm langer, schräger Schnitt vom linken mittleren Rand des Sternums bis zur linken Achselhöhle

ausgeführt. Die thorakalen Muskeln wurden voneinander getrennt und es wurde im Bereich des vierten Interkostalraumes thorakotomiert. Mit Hilfe eines Retraktors wurde die Wunde gespreizt und das Herz zugänglich gemacht. Das Perikard wurde vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Unter mikroskopischer Sicht wurde nun die LAD aufgesucht und mit einem Prolene-Faden der Stärke 8-0 unter Verwendung einer atraumatischen Nadel umschlungen und fest umknotet. Eine erfolgreiche Okklusion mit Induktion des Myokardinfarkts wurde visuell durch regionale Zyanose und Hypokinesie diagnostiziert. Schließlich erfolgte schichtweise der Wundverschluss: Der Thorax wurde mit einem Prolene-Faden der Stärke 8-0 vernäht, die Muskulatur und Bindegewebe wieder zusammengelegt und die Haut verschlossen mit einem Prolene-Faden der Stärke 6-0. *Sham*-operierte Mäuse erfuhren die gleiche Prozedur bis auf Ligatur der LAD. Sie dienten als Kontrollgruppe für die Belastung des Eingriffes an sich.

### **2.3.3. Implantation von osmotischen Minipumpen**

WT-Mäusen aus der zweiten Versuchsreihe wurden osmotische Minipumpen implantiert, wobei eine Gruppe den AT2-R-Agonisten CGP-42112A und die Kontrollgruppe isotone Kochsalzlösung (0,9 %) über die Pumpen erhalten hatte. Durch die Verwendung von osmotischen Minipumpen konnte eine kontinuierliche Verabreichung der Lösungen gewährleistet werden. Die Pumprate des verwendeten Modells betrug 1,0 ml pro Stunde für die Dauer von 7 Tagen. Die Pumpen wurden wie folgt ins Nackenfell der Tiere implantiert: Es wurde ein ca. 1 cm langer Schnitt zwischen den Schulterblättern ausgeführt, die Pumpe in die Fetttaschen mit dem Ausflussskopf vom Einschnitt wegzeigend hineingelegt und die Wunde anschließend mit einem Prolene-Faden der Stärke 8-0 wieder verschlossen. Die Implantation der Pumpen erfolgte unter Narkose. Direkt im Anschluss erfolgte die Myokardinfarktinduktion.

### **2.3.3. Postoperative Prozedur**

Postoperativ wurden die Tiere mit 100-%igem Sauerstoff ventiliert. Nach Erreichen eines normalen Atemmusters wurde extubiert. Die Tiere wurden anschließend in eine temperierte Kammer unter zusätzlicher Sauerstoffbegasung (30-40%) verlegt bis sie vollkommen aus der Narkose aufwachen und ein sich normalisierendes

Bewegungsmuster zeigten (nach ca. 1-2 Stunden). Die anschließende Haltung erfolgte stressfrei in Einzelkäfigen.

#### **2.3.4. Analgesie**

Die Tiere wurden vor Narkoseausleitung mit Buprenorphin (0,1 mg/ kgKG subcutan) und Carprofen (5 mg/ kgKG subcutan) analgisiert. An den ersten beiden postoperativen Tagen erhielten die Tiere nochmals Carprofen (5 mg/ kgKG subcutan, 1x täglich).

#### **2.4. Echokardiographie**

Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem *Core-Center* „Kleintierechokardiographie“ des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie durchgeführt.

Am Tag 7 nach Infarktinduktion wurde bei den Versuchstieren die Ventrikelfunktion per transthorakaler Echokardiographie (Sonos Agilent 5500, 15 MHz Linearschallkopf) bestimmt. Die Untersuchung erfolgte in volatiler Isoflurannarkose (3,5 % zur Einleitung und 2,5 % zum Erhalt) unter Herzfrequenzkontrolle. In M-Mode- und 2-Dimensionaler Echokardiographie wurden auf der kurzen Herzachse die Dicken der Vorder- und Hinterwände während der Diastole und Systole, innerer Durchmesser der linken Ventrikel, sowie endsystolische und enddiastolische linksventrikuläre Ausmaße bestimmt. Für jeden Datenpunkt wurden Werte von drei unterschiedlichen Herzzyklen gemittelt. Zur Beurteilung der linksventrikulären Funktion wurde als Parameter das *Fractional Shortening* (FS) wie folgt bestimmt:

$$\%FS = ((LVEDD - LVESD) / LVEDD) \times 100$$

(LVEDD: linksventrikuläre enddiastolische Fläche

LVESD: linksventrikuläre endsystolische Fläche)

#### **2.5. Invasive Blutdruckmessung**

Bei den AT-2-R-KO- und WT-Mäusen wurden *in vivo* systolische und diastolische Blutdrücke gemessen. Die invasive Blutdruckmessung fand unter Narkose der

Versuchstiere statt. Die Narkoseeinleitung und -aufrechterhaltung mit Intubation und Ventilation wurde durchgeführt wie unter 2.3.2. *Myokardinfarktinduktion durch permanente Ligatur der LAD* bereits beschrieben. Für die Messung fand ein Druck-Volumen-Herzkatheter (1,4 Fr, Millar Instruments, Houston Texas, USA) Verwendung. Die Haut am Hals wurde eröffnet und die rechte A. carotis unter den Speicheldrüsen und der Muskulatur freipräpariert. Die A. carotis wurde zur Vermeidung von Blutungen während der Prozedur mit einem Prolene-Faden der Stärke 6-0 kranial abgeschnürt und ca. 1 cm weiter kaudal mit einer Klemme abgeklemmt. Die Blutzufuhr des Kopfes wurde durch die linke A. carotis gewährleistet. Nach minimaler Schnittsetzung im abgeschnürten Abschnitt konnte der Katheter über die Öffnung in die A. carotis eingeführt werden. Die Klemme konnte nun gelöst werden und der Katheter weiter bis in die Aorta vorgeschoben werden. Hier fanden die Aufzeichnungen der Druck-Volumen-Kurven statt.

## **2.6. Tötung der Tiere und Organentnahme**

Die Tötung der Tiere erfolgte am Tag 7 nach Infarktinduktion unter Narkose direkt im Anschluss an die invasive Blutdruckmessung. Die Maus wurde über die Aorta abdominalis entblutet, wobei das Blut in mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) versehenen Mikrogefäße aufgenommen und nachfolgend weiterverarbeitet wurde (Gewinnung von Plasma). Die Lunge und Leber wurden entnommen und gewogen, um Aussagen über das Ausmaß der Stauungen bei Herzversagen treffen zu können. Die Herzen wurden entnommen, in 1x *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) gespült und nach Abtrennung der Vorhöfe gewogen. Jedes Herz wurde durch das makroskopisch erkennbare Infarktgebiet hindurch halbiert, sodass ein Teil des Herzens für histologische, das andere für Genexpressionsanalysen zur Verfügung stand. Das für die Genexpressionsanalysen zu verwendende Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

## **2.7. Histologie**

### **2.7.1. Herstellung von Paraffinschnitten**

Das histologisch zu verwendende Gewebe wurde in 4 % Paraformaldehyd 24 Stunden lang fixiert und anschließend mit Leitungswasser gewaschen. Danach wurde das

Gewebe nach folgendem Protokoll in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in 60 °C heißes Paraffin gegossen und eingebettet (Tabelle 1). Am Microtom (Leica, RM2125RT) wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger (Assistent 72 Super Frost/Plus Objektträger) aufgezogen. Von jedem Herzen wurden ca. 30 Objektträger mit jeweils 4 bis 7 Gewebeschnitten pro Objektträger angefertigt. Vor den folgenden Färbeschritten wurden die Schnitte über Nacht bei 37,5 °C „gebacken“, um besseres Haften des Gewebes auf dem Träger zu erreichen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert und rehydriert (Tabelle 2).

70 % Isopropanol	2 Stunden
80 % Isopropanol	2 Stunden
96 % Isopropanol I	2 Stunden
96 % Isopropanol II	2 Stunden
100 % Isopropanol I	2 Stunden
100 % Isopropanol II	über Nacht
100 % Isopropanol III, 60°C	1 Stunde
Paraffin/Isopropanol 1:1, 60°C	1 Stunde
Paraffin I, 60°C	2 Stunden
Paraffin II, 60°C	2 Stunden
Paraffin III, 60°C	2 Stunden
Ausgießen mit Paraffin	

**Tabelle 1:** Entwässerung und Paraffineinbettung des Gewebes

Xylol I	15 Minuten
Xylol II	15 Minuten
100 % Ethanol I	5 Minuten
100 % Ethanol II	5 Minuten
96 % Ethanol I	5 Minuten
96 % Ethanol II	5 Minuten
80 % Ethanol	5 Minuten
70 % Ethanol	5 Minuten
Aqua bidest	5 Minuten

**Tabelle 2:** Rehydrierung der Paraffinschnitte

### 2.7.2. Sirius-Rot-Färbung

Die Infarktnarbe wurde mittels Sirius-Rot, welches Kollagenfasern rot färbt, dargestellt. Die Lokalisation des Infarkts wurde bestimmt, indem stichprobenartig jeweils ein Objektträger mit oberflächlichen, mittleren und tiefen Paraffinschnitten jedes Herzens zur Sirius-Rot-Färbung verwendet wurde. Zudem wurden Bilder angefertigt, um den Fibrosegrad und das Infarktausmaß bestimmen zu können. Die Schnitte wurden nach der o.g. Rehydrierung mit 1x PBS gespült. Anschließend wurde 60 Minuten in Sirius Rot gefärbt und danach zwei Mal in gesäuertem Wasser (5 ml Eisessig 100 % Merck in 1 L Aqua bidest) gewaschen. Die Schnitte wurden wie folgt wieder entwässert und schließlich entwacht (Tabelle 3). Als letztes wurden die Schnitte mit Roti Histokitt II (Roth, Karlsruhe) eingedeckelt.

96 % Ethanol I	5 Minuten
96 % Ethanol II	5 Minuten
100 % Ethanol I	5 Minuten
100 % Ethanol II	5 Minuten
Xylol	5 Minuten

**Tabelle 3:** Entwässerung und Entwachsung der Paraffinschnitte

### 2.7.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Paraffinschnitte boten einen guten Überblick über die Morphologie des Gewebes in Infarkt- und Nicht-Infarktbereichen. Hämatoxylin färbt die basophilen Zellkerne blau und Eosin färbt die azido- oder eosinophilen zytoplasmatischen Proteine rot. Orientierend an den zuvor durchgeführten Sirius-Rot-Färbungen wurden von jedem Herzen ein Infarktregion und Nicht-Infarktregion enthaltendes Schnittpräparat gewählt. Die Schnitte wurden nach der o.g. Rehydrierung 20 Minuten in Hämalanlösung nach Mayer (Roth, Karlsruhe) gefärbt, 10 Minuten in Leitungswasser gebläut, 10 Minuten in Eosinlösung gefärbt und schließlich nach o.g. Entwässerung mit Roti Histokitt II (Roth, Karlsruhe) eingedeckelt.

#### **2.7.4. Immunhistochemie**

Für die immunhistochemischen Nachweise wurde zwei verschiedene Avidin-Biotin-Methoden an Paraffinschnitten nach Guesdon und Kollegen und Hsu und Kollegen angewandt: die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) und die LAB-Methode (*Labeled avidin/streptavidin*). Beide Methoden nutzen die Affinität des Glykoproteins Avidin bzw. Streptavidin für Biotin aus. Das Avidin/Streptavidin ist seinerseits an ein Enzym gekoppelt, welches nach Zugabe eines chromogenen Substrats zu einem Farbumschlag führt. Häufig verwendete Enzyme sind Meerrettich-Peroxidase nach der ABC-Methode und Alkalische-Phosphatase nach der LAB-Methode. Bei der ABC-Methode wird ein biotinylierter Sekundärantikörper durch einen Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex markiert und der Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion schließlich durch das Chromogen 3,3 Diaminobenzidin (DAB) schwarz dargestellt. Verwendet wurde die ABC-Methode in dieser Arbeit zur Darstellung von Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen. Bei der LAB-Methode koppelt ein biotinylierter Sekundärantikörper an Alkalische-Phosphatase-gekoppeltes Avidin/Streptavidin, welches im Unterschied zum ABC kein präformierter Avidin-Biotin-Komplex ist. Mit dem Chromogen Neufuchsin liefert die alkalische Phosphatase ein rotes Reaktionsprodukt. Die LAB-Methode fand Verwendung zum Nachweis von muskularisierten Gefäßen, T-Lymphozyten und des AT2-R. Sich an den zuvor durchgeführten Sirius-Rot-Färbungen orientierend wurden für die Immunhistochemie Schnittpräparate gewählt, die sicher Gewebe mit Infarktregion und Nicht-Infarktregion enthielten. Zur Negativkontrolle wurde die Applikation des Primärantikörpers ausgelassen.

##### **2.7.4.1. Visualisierung des AT2-R mittels Immunhistochemie**

Der AT-2-R wurde immunhistochemisch nach der LAB-Methode an Paraffinschnitten wie folgt farblich nachgewiesen: Die Schnitte wurden nach der o.g. Rehydrierung 3 Mal für je 5 Minuten in 1x PBS gespült. Um die Zugänglichkeit des Antigens zu verbessern, wurde anschließend folgendes *Antigen-Retrieval* durchgeführt: EDTA-Puffer wurde bei 600 Watt in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und die Objektträger in dem Puffer 10 Mal für je 2 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Objektträger im Citratpuffer 10 Minuten auf Eiswasser abgekühlt und dreimal für je 5 Minuten in Aqua bidest gespült. Unspezifischer Hintergrund wurde mit einer Block-Lösung (1:20 Ziegen Serum in 1x PBS) geblockt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer wurden die Objektträger vorsichtig abgetupft und der Primärantikörper

AT2-Rezeptor-Antikörper in einer Konzentration von 1:100 in der Blocklösung aufgetragen. Mit diesem wurden die Schnitte über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen für je 5 Minuten mit 1x PBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper *Goat-polyclonal Anti-Rabbit-IgG* in einer Konzentration von 1:200 aufgetragen und die Schnitte 30 Minuten lang inkubiert. Nach dreimaligem Spülen für je 5 Minuten mit 1x PBS wurde die Streptavidin-Alkalische-Phosphatase in einer Konzentration von 1:100 in 1x PBS aufgetragen. Mit diesem wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 Mal für je 5 Minuten in 1x PBS gespült. Dann erfolgte in Raumtemperatur und im Dunkeln für 15 Minuten die Farbentwicklung mit Neufuchsin. Anschließend wurde 2 mal für 5 Minuten in Aqua bidest gespült und mit Mowiol eingedeckelt.

#### **2.7.4.2. Endothelzellfärbung mittels eines CD31-Antikörpers**

Endothelzellen kleiden als innerste Schicht Gefäße aus und sind neben der Basallamina Hauptbestandteil von Kapillaren. Endothelzellen exprimieren als Antigen das *Cluster-of-differentiation-Molekül* CD31 oder auch PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*; Newman, 1997). Dieses wurde immunhistochemisch nach der ABC-Methode an Paraffinschnitten wie folgt farblich markiert und Endothelzellen somit dargestellt: Die Schnitte wurden nach der o.g. Rehydrierung zwecks Hemmung endogener Peroxidaseaktivitäten in 3-%igem methanolischen Wasserstoffperoxid 20 Minuten lang in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein *Antigen-Retrieval* mit Proteinase K, um die Zugänglichkeit des Antigens zu verbessern. Hierzu sind 75 ml 1x PBS im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und 45 µl Proteinase K hinzugegeben worden. Hierin wurden die Schnitte 15 Minuten lang inkubiert. Nach Abspülen mit kaltem Leitungswasser und Nachspülen mit Aqua bidest wurde unspezifischer Hintergrund mit einer Block-Lösung (1:10 Kaninchenserum in 1x PBS) geblockt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer, wurden die Objektträger vorsichtig abgetupft und der Primärantikörper *Rat-Anti-Mouse-CD31* (Klon MEC13.3) in einer Konzentration von 1:200 in 1x PBS aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach dreimaligem Spülen für je 5 Minuten mit 1x PBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper *Rabbit-Anti-Rat-IgG* in einer Konzentration von 1:200 in 1x PBS aufgetragen. Mit diesem

wurden die Schnitte 30 Minuten lang in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zur Entfernung ungebundener Antikörper jeweils 2 Mal 5 Minuten lang mit 0,1-%igem Tween 20 gespült. 5-minütiges Spülen mit 1x PBS entfernte das Tween 20. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Anschließend wurde wieder 5 Minuten lang in 1x PBS gespült und weitere 2 Male 5 Minuten lang in PB-Lösung pH 7,4. Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten lang in der DAB-Entwicklungslösung inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Spülen mit Aqua bidest gestoppt. Nach dreimaligem Spülen für je 5 Minuten in 1x PBS wurde nach o.g. Entwässerung entwacht und mit Roti Histokitt II (Roth, Karlsruhe) eingedeckelt.

#### **2.7.4.3. Färbung glatter Gefäßmuskelzellen mittels eines $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin-Antikörpers**

*$\alpha$ -smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) stellt eine in glatten Muskelzellen exprimierte Aktin-Isoform dar, die in der Media, der mittleren Schicht von größeren, muskularisierten Gefäßen (Arterien und Arteriolen) vorherrschend ist (Skalli et al., 1986). Dieses wurde immunhistochemisch nach der LAB-Methode an Paraffinschnitten wie folgt farblich markiert und glatte Gefäßmuskelzellen somit dargestellt: Die Schnitte wurden nach o.g. Rehydrierung 3 Mal für 5 Minuten in 1x PBS gespült. Unspezifischer Hintergrund wurde mit einer Block-Lösung (1:20 Ziegenserum in 1x PBS) geblockt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer, wurden die Objektträger vorsichtig abgetupft und der biotinylierte Primärantikörper *Mouse-Anti-alpha-SMA* in einer Konzentration von 1:50 in der Blocklösung aufgetragen. Mit diesem wurden die Schnitte über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen für je 5 Minuten mit 1x PBS wurde anschließend das Streptavidin-Alkaline-Phosphatase in einer Konzentration von 1:100 in 1x PBS aufgetragen. Die Farbentwicklung mit Neufuchsin und Eindeckelung erfolgte gleich der immunhistochemischen Färbung des AT2-R (2.7.4.1.).

#### **2.7.4.4. Färbung von Monozyten- und Makrophagen mittels eines Mac-2-Antikörpers**

Nach Infarkt kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion zur Infiltration von Entzündungszellen in die Infarktregion, u. a. Monozyten und Makrophagen, welche

das Oberflächenantigen Mac-2 exprimieren (Ho und Springer, 1982). Dieses wurde immunhistochemisch nach der ABC-Methode an Paraffinschnitten farblich markiert und somit Monozyten und Makrophagen dargestellt:

Verwendung fand das gleiche Protokoll wie bei der CD31-Färbung (2.7.4.2). Als Primärantikörper wurde der *Rat-Anti-Mouse-Mac-2*-Antikörper in einer Konzentration von 1:200 in 1x PBS verwendet.

#### **2.7.4.5. T-Zellfärbung mittels eines CD3-Antikörpers**

In der mit einem Infarkt einhergehenden Entzündungsreaktion ist neben der zuvor beschriebenen Monozyten- und Makrophagen- auch eine T-Lymphozyteninfiltration maßgeblich. T-Lymphozyten tragen als Oberflächenantigen das *Cluster-of-differentiation-Molekül-3* (CD3; Abbas und Lichtmann, 2003), welches immunhistochemisch nach der LAB-Methode an Paraffinschnitten wie folgt markiert und T-Lymphozyten somit dargestellt wurden: Verwendung fand das gleiche Protokoll wie bei der AT-2-R-Färbung (2.7.4.1) bis auf das *Antigen-Retrieval*, welches hier mit Citratpuffer (pH 6,0) und einer Kochzeit von 5 Mal 2 Minuten bei 680 Watt in der Mikrowelle durchgeführt wurde. Als Primärantikörper wurde der *Rabbit-anti-human-CD3* in einer Konzentration von 1:2000 in der Blocklösung verwendet.

### **2.8. Morphometrie nach histologischer Färbung**

Die Betrachtung der Schnitte und die Aufnahme von Farbbildern erfolgte unter einem Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss) mit Kamera (AxioCam, Zeiss) bei 20xer Vergrößerung. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines automatischen Messprogrammes (Axiovision Software der Firma Carl Zeiss, Leipzig) durch Auszählung markierter Regionen und Bezug der Anzahl auf die Messrahmenfläche. Aus den Einzelergebnissen jedes Tieres wurden gruppenspezifisch Endwerte gemittelt, die miteinander verglichen werden konnten.

#### **2.8.1. Analyse kardialer Fibrose**

Fibrose wurde in der Infarkt- und Nicht-Infarktregion jedes Herzens nach publizierter Methodik anhand Sirius-Rot gefärbten Präparaten im zirkular polarisierten Licht analysiert (Whittaker P et al., 1994). Von jedem Herzen wurden je eine Aufnahme im

Infarkt- und im Nicht-Infarktgebiet eines Sirius-rot gefärbten Präparates angefertigt. Die Aufnahme von Farbbildern erfolgte im zirkular-polarisierten Licht. Dieses regt Kollagenfasern nach Sirius-Rot an und lässt sie rötlich schimmern. Mit Hilfe des Messprogrammes (*Axiovision Software*) wurden Einzelflächen der Kollagenfasern berechnet und ihr dazugehöriger Rotwert bestimmt. Als Maß für die Fibrosierung im Infarktbereich wurde ein Produkt aus den Einzelflächen und der Intensität ihres Rotwerts festgelegt. Im Nicht-Infarktbereich wurde als Parameter für die fibrotische Umwandlung des Myokards aus den Einzelflächen die Gesamtflächensummen berechnet und auf die Messrahmenfläche bezogen.

### **2.8.2. Dichtebestimmung CD31-positiver Blutgefäße**

Die Dichten CD31-positiver Blutgefäße wurden in der Infarktregion und in der Nicht-Infarktregion des Herzens der Versuchstiere bestimmt. Von jedem Herzen wurden 6 CD31-markierte Gewebeschnitte betrachtet, deren Abstand zueinander mindestens 20 µm betrug. Pro Herz wurden 12 Aufnahmen angefertigt, verteilt auf 6 Aufnahmen pro Objektträger und davon jeweils 3 in der Infarktregion und drei in der Nicht-Infarktregion. Mit Hilfe des Messprogrammes (*Axiovision Software*) wurden in den schwarz-weiß-konvertierten Bildern die CD31-positiven Regionen ausgezählt und die Anzahl der Gefäße auf die Messrahmenfläche bezogen.

### **2.8.3. Dichtebestimmung $\alpha$ -SMA-positiver Blutgefäße**

Die Dichten  $\alpha$ -SMA-positiver Blutgefäße wurden in der Infarktregion und in der Nicht-Infarktregion jedes Herzens bestimmt. Von jedem Herzen wurden 6  $\alpha$ -SMA -markierte Gewebeschnitte betrachtet, deren Abstand zueinander mindestens 20 µm betrug. Pro Herz wurden 12 Aufnahmen angefertigt, verteilt auf 6 Aufnahmen pro Objektträger und davon jeweils 3 in der Infarktregion und 3 in der Nicht-Infarktregion. Mit Hilfe des Messprogrammes (*Axiovision Software*) wurden wie zuvor beschrieben in den schwarz-weiß-konvertierten Bildern die  $\alpha$ -SMA-positiven Regionen ausgezählt und die Anzahl der Gefäße auf die Messrahmenfläche bezogen.

#### **2.8.4. Analyse der Monozyteninfiltration in die Infarktregion**

Es wurde das Ausmaß der Mac-2-positiven Regionen in der Infarktregion jedes Herzens bestimmt. Von jedem Herzen wurden 6 Mac-2-markierte Gewebeschnitte betrachtet, deren Abstand zueinander mindestens 20 µm betrug. Pro Herz wurden 6 Aufnahmen angefertigt, verteilt auf 3 Aufnahmen pro Objektträger. Betrachtet wurde nur die Infarktregion. Mit Hilfe des Messprogrammes (*Axiovision Software*) wurden in den schwarz-weiß-konvertierten Bildern die Anzahl der Mac-2-positiven Regionen ausgezählt und ihre Flächen berechnet. Aus den Einzelflächen wurde die Gesamtflächensumme berechnet und auf die Messrahmenfläche bezogen.

#### **2.8.5. Analyse der T-Zellinfiltration in die Infarktregion**

Es wurde das Ausmaß der T-Lymphozyteninfiltration in der Infarktregion bestimmt. Von jedem Herzen wurden 6 CD3-markierte Gewebeschnitte betrachtet, deren Abstand zueinander mindestens 20 µm betrug. Pro Herz wurden 6 Aufnahmen angefertigt, verteilt auf 3 Aufnahmen pro Objektträger. Betrachtet wurde nur die Infarktregion. Mit Hilfe des Messprogrammes (*Axiovision Software*) wurden in den Farbbildern die Anzahl der von T-Zellen dargestellten Regionen und ihre Flächen ausgezählt. Aus den Einzelflächen wurde die Gesamtflächensumme berechnet und auf die Messrahmenfläche bezogen.

### **2.9. RNA-Analysen**

#### **2.9.1. Isolation von RNA**

Die Gesamt-RNA wurde aus dem Herzgewebe nach modifiziertem Protokoll des Gewebes mittels RNAzol® isoliert: ca. 50 mg Gewebe wurden nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS in 1,5 ml RNAzol® lysiert und nach Zugabe von 200 µl Chloroform 30 Sekunden gevortext. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 15 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert und die wässrige Phase anschließend in ein neues Eppendorfgefäß abpipettiert. Nach Zugabe von 1 ml gekühltem Isopropanol wurde kurz gevortext und die RNA für 1 Stunde bei -20° C gefällt. Die RNA wurde für 30 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C pelletiert, mit 70-%igem gekühltem Ethanol gewaschen und nach 5-minütiger Trocknung bei RT in 15 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die RNA-Konzentration

photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C.

### **2.9.2. Reverse Transkription**

Die RNA wurde mit der von dem Hersteller vorgegebenen 2x RT-*Master-Mix*-Methode des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Darmstadt) in cDNA umgeschrieben. Der 2x RT-*Master-Mix* auf Eis wie folgt angesetzt: 2 µl 10x RT Buffer, 0,8 µl dNTPs, 2 µl 10x RT *Random Primer*, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 1 µl RNase Inhibitor und 3,2 µl RNase-freies Wasser. Nach Zugabe von 10 µl Gesamt-RNA (ca 1,7 µg) wurde vorsichtig gemischt und erst 10 Minuten bei 25 °C, dann 2 Stunden bei 37 °C und schließlich 5 Sekunden bei 85 °C umgeschrieben. Die weiter zu verwendende cDNA wurde bei –20 °C gelagert. Die Negativkontrolle enthielt keine Reverse Transkriptase.

### **2.9.3. Qualitative RT-PCR**

Für die Expressionsanalyse des AT1- und AT2-Rezeptors wurde umgeschriebene cDNA mittels qualitativer RT-PCR mit unterschiedlichen Primern amplifiziert. Der RT-PCR-Reaktionsansatz für den Nachweis des AT1-Rezeptors enthielt 1 µl cDNA, 0,2 µl des jeweiligen Primers (AT1-for: gcagcacttcactaccaaagggc, rev: caggacaaaagcaggctagggaga; 100 pmol/µl), 1 µl dNTPs (10 mM), 0,2 µl (1 Unit) rekombinante Taq-Polymerase, 2 µl 10x Taq-Puffer mit KCl (100mM Tris-HCl pH8.8, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40) und 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM) in einem Endvolumen von 20 µl. Für den Nachweis des AT2-Rezeptors konnte der gleiche Ansatz mit 0,2 µl des jeweiligen Primers (AT2-for: ctttctaccctgaacatg, rev: aggtcaatgactgctataac; 100 pmol/µl) benutzt werden. Die beiden RT-PCRs liefen unter folgender Behandlung ab: 4 Minuten bei 93 °C, 45 Sekunden bei 94 °C, 45 Sekunden bei 56,5 °C, 45 Sekunden bei 72 °C, was 40 Mal wiederholt wurde ab Schritt 2 (45 sec bei 94 °C), und schließlich 4 Minuten bei 72 °C.

Die amplifizierte cDNA wurde in einem 1,5-%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Gelbilder mittels Chemie Genius2 Bio *Imaging System* (Syngene) elektronisch festgehalten.

#### 2.9.4. Quantitative RT-PCR

Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer (RT)-*real-time* PCR mit einem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) laut Herstellerhandbuch bestimmt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit beruht auf der Verwendung spezifischer TaqMan®-Sonden, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein; FAM) und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher markiert sind. Durch die zusätzlich 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase (AmpliAq Gold®) wird während der Synthese des Gegenstranges die Sonde am 5'-Ende abgebaut, wodurch sich Quencher und Reporter voneinander entfernen und eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden kann. Diese steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts mit jedem PCR-Zyklus an.

Die mRNA-Menge wurde mittels der relativen Standardkurvenmethode bestimmt, wobei die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interner Standard diente. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Ziel-Gene und das Referenz-Gen immer auf einer Platte gemessen. Dafür wurden aus jeder cDNA-Probe das gleiche Volumen in ein Eppendorfgefäß gegeben, kurz gevortext und eine Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32) mit Wasser für jedes zu untersuchende Gen separat erstellt. Jeweils 2 µl der mit Wasser 1:8 verdünnten cDNA-Probe und der Verdünnungsreihe wurde zu dem in der 384-*well* Multiply® PCR-Platte vorgelegten *Master-Mix* dazugegeben. Der *Master-Mix* enthielt 5 µl 2x TaqMan® Universal PCR *Master Mix*, 0,5 µl des entsprechenden TaqMan® *Gene Expression Assays* und 3,5 µl Wasser. Die Amplifizierung der entsprechenden Genabschnitte erfolgte nach folgendem Schema: 10 Minuten bei 95 °C, 15 Sekunden bei 95 °C, 1 Minute bei 60 °C, was 40 Mal wiederholt wurde ab Schritt 2 (15 Sekunden bei 95 °C). Jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung und wurde mit der *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software*, Version 2.1.2 ausgewertet. Die mRNA-Menge der Proben wurde durch Interpolation aus der Standardkurve entnommen und mit dem Internen Standard ins Verhältnis gesetzt.

## **2.10. Statistik**

### **2.10.1. Überlebensanalyse nach Myokardinfarktinduktion**

Alle Analysen wurden mit Hilfe der Statistik-Software (Version 13) der Firma IBM - *Superior Performing Software Systems* durchgeführt. Für eine erste Abschätzung, ob es in den sieben Tagen nach der Operation zu Unterschieden in der Sterblichkeit zwischen den verschiedenen Mauskollektiven gekommen war, wurden Überlebenskurven nach dem Kaplan-Meier-Verfahren für die verschiedenen Untersuchungsgruppen erstellt. Hierzu wurde zunächst die Gesamtzahl aller infarzierter Mäuse einer Behandlungsgruppe / eines Genotyps erfasst. Ausgenommen von der Analyse waren Mäuse, die das perioperative Prozedere nicht überlebten. In den darauffolgenden Tagen wurde die Sterblichkeit der Mäuse mit dem jeweiligen Tag des Absterbens protokolliert. Die gesammelten Sterblichkeitsdaten wurden nachfolgend für die Kaplan-Meier-Analyse verwendet. Dieses Verfahren erlaubt es, die kumulierte Überlebensrate für den Untersuchungszeitraum zu ermitteln und graphisch darzustellen. Ein Vergleich der so für die verschiedenen Gruppen ermittelten Überlebenskurven bzw. Überlebensraten wurde im Anschluss mit dem Log-Rang-Test durchgeführt. Hierbei wird die Wahrscheinlichkeit für die Hypothese bestimmt, dass die Todesfälle in zufälliger Reihenfolge unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auftreten und somit die Überlebenswahrscheinlichkeit der untersuchten Gruppen gleich ist. Mit dem Log-Rang-Test kann somit eine Abweichung der Reihenfolge der beobachteten von den erwarteten Todesfällen mit der Formel  $LR = (B_1 - E_1)^2 / E_1 + (B_2 - E_2)^2 / E_2$  bestimmt werden, wobei  $B_1$  und  $B_2$  die beobachteten Todesfälle in den Gruppen 1 und 2 sowie  $E_1$  und  $E_2$  die erwarteten Todesfälle in den beiden Gruppen darstellen. Als statistisch relevantes Signifikanzniveau wurde ein P-Wert von 0,05 angenommen.

### **2.10.2. T-Test**

Alle Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung hin untersucht und werden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Mit  $n$  wird die Anzahl der Einzelbeobachtung bezeichnet. Der Vergleich der Mittelwerte von stetigen normalverteilten Variablen zweier Gruppen (KO- vs. WT-Mäuse bzw. CGP-42112A- vs. NaCl-behandelte Mäuse) erfolgte mittels studentischem T-Test. Als statistisch relevantes Signifikanzniveau wurde ein P-Wert von 0,05 angenommen.

## 2.11. Material

### 2.11.1. Chemikalien

- 3,3` Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), Sigma
- Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1), 40% Solution, Bio-Rad Laboratories, München
- Ammoniumchlorid, Merck, Darmstadt
- Ammoniumpersulfat (APS), Bio-Rad, München
- Bovines Serum Albumin (BSA), Sigma-Aldrich, Steinheim
- Buprenorphin-Hydrochlorid
- Carprofen (Rimadyl®), Pfizer Pharma, Karlsruhe
- CGP-42112A°, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Direct Red 80, Sigma-Aldrich, Steinheim
- dNTPs, Foster City, USA
- Eisessigsäure 100% Merck, Darmstadt
- Eosin G Certistain®, Merck, Darmstadt
- Ethanol, Merck, Darmstadt
- Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA-) Dinatriumsalz, Merck, Darmstadt
- Fetales Kälberserum (FCS), Invitrogen/Gibco®, Karlsruhe
- Flüssiger Stickstoff (N<sub>2</sub>), Hannover
- Glucoseoxidase, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Glycerol, Merck, Darmstadt
- Glycin, Carl Roth, Karlsruhe
- Häkalaunlösung nach Mayer, Carl Roth, Karlsruhe
- Histofix, Carl Roth, Karlsruhe
- Horse-serum, Gibco, Paisley, UK
- Isofluran, Baxter International Inc, USA
- Isopropanol, Merck, Darmstadt
- Kaliumchlorid (KCl), Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Merck, Darmstadt
- Methanol, Merck, Darmstadt
- Milchpulver, Roth, Karlsruhe
- Mowiol 4-88, Calbiochem, Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid (NaCl) 0,9% isotone Lösung Baxter GmbH

- Natriumchlorid (NaCl), JT Baker, Deventer, NL
- Natriumfluorid (NaF), Sigma-Aldrich, Steinheim
- Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Dihydrat), Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt
- Natriumorthovanadat Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Merck, Darmstadt
- New Fuchsin substrate kit, Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan
- Nickelsulfat (NiSO<sub>4</sub>), Merck, Darmstadt
- PBS (Dulbecco, Instamed, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), Biochrom AG, Berlin
- PCR Master Mix, Applied Biosystems, Carlsbad, USA
- Pikrinsäure, gesättigt, Merck, Darmstadt
- Pikrinsäure, phlegmatisiert, Merck, Darmstadt
- Proteinase K (recombinant, PCR Grade), Roche Diagnostics, Mannheim
- Rabbit-serum, Gibco, Paisley, UK
- Roti Histokitt II, Carl Roth, Karlsruhe
- RNA Kits, Applied Biosystems, Foster City, USA
- RNase Inhibitor, Qiagen
- RNAzol®, WAK-Chemie Medical, Steinbach
- RT *Random* Primer, keine Angaben vom Hersteller
- Salzsäure (HCl), 37%, Merck, Darmstadt
- Sodiumdodecylsulfat 20 % (SDS), Merck, Darmstadt
- Streptavidin- Alkaline Phosphatase, Mabtech, Hamburg
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Carlsbad, USA
- Thimerosal, Sigma Chemical CO, USA
- Tissue freezing medium (Tissue-Tek®), Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
- Tri-Natriumcitrat Dihydrat, Fluka Chemi AG, Buchs, Schweiz
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Wasserstoffchlorid (Tris-HCl), Merck Darmstadt
- Triton X-100, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Trizma®base (tris(hydroxymethyl)aminomethan), Sigma-Aldrich, Steinheim
- Tween 20 (Polyoxyethylen-(20)-Sorbitanmonolaurat), Sigma-Aldrich, Steinheim
- Vectorstain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA
- Veet Rasierschaum, Mannheim

- Wasserstoffperoxid 30%, Merck, Darmstadt
- Xylol, Carl Roth, Karlsruhe
- $\beta$ -D-Glucose, Merck, Darmstadt
- $\beta$ -Glycerolphosphat, Carl Roth, Karlsruhe
- $\beta$ -Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.11.2. Antikörper

- Anti-Mouse IgG (FC specific), FITC conjugate, antibody developed in goat, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
- Biotinylierter mouse monoklonaler anti-SMA, NeoMarkers, USA
- Goat-polyclonal anti-rabbit IgG, conjugated to Biotin, Novus Biologicals Inc., Littleton, CO 80160, USA
- Purified Anti-Mouse Mac-2 monoclonal Antibody CL 8942 A Laboratory Reagent
- Rabbit polyclonal to Angiotensin II Type 2 Receptor (#ab19134), Abcam, Cambridge, UK
- Rat-Anti-Mouse-CD31-Antikörper MEC13.3, BD Biosciences Pharmingen
- Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3, Dako, Glostrup, Denmark

### 2.11.3. Hilfsmittel und Geräte

- *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System*, Applied Biosystems, Carlsbad, USA
- Assistent 72 Super Frost/Plus Objektträger, Sondheim
- Chromatography Paper, Whatman®, Schleicher & Schnell, Dassel
- Cryo Tube™ Vials, Nunc, Roskilde, Denmark
- DAKO Mikrowellencontainer und Einsatz, Glostrup, Dänemark
- Druck-Volumen-Herzkatheter 1,4 Fr, Millar Instruments, Houston Texas, USA
- Einmalfeindosierungsspritze: Omnifix®-F 1 ml. B. Braun Medical AG, Emmenbrücke
- Einmalhandschuhe Latex, Paul Hartmann AG, Heidenheim
- Einmal-Insulin-Kanüle 100 Sterican. B. Barun, Melsungen
- Zentrifuge: eppendorf centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg

- Falcons 15 ml und 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht
- Kamera AxioCam, Zeiss, Leipzig
- Küvetten: Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Hellma
- Magnetrührer, Heidolph, Schwalbach
- Messprogramme Software, Zeiss, Leipzig
- Multiply® PCR-Platte, Sarstedt, Nümbrecht
- Spritze Microliter Syringe, Hamilton, Bonaduz, Switzerland
- Mikroskop: Axioskop 2, Zeiss, Leipzig
- Microsoft Excel 2000, Microsoft, Redmont, Kalifornien, USA
- Microtom, RM2125RT, Leica Microsystems, Wetzlar
- Mikrowelle, Bosch, Gerlingen
- Milli-Q Plus water purification system, Millipore, Schwalbach
- Mini-osmotische Pumpen, Model 2001, Alzet
- Nahtmaterial (Prolene 6-0, Prolene 8-0), Ethicon, Kreis Segeberg
- OP-Besteck, Carl Hammacher GmbH
- Petrischalen, Sarstedt, Nümbrecht
- PH-Meter, Knick, Berlin
- Pipetten, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Eppendorf, Hamburg
- Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht
- Reaktionsgefäße, 1,5 ml, 2ml, Sarstedt, Nümbrecht
- Software Axiovision, Zeiss, Leipzig
- Ultraschallgerät: Sonos Agilent 5500, 15 MHz Linearschallkopf, HP, Agilent, Philips
- Venenkanüle 27 Gauge, Braun

#### **2.11.4. Lösungen**

##### PBS

9,55 g/L in Aqua bidest

##### Sirius-Rot-Lösung

Direct Red 80 0,5 g

gesättigte Pikrinsäure 500ml

phlegmatisierte Pikrinsäure Spatelspitze

Eosinlösung

Eosin G Certistain® 1,0 g, Merck, Darmstadt

Ad 1L Aqua dest mit 1,6 ml Eisessigsäure 100% Merck

3% Wasserstoffperoxid

30% Wasserstoffperoxid 0,3 ml

Methanol 2,7 ml

Block-Lösung CD-31-Färbungen

Kaninchenserum 0,4 ml

1x PBS 3,6 ml

(Verdünnung 1:10)

PB pH 7,4

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,03 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Dihydrat 17,80 g

Ad 1L Aqua dest

Glucoselösung 10 %

β -D-Glucose 0,5 g

Aqua bidest 5 ml

Entwicklungslösung CD-31-Färbungen

PB pH 7,4 150 ml

Ammoniumchlorid 60 mg

DAB (50 mg/ml) 1,5 ml

0,05M Nickelsulfatlösung 3 ml

β-D-Glucoselösung (10 %) 3 ml

Glucoseoxidase (1,2 mg/ml) 500 µl

Block-Lösung α-SMA-Färbungen

Ziegenserum 0,2 ml

1x PBS 3,8 ml

(Verdünnung 1:20)

Citratpuffer pH 6,0

2,941 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat ad 1 L Aqua bidest  
pH-Wert auf 6,0 mit 1,0 M HCl einstellen

0,1M EDTA-Puffer pH 9,0

37,5 g Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA-) Dinatriumsalz in 500 ml Aqua bidest  
100 ml 1M Natriumhydroxid-Lsg  
Ad 1L Aqua bidest  
pH-Wert auf 9,0 mit 1,0 M HCl einstellen

1M Natriumhydroxid-Lsg

4,2 g Natriumhydroxid in 50 ml gekochtem und wieder abgekühltem Aqua bidest  
Ad 100 ml Aqua bidest

0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 8,5

2,42 g Tris-base in 100 ml Aqua bidest  
Einstellung des pH mit HCl auf 8,5

Mowiol

Mowiol 4-88 12 g  
Aqua bidest 30 ml  
0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 8,5 60 ml  
Über Nacht unter Rühren lösen.  
Erhitzen auf 90 °C und 45 Minuten Schütteln.  
Abkühlen lassen auf 50 °C.  
Glycerin 30 g  
unter Rühren hinzugeben.  
Einstellen des pH auf 8,5.

TBS (Stocklösung) 0,5 M = 10x

Tris-Base 161,54 g  
NaCl 240 g  
Ad 2 L Aqua bidest  
pH einstellen 7,2 – 7,4

### Nickelsulfat-Lösung

131,43 mg NiSO<sub>4</sub> x 6H<sub>2</sub>O in 10 ml Aqua bidest

### Lysis-Puffer

Nonidet P-40 10 ml

Triton X-100 10 ml

Tris base 1,2 g

KCl 186 mg

NaCl 8,7 g

Glycerol Phosphat 6,48 g

NaF 2,1 g

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 183,9 g

Protease Inhibitor Cocktail 0,1 %

Aqua ad injectabilia q.s. 1 L

### 2 M Tris pH 8,8

242,2 g Tris base

Ad 1 L Aqua bidest

ph einstellen 8,8

### 0,5 M Tris pH 6,8

Tris 60,57 g

Aqua bidest 600 ml

Einstellen des pH auf 6,8

Ad 1 L Aqua bidest

### Lauf-Puffer 5 x

Tris 15 g

Glycin 72 g

Aqua bidest 800 ml

20 % SDS 25 ml

Ad 1 L Aqua bidest

TBS-T

Tween-20 1 ml

Ad 1 L TBS

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Überlebensanalyse

Die Mortalität der Tiere wurde vom Tag der Myokardinfarktinduktion (Tag 0) bis zum Tag der Herzentnahme dokumentiert (Tag 7). Die 7-Tages-Überlebensrate war in AT2R-KO-Mäusen (n=38; 63,16 %) im Vergleich zu WT-Mäusen (n=44; 50 %) nicht-signifikant höher (Abbildung 4). Die 7-Tages-Überlebensrate war in scheinbehandelten (0,9 % NaCl) WT-Mäusen (n=16; 56,25 %) im Vergleich zu den mit dem AT2-R-Agonisten CGP-42112A behandelten WT-Mäusen (n=26; 34,62 %) signifikant höher (Abbildung 5). Alle *Sham*-operierten Mäuse haben überlebt.

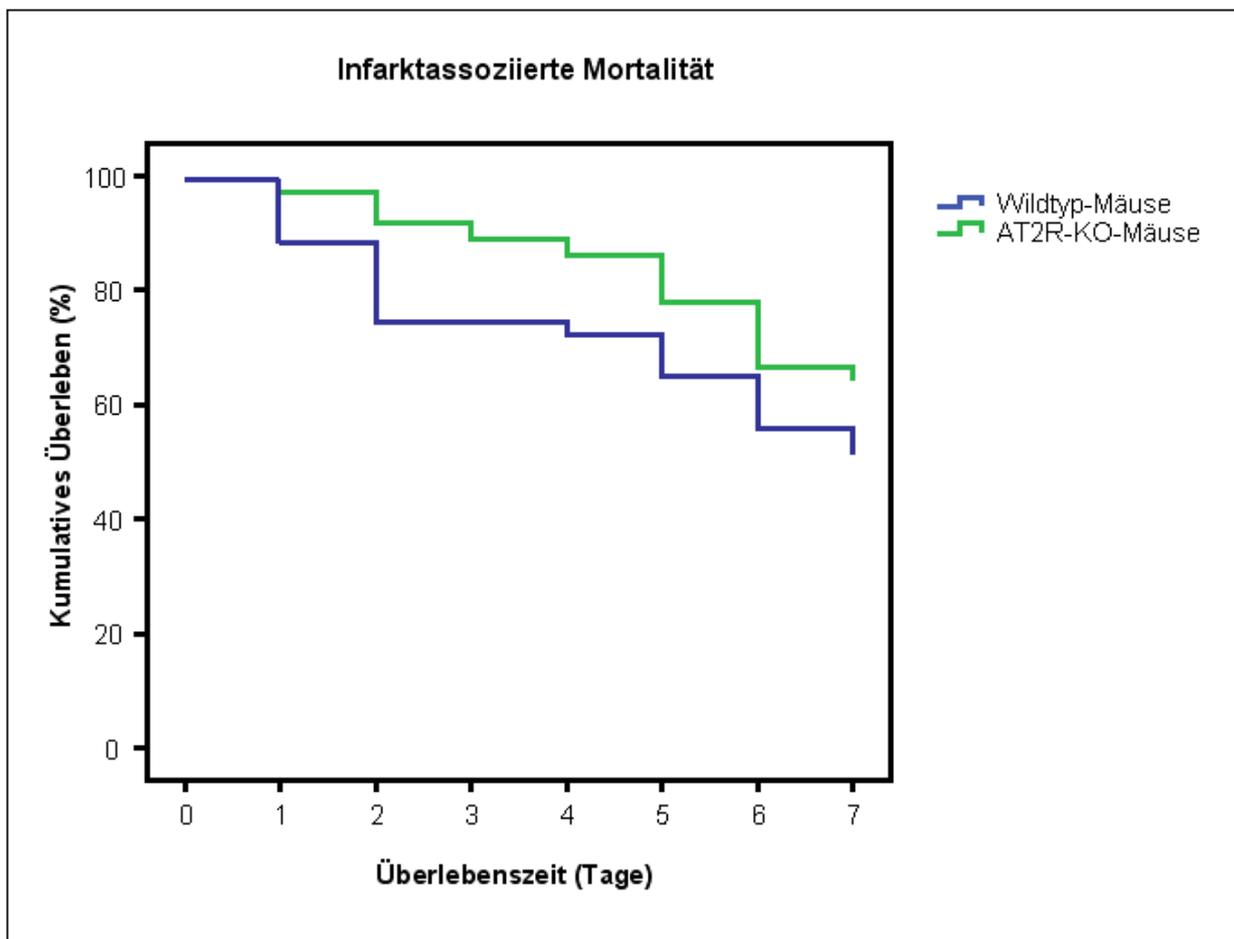
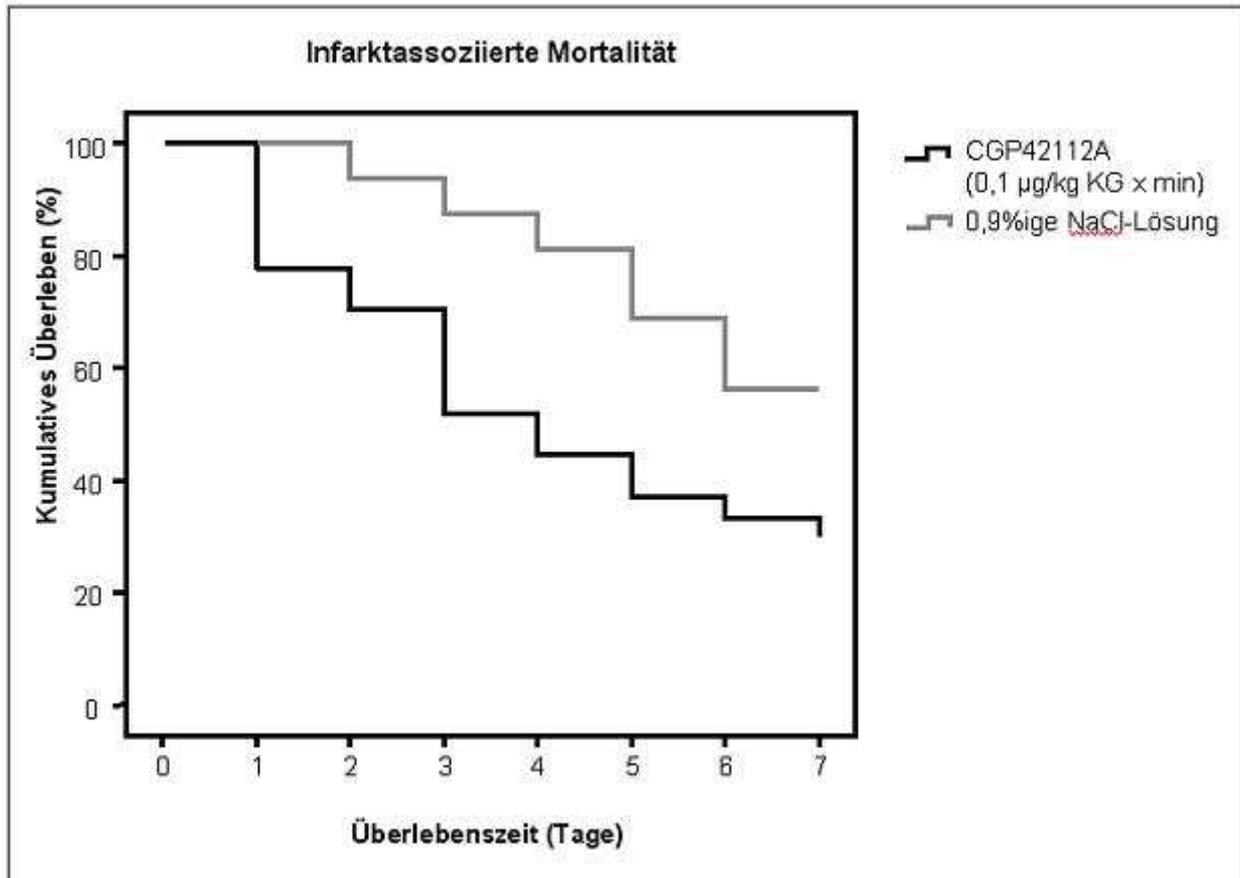


Abbildung 4: Überleben der WT- und AT2R-KO-Mäuse nach Myokardinfarktinduktion, P= 0,16 (Log Rang-Test; n=44/38)



**Abbildung 5:** Überleben der mit 0,9% NaCl und CGP-42112A behandelten WT-Mäuse nach Myokardinfarktinduktion,  $P=0,036$  (Log Rang-Test;  $n=26/16$ )

### 3.2. Echokardiographie

Am Tag 7 fanden die echokardiographischen Untersuchungen statt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und Abbildung zusammengefasst. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen AT2-R-KO-Mäusen ( $17,96 \pm 1,97$  %) und WT-Mäusen ( $18,47 \pm 2,65$  %) bzw. der mit dem AT2-R-Agonisten CGP-42112A behandelten ( $15,86 \pm 16,87$  %) gegenüber der scheinbehandelten WT-Mäuse ( $19,58 \pm 18,54$  %) hinsichtlich der *Fractional Shortening* (FS) beobachtet werden.

Körper-, Herz- und Lebergewichte unterschieden sich nicht-signifikant innerhalb der Vergleichsgruppen (Tabelle 5). Die Lungengewichte der mit CGP-42112A behandelten WT-Mäuse ( $323,8 \pm 95,61$  mg) waren signifikant größer als die der scheinbehandelten WT-Mäuse ( $238,8 \pm 43,24$  mg) (Tabelle 5), was auf ein verstärktes Linksherzversagen in diesen Mäusen hindeutet. Signifikante Differenzen der Lungengewichte zwischen AT2-R-KO- und WT-Mäusen ergaben sich nicht (Tabelle 5).

	0,9% NaCl n=10	CGP-42112A n=9	P	WT n=9	AT2-R-KO n=13	P
<b>Systole</b>						
LV Vorderwand (mm)	1,1 ± 0,12	0,9 ± 0,16	0,27	0,1 ± 0,11	0,1 ± 0,07	0,84
LV Innerer Durchmesser (mm)	3,8 ± 0,18	4,5 ± 0,30	0,05	4,3 ± 0,26	4,2 ± 0,20	0,72
LV Hinterwand (mm)	1,2 ± 0,06	1,2 ± 0,08	0,99	1,1 ± 0,03	1,1 ± 0,05	0,86
Endsystolische Fläche (mm <sup>2</sup> )	13,3 ± 1,1	16,3 ± 1,47	0,12	15,7 ± 1,52	15,7 ± 1,64	0,97
<b>Diastole</b>						
LV Vorderwand (mm)	0,9 ± 0,08	0,7 ± 0,10	0,23	0,7 ± 0,05	0,8 ± 0,04	0,42
LV Innerer Durchmesser (mm)	4,7 ± 0,14	5,3 ± 0,23	0,04	5,3 ± 0,2	5,1 ± 0,17	0,51
LV Hinterwand (mm)	0,9 ± 0,04	0,8 ± 0,04	0,33	0,8 ± 0,03	0,8 ± 0,03	0,50
Enddiastolische Fläche (mm <sup>2</sup> )	20,1 ± 0,86	22,0 ± 1,35	0,24	22,1 ± 1,12	21,7 ± 1,36	0,82
FS (%)	19,6 ± 2,46	15,9 ± 2,33	0,29	18,5 ± 2,65	18,0 ± 1,97	0,87

Tabelle 4: Echokardiographisch auf der kurzen Herzachse bestimmte Parameter. Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM. LV = linker Ventrikel, FS = Fractional Shortening

Gewichte	0.9% NaCl n=9	CGP-42112A n=9	P	WT n=6	AT2-R-KO n=13	P
Körper (g)	40,45 ± 4,6	39,1 ± 3,47	0,48	33,51 ± 2,10	34,85 ± 1,95	0,14
Herz (mg)	167,8 ± 37,34	187,8 ± 24,38	0,20	185,4 ± 25,90	189,85 ± 35,30	0,78
Herz/Körper	4,18 ± 0,8	4,85 ± 0,84	0,10	5,7 ± 0,93	5,46 ± 1,02	0,65
Leber (g)	1,66 ± 0,27	1,86 ± 0,27	0,14	1,84 ± 0,30	1,89 ± 0,43	0,76
Lunge (mg)	241,11 ± 41,06	320 ± 90,14	0,03	265,33 ± 50,52	326,77 ± 102,22	0,19

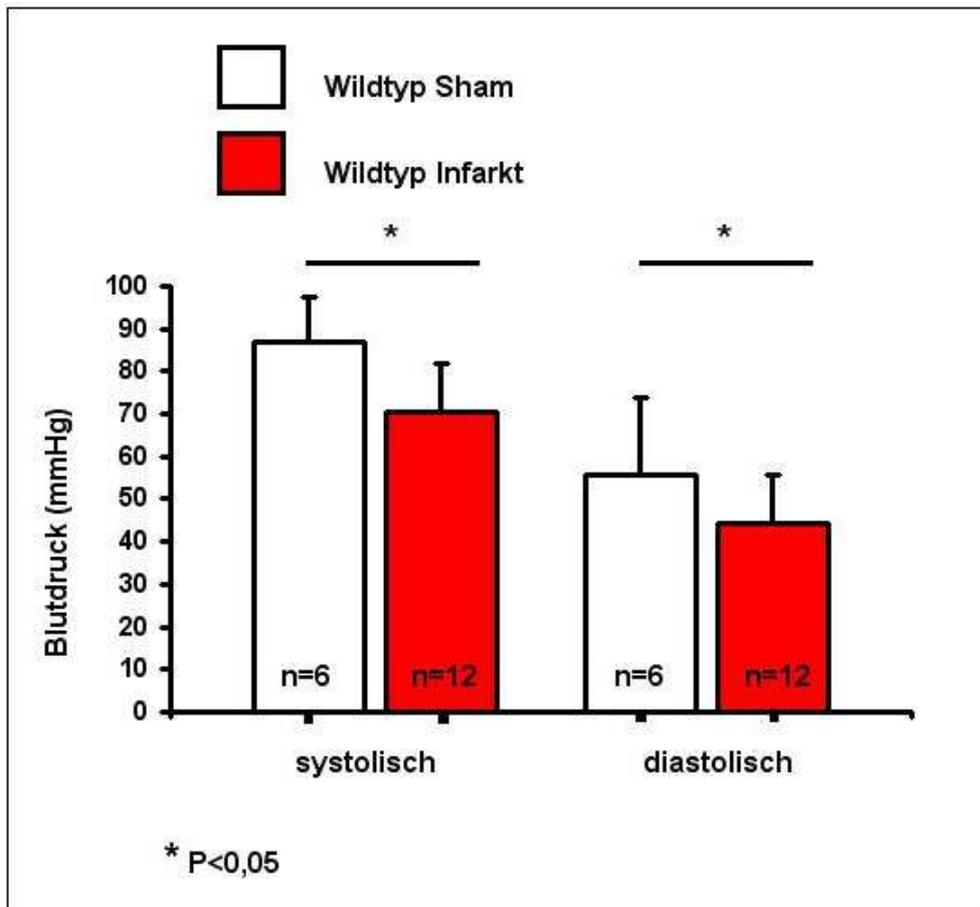
Tabelle 5: Körper- und Organgewichte. Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichungen.

### 3.3. Invasive Blutdruckmessung

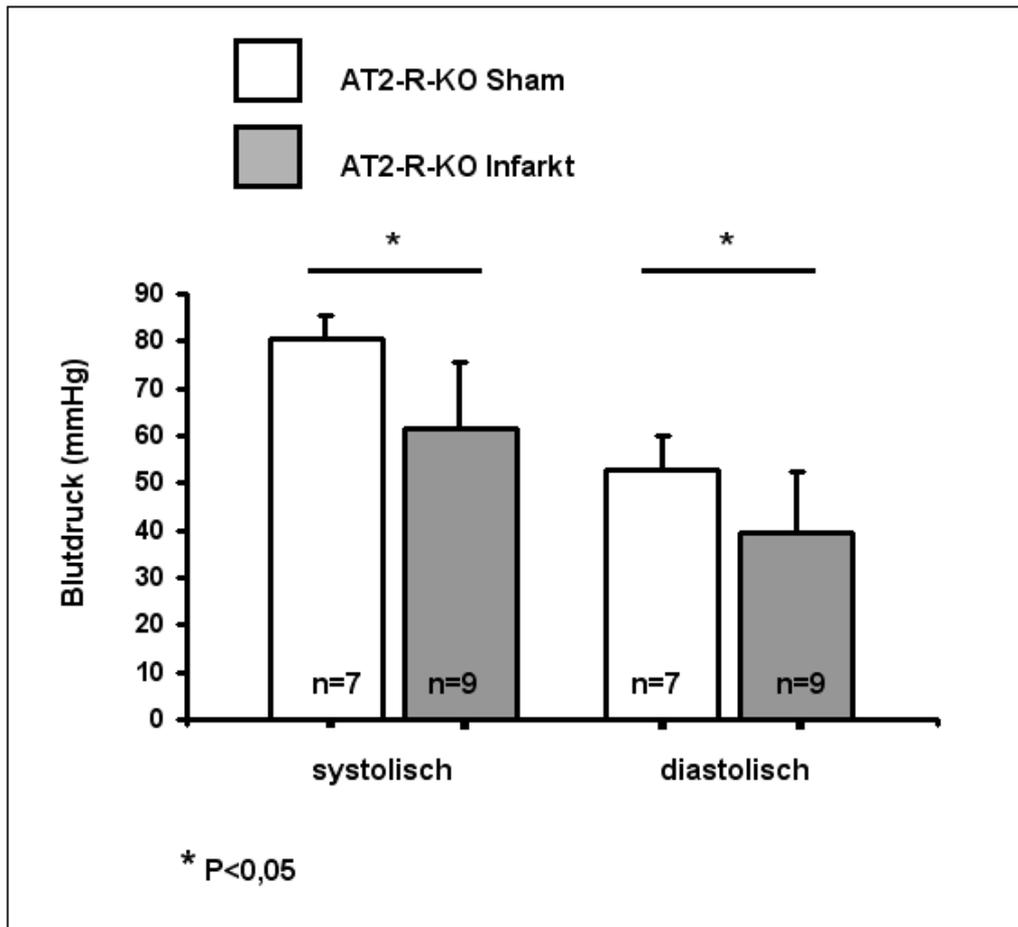
Die systolischen und diastolischen Blutdrücke wurden in den Versuchstieren invasiv am Tag 7 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst. In den Vergleichsgruppen WT- vs. AT2-R-KO, 0,9% NaCl vs. CGP4211A, WT Sham-operiert vs. AT2-R-KO Sham-operiert wurden keine signifikanten Differenzen der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte beobachtet, hingegen hatten Sham-operierte Mäuse einen signifikant höheren Blutdruck als infarzierte Mäuse (Abbildungen 6 und 7).

	CGP-42112A n=7	0.9% NaCl n=10	P
Systole	62,91 ± 7,62	63,34 ± 8,11	0,91
Diastole	34,56 ± 11,55	38,52 ± 10,77	0,48
	WT n=12	AT2-R-KO n=9	P
Systole	70,4 ± 11,38	61,65 ± 13,81	0,13
Diastole	44,25 ± 11,31	39,48 ± 13,02	0,38
	WT Sham n=6	AT2-R-KO Sham n=7	P
Systole	87,04 ± 10,40	80,67 ± 4,74	0,17
Diastole	55,52 ± 18,37	52,81 ± 7,04	0,72

**Tabelle 6:** Invasiv in den Versuchstieren gemessene Blutdruckwerte (mmHg), systolisch und diastolisch. Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichungen.



**Abbildung 6:** Invasiv gemessene, systolische und diastolische Blutdrücke (mmHg) in infarzierten und Sham-operierten WT-Mäusen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichungen.

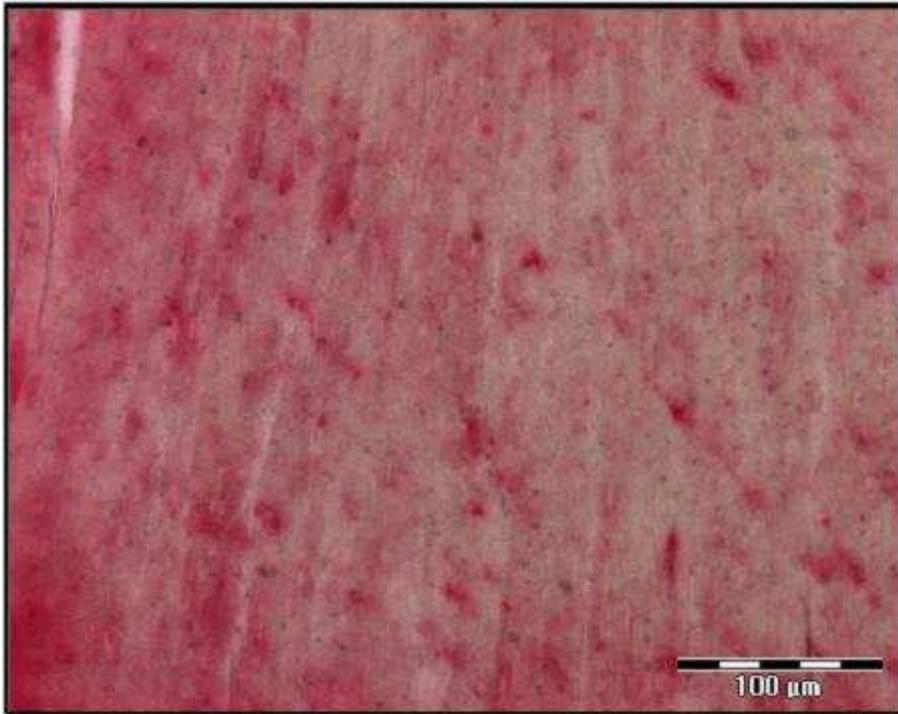


**Abbildung 7:** Invasiv gemessene, systolische und diastolische Blutdrücke (mmHg) in infarzierten und *Sham*-operierten AT2R-Mäusen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen.

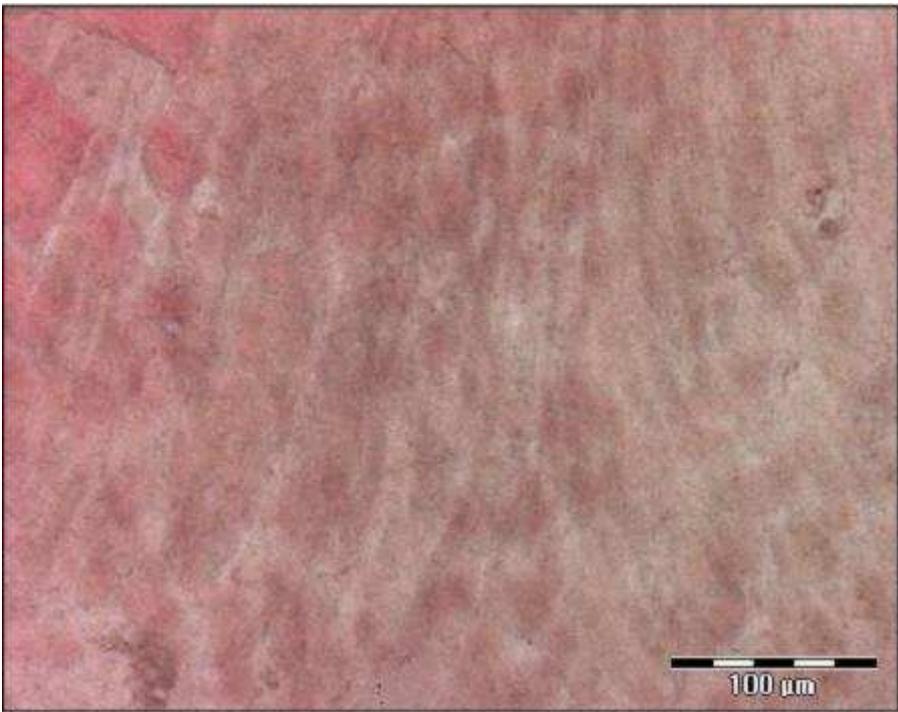
### 3.4. Histologie

#### 3.4.1. Ergebnis der immunhistochemischen Färbung des AT2-R

An WT-Mäusen wurde der AT2-R immunhistochemisch nachgewiesen (Abbildung 8). In AT2-R-KO-Mäusen führte die immunhistochemische Färbung zu keinem positiven Ergebnis (Abbildung 9).



**Abbildung 8:** Repräsentative AT2-R-Färbung in WT (Nicht-Infarktgebiet): AT2-R-positiv



**Abbildung 9:** Repräsentative AT2-R-Färbung in AT2-R-KO (Nicht-Infarktgebiet): AT2-R-negativ

### 3.4.2. Analyse kardialer Fibrose

Das Ausmaß kardialer Fibrose wurde mittels Sirius-Rot-Färbungen bestimmt (siehe auch repräsentative Abbildungen 10 und 11). Mit Hilfe des Messprogrammes *Axiovision* wurden Einzelflächen rot gefärbter Kollagenfasern berechnet und ihr jeweiliger Rotwert bestimmt. Im Nicht-Infarktbereich wurden als Maß für die fibrotische Umwandlung des Myokards aus den Einzelflächen Gesamtflächensummen berechnet und auf die Messrahmenfläche bezogen. Im Infarktbereich wurden die Einzelflächen der Kollagenfasern mit ihrem jeweiligen Rotwert multipliziert. Aus den Einzelprodukten wurde schließlich ein Mittelwert berechnet, der die Fibrosierung des Infarktbereiches darstellte.

In mit CGP-42112A behandelten WT-Mäusen zeigte sich im Nicht-Infarktbereich eine signifikant stärker ausgeprägte Fibrose als in der scheinbehandelten Vergleichsgruppe ( $293,94 \pm 173,09$  % vs.  $100 \pm 66,41$ %) (Abbildung 12 B). Zwischen WT- und AT2-R-KO-Mäusen ergaben sich ein nicht-signifikant schwächeres Ausmaß der Fibrose im Nicht-Infarktbereich in AT2-R-KO- vs. WT-Mäusen ( $83,52 \pm 35,27$  % vs.  $100 \pm 39,08$ %, Abbildung 12 A). Der fibrotische Umbau des Infarktbereichs zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen (Abbildung 13).



Abbildung 10: Repräsentative Sirius-Rot-Färbung mit Infarktnarbe

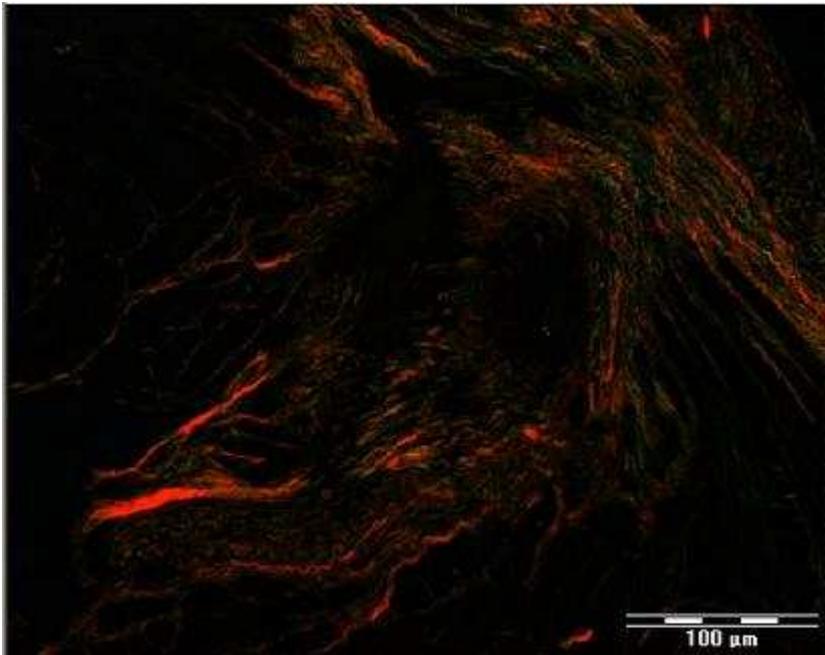
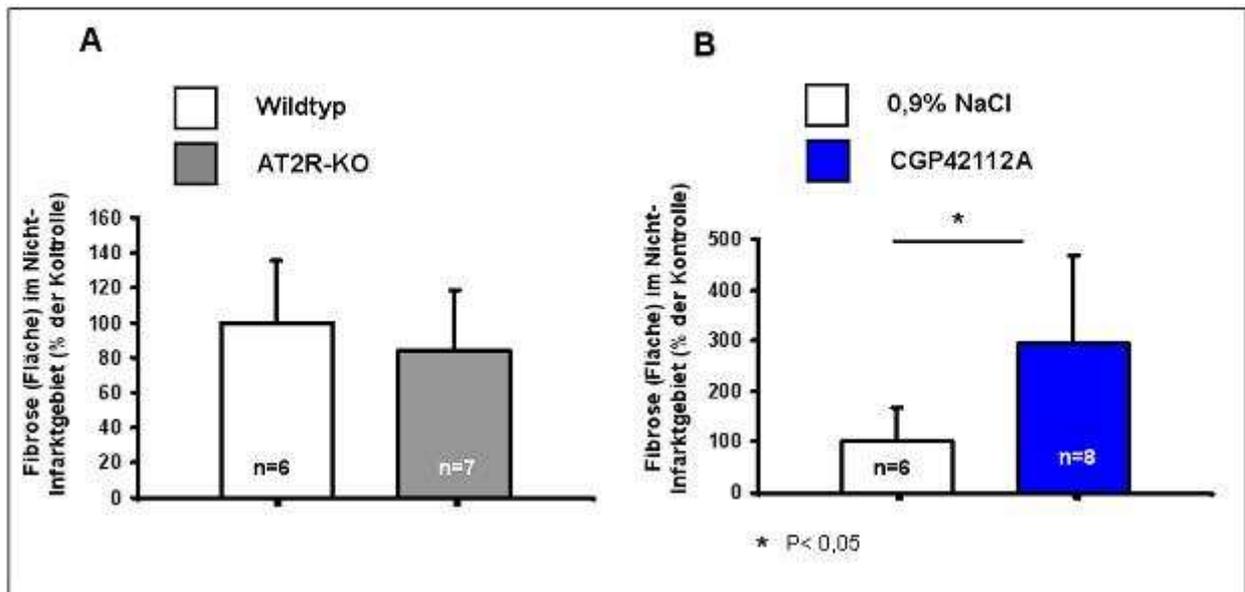
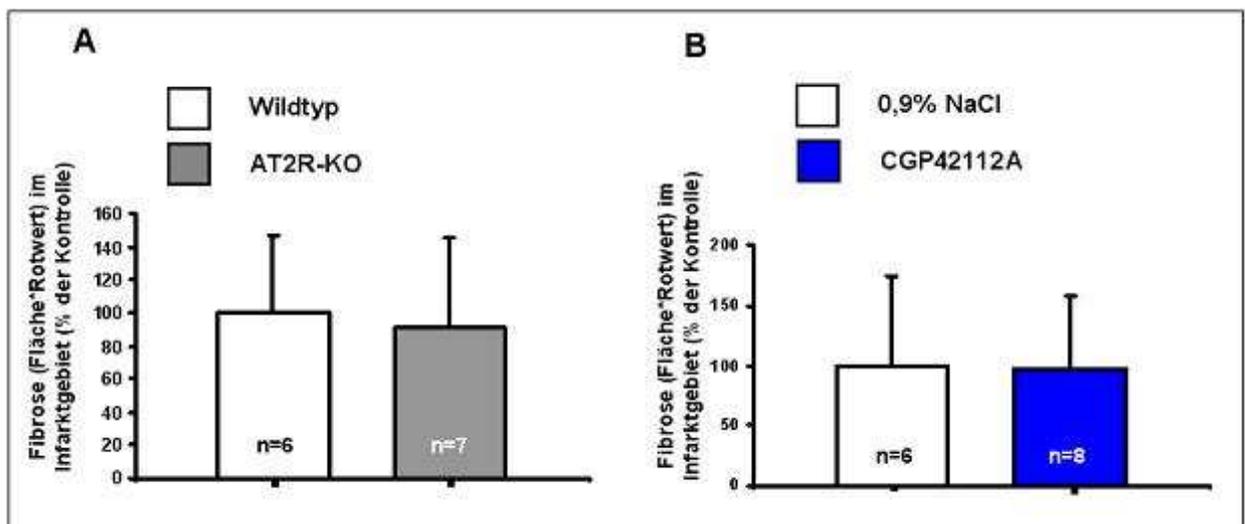


Abbildung 11: Repräsentative Sirius-Rot-Färbung mit Infarktnarbe unter zirkular-polarisiertem Licht



**Abbildung 12:** Vergleich des Fibroseausmaßes zwischen WT- und AT2-R-KO-Mäusen (A) und zwischen mit 0,9% NaCl und CGP-42112A behandelten WT-Mäusen (B) in Nicht-Infarktregionen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus Flächen von Sirius-rot-gefärbten Kollagenfasern (% der Kontrolle).

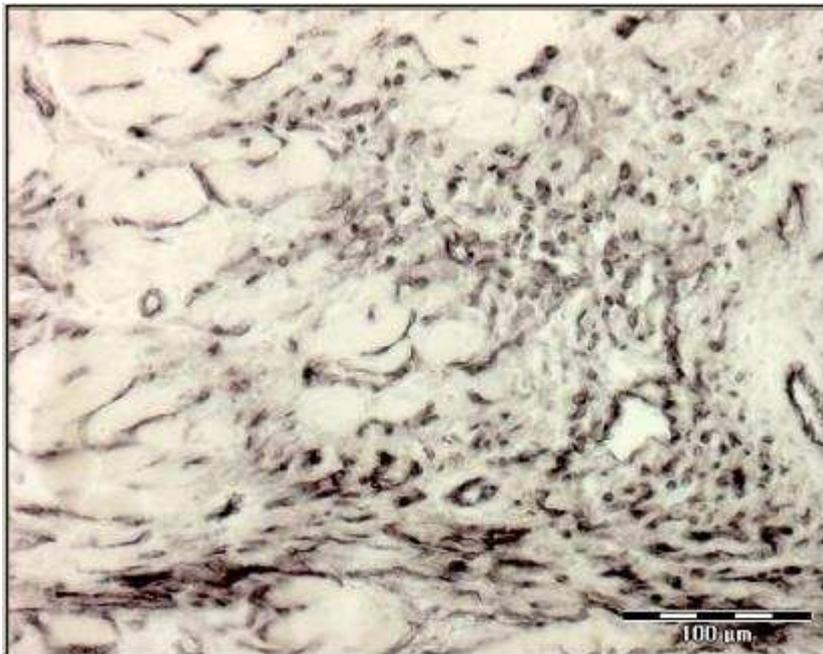


**Abbildung 13:** Vergleich des Fibroseausmaßes zwischen WT- und AT2-R-KO-Mäusen (A) und zwischen mit 0,9% NaCl und CGP-42112A behandelten WT-Mäusen (B) in Infarktregionen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Produkte aus Flächen und Rotwerten von Sirius-rot-gefärbten Kollagenfasern (% der Kontrolle).

### 3.4.3. Gefäßdichteanalyse

In immunhistochemischen Verfahren wurden Gefäße zum einen CD31- und zum anderen  $\alpha$ -SMA- markiert (siehe auch repräsentative Abbildungen 14 bis 17). Gefäße insgesamt (Arteriolen und Arterien, venöse Gefäße und Kapillaren) stellten sich als CD31-positive Strukturen dar. Arteriolen und Arterien als muskularisierte Gefäße entsprachen  $\alpha$ -SMA-positiven Strukturen.

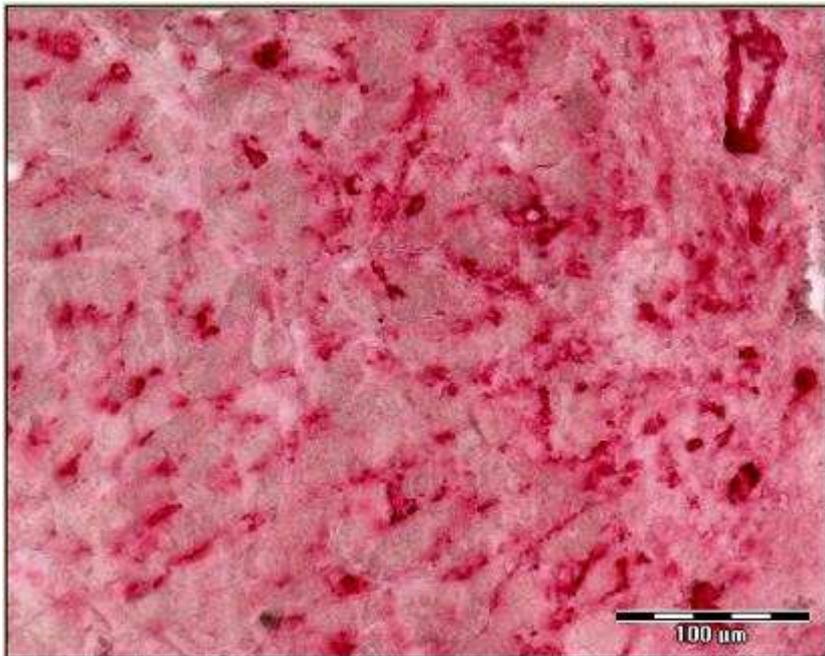
Die Gefäßdichten nach der CD31-Färbung und nach der  $\alpha$ -SMA-Färbung der Vergleichsgruppen waren in den Infarktregionen signifikant höher als in den Nicht-Infarktregionen (Abbildung 18). Die Gefäßdichte der Herzen infarzierter AT2-R-KO-Mäuse unterschied sich nicht von der in WT-Mäusen gemessenen (sowohl in den Infarkt- also auch in Nicht-Infarktregionen; Abbildungen 18A und 19A). Auch *Sham*-operierte Mäuse beider Genotypen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Gefäßdichte. CGP-42112A-Behandlung hatte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die kardiale Gefäßdichte nach Myokardinfarkt sowohl in den Infarktregionen als auch in den Nicht-Infarktregionen (Abbildungen 18B und 19B).



**Abbildung 14:** Repräsentative CD31-positive Gefäße im Infarktgebiet



**Abbildung 15:** Repräsentative CD31-positive Gefäße im Nicht-Infarktgebiet



**Abbildung 16:** Repräsentative  $\alpha$ -SMA-positive Gefäße im Infarktgebiet



Abbildung 17: Repräsentative  $\alpha$ -SMA-positive Gefäße im Nicht-Infarktgebiet

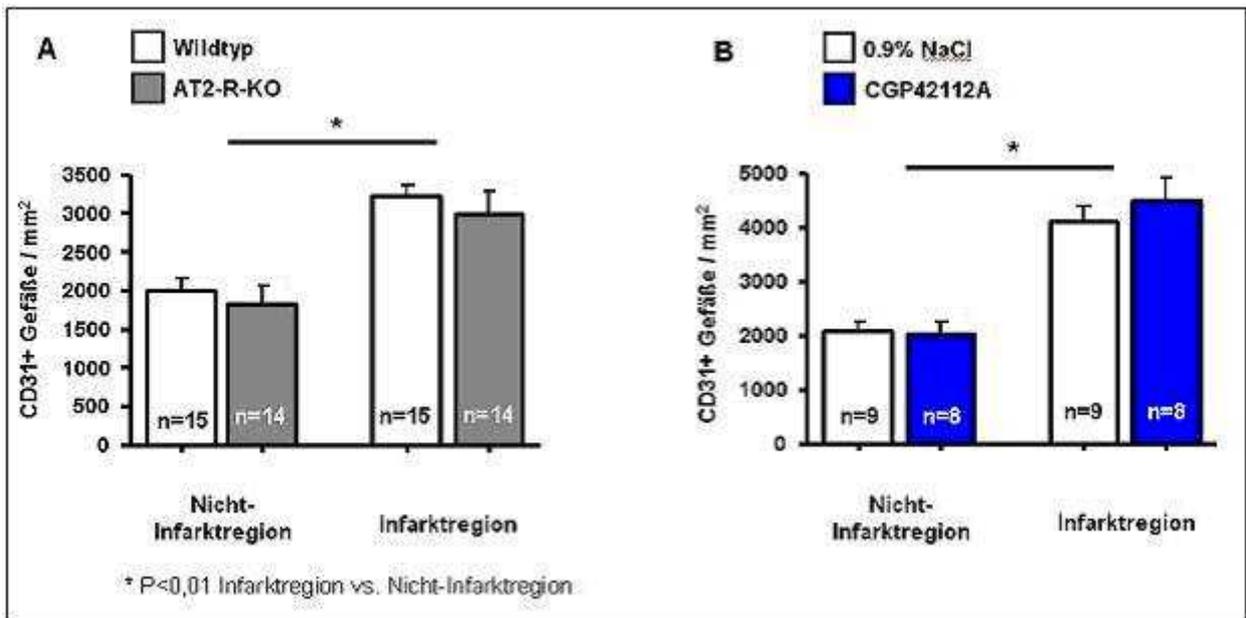
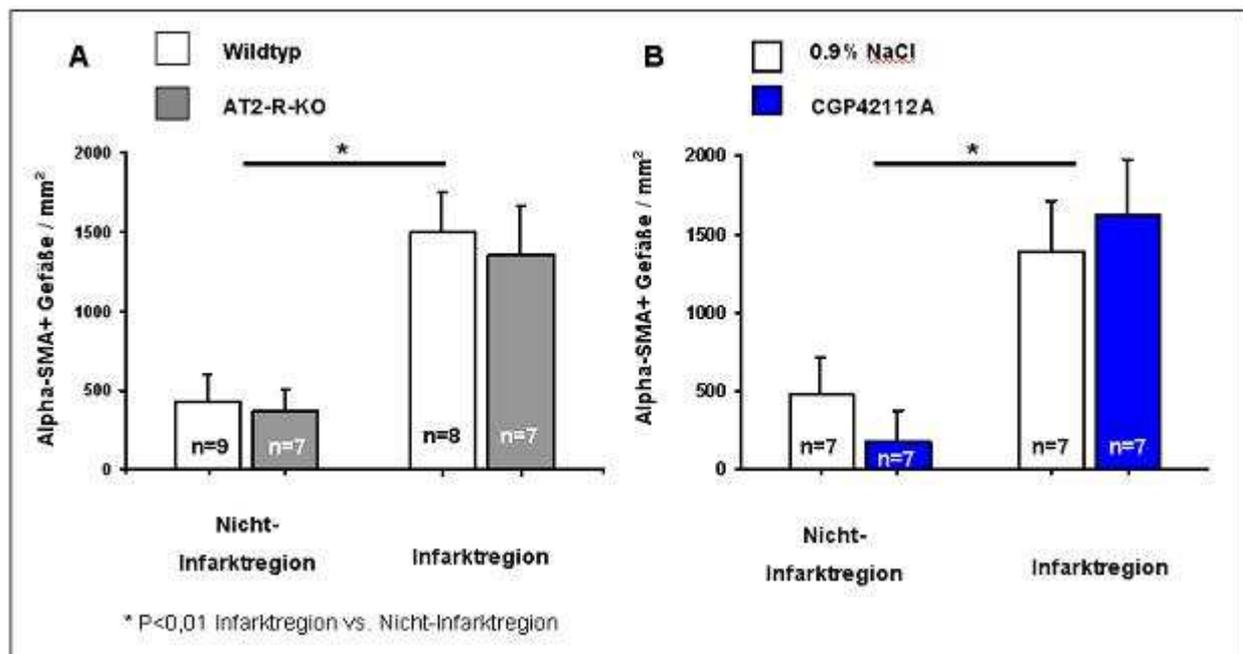


Abbildung 18: CD31-positive Gefäße in Infarkt- und Nicht-Infarktregionen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. **A)** Vergleich zwischen WT- und AT2-R-KO- Mäusen. **B)** Vergleich zwischen mit 0,9% NaCl und mit CGP-42112A behandelten WT-Mäusen.



**Abbildung 19:**  $\alpha$ -sma-positive GefäÙe in Infarkt- und Nicht-Infarktregionen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. **A)** Vergleich zwischen WT- und AT2-R-KO- Mäusen. **B)** Vergleich zwischen mit 0,9% NaCl und mit CGP-42112A behandelten WT-Mäusen.

### 3.4.3. Analyse inflammatorischer Infiltrate des Herzens

In immunhistochemischen Verfahren wurden Monozyten und Makrophagen Mac-2- und T-Lymphozyten CD3-markiert (siehe auch repräsentative Abbildungen 20 und 21). Aus einzelnen Mac-2- und CD3-positiven Flächen wurden mit Hilfe des Messprogrammes *Axiovision* Gesamtflächensummen gebildet und auf die jeweilige Kontrollgruppe normalisiert.

Das Ausmaß der Monozyten- und Makrophageninfiltration des Infarktgebietes war in AT2-R-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nicht-signifikant unterschiedlich (Abbildung 22A). Die mit CGP-42112A-behandelten WT-Mäuse zeigten zudem keine veränderte Monozyten- und Makrophageninfiltration in das Infarktgebietes im Vergleich zu den WT-Mäusen der Kontrollgruppe (Abbildung 22B). Das Ausmaß der T-Lymphozyteninfiltration in das Infarktgebiet war in AT2-R-KO-Mäusen signifikant höher als in WT-Mäusen ( $185,91 \pm 62,19$  % vs.  $100 \pm 21,87$  %; Abbildung 23A). Es konnte kein Effekt der CGP-42112A-Behandlung auf die T-Lymphozyteninfiltration in das Infarktgebiet festgestellt werden (Abbildung 23B). *Sham*-operierte Mäuse wurden diesbezüglich nicht untersucht.

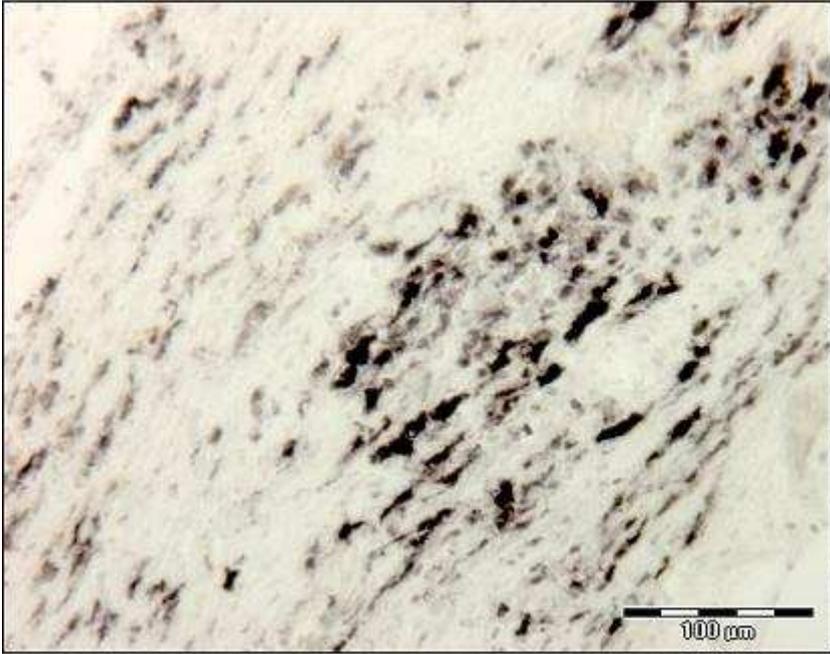


Abbildung 20: Repräsentative Mac-2-Färbung im Infarktgebiet

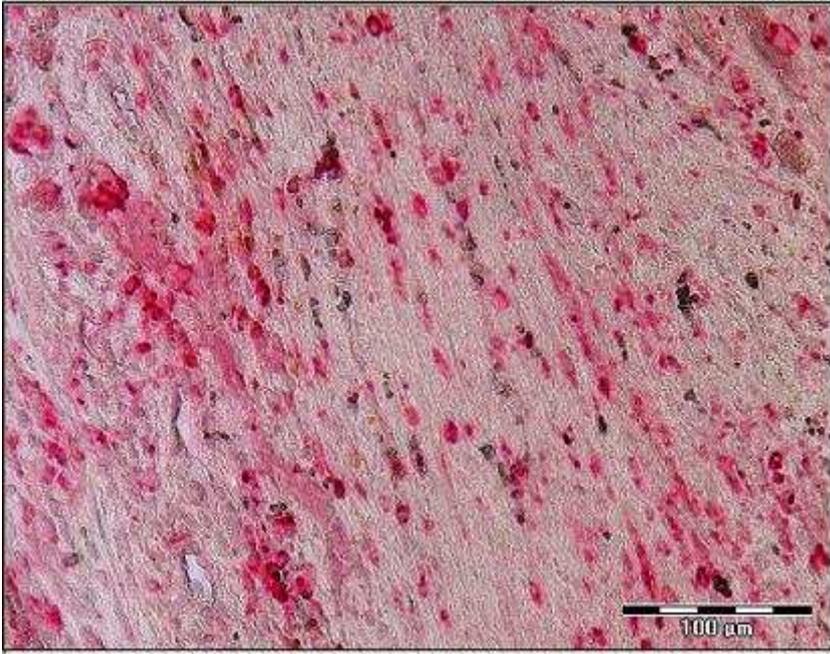
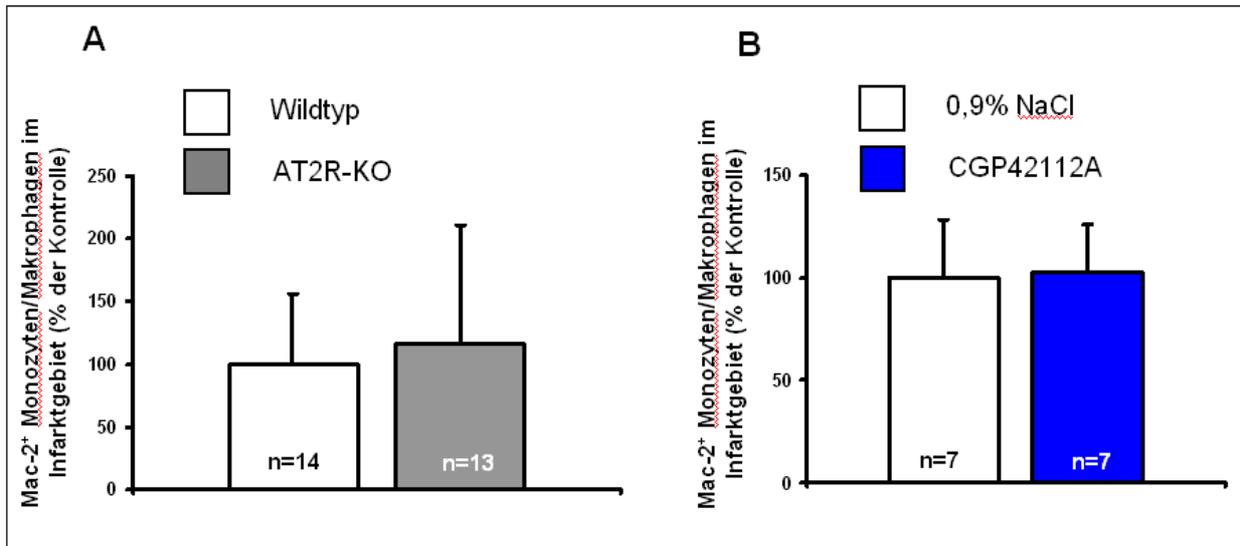
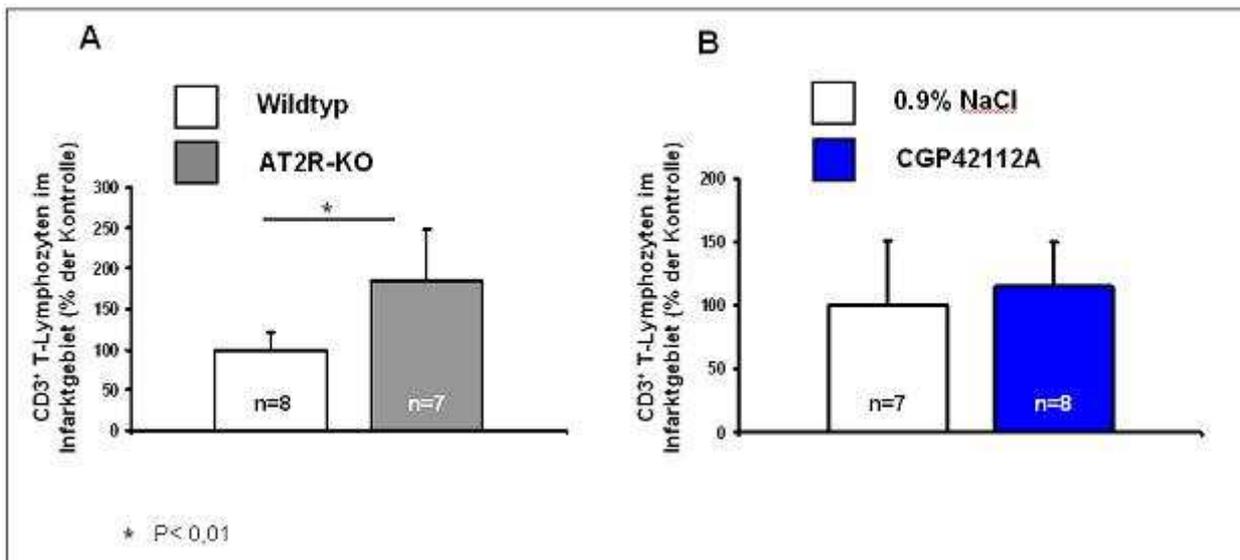


Abbildung 21: Repräsentative CD3-Färbung im Infarktgebiet



**Abbildung 22:** Mac-2-positive Monozyten/Makrophagen in Infarktregionen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. **A)** Vergleich zwischen WT- und AT2-R-KO- Mäusen und **B)** Vergleich zwischen mit 0,9% NaCl und mit CGP-42112A behandelten WT-Mäusen.

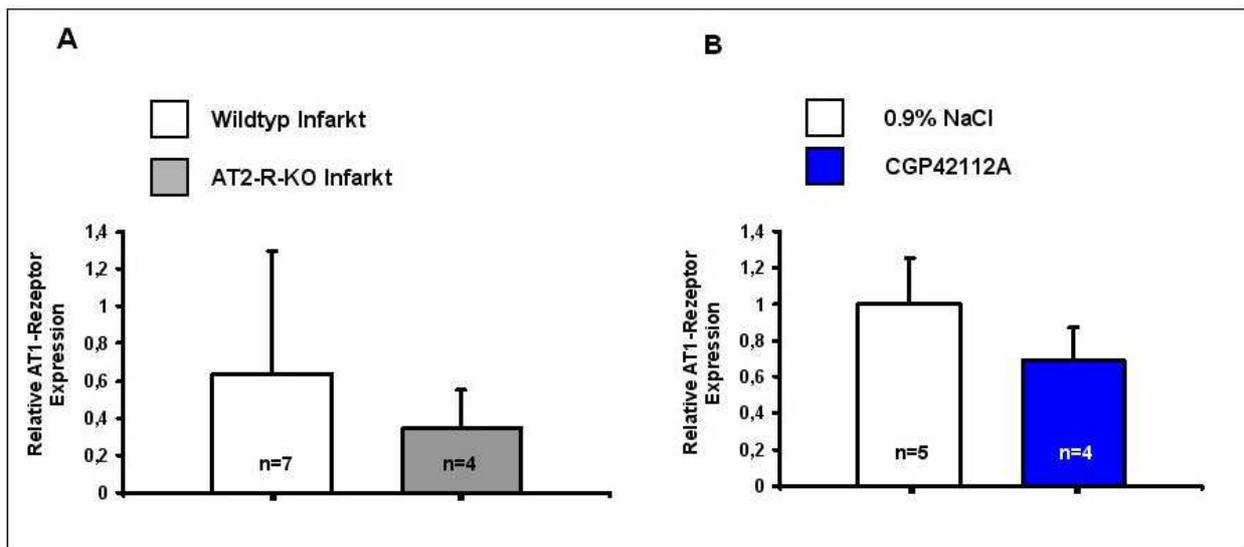


**Abbildung 23:** CD3-positive T-Lymphozyten in Infarktregionen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. **A)** Vergleich zwischen WT- und AT2-R-KO- Mäusen und **B)** Vergleich zwischen mit 0,9% NaCl und mit CGP-42112A behandelten WT-Mäusen.

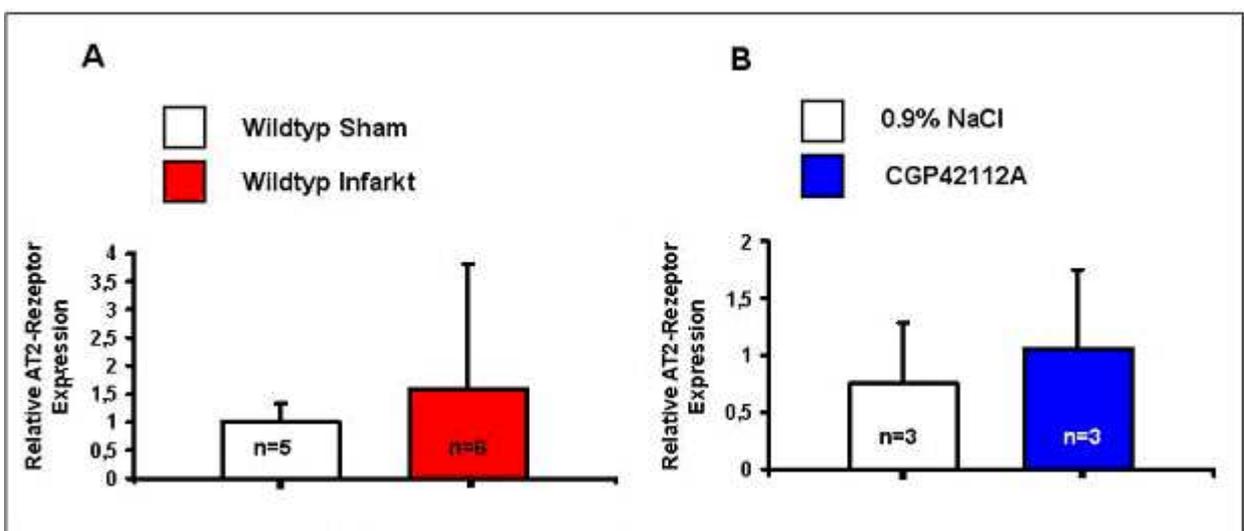
### 3.5. Analysen der mRNA-Expression von AT1-R, AT2-R, TGF- $\beta$ und MCP-1

Mittels *Real-Time-PCR* wurde die Expression des AT1- und AT2-R, des MCP-1 und des TGF- $\beta$  bestimmt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression des AT1-R und des AT2-R innerhalb der Vergleichsgruppen (Abbildungen 24 und 25). Eine Expression des AT2-R war in AT2-R-KO-Mäusen nicht nachweisbar. Das MCP-1 wurde signifikant stärker exprimiert in infarzierten als in *Sham*-operierten

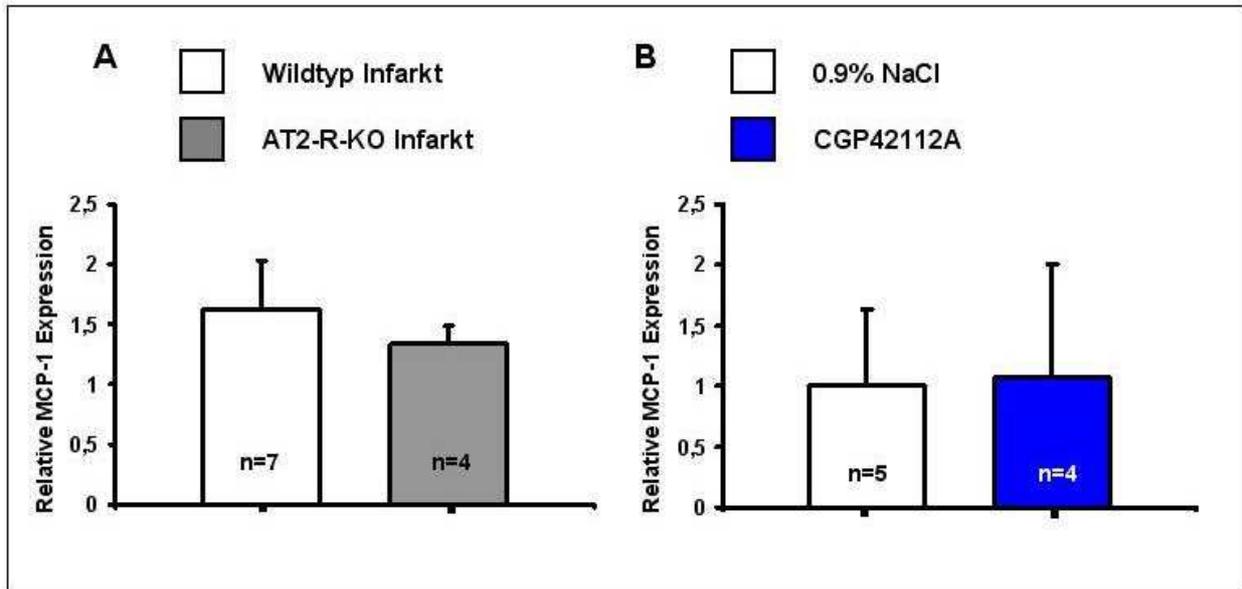
WT- ( $1,63 \pm 0,41$  vs.  $1 \pm 0,4$ ) und AT2-R-KO-Mäusen ( $1,34 \pm 0,15$  vs.  $0,8 \pm 0,12$ ). Zwischen AT2-R-KO- und WT-Mäusen und zwischen CGP-42112A- und NaCl-behandelten WT-Mäusen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression des MCP-1 (Abbildung 26). TGF- $\beta$  wurde signifikant stärker exprimiert in CGP-42112A- als in NaCl-behandelten WT-Mäusen ( $2,47 \pm 0,48$  vs.  $1 \pm 0,42$ ; Abbildung 27B). Zwischen AT2-R-KO- und WT-Mäusen sowie zwischen infarzierten und sham-operierten Mäusen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression des TGF- $\beta$ .



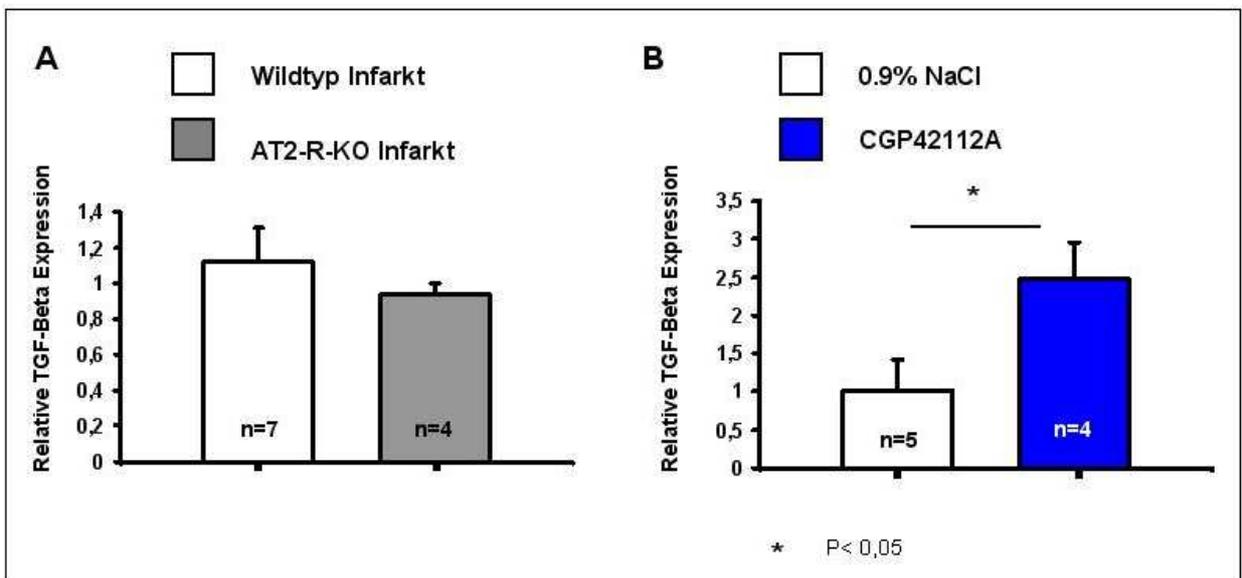
**Abbildung 24:** Relative Expression des AT1-R. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. **A)** Vergleich zwischen infarzierten WT- und AT2-R-KO-Mäusen. Kontrollgruppe: WT Sham. **B)** Vergleich zwischen mit 0,9% NaCl und mit CGP-42112A behandelten WT-Mäusen. Kontrollgruppe: 0,9% NaCl.



**Abbildung 25:** Relative Expression des AT2-R. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. **A)** Vergleich zwischen zwischen Sham-operierten und infarzierten WT-Mäusen. Kontrollgruppe: WT Sham. **B)** Vergleich zwischen mit 0,9% NaCl und mit CGP-42112A behandelten WT-Mäusen. Kontrollgruppe: 0,9% NaCl.



**Abbildung 26:** Relative Expression des MCP-1. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. **A)** Vergleich zwischen infarzierten WT- und AT2-R-KO-Mäusen. Kontrollgruppe: WT Sham. **B)** Vergleich zwischen mit 0,9% NaCl und mit CGP-42112A behandelten WT-Mäusen. Kontrollgruppe: 0,9% NaCl.



**Abbildung 27:** Relative Expression des TGF-Beta. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. **A)** Vergleich zwischen infarzierten WT- und AT2-R-KO-Mäusen. Kontrollgruppe: WT Sham. **B)** Vergleich zwischen mit 0,9% NaCl und mit CGP-42112A behandelten WT-Mäusen. Kontrollgruppe: 0,9% NaCl.

## 4. Diskussion

Der Einfluss des AT2-R auf das kardiale *Remodeling* nach Myokardinfarkt wurde bereits in früheren und zum Teil widersprüchlichen Studien untersucht. So wurde In vorhergehenden Studien sowohl von günstigen als auch schädlichen Effekten des AT2-R am Herzen berichtet (Ichihara et al., 2002; Adachi et al., 2003; Oishi et al., 2003 und 2006; Bove et al., 2004 und 2005; Kaschina et al., 2008).

Die Effekte des AT2-R auf das kardiovaskuläre *Remodeling* an experimentell infarzierten AT2-R-KO- und mit dem AT2-R-Agonisten CGP-42112A stimulierten WT-Mäusen sind bislang nicht untersucht worden. In dieser Arbeit wurde daher mit Hilfe histologischer (Gefäßdichte-Analyse, Analyse inflammatorischer Infiltrate, Analyse kardialer Fibrose), molekularbiologischer (Expressionsanalysen mittels *Real-Time-PCR*) und funktioneller (Echokardiographie, invasive Blutdruckmessung) Methoden sowie der Mortalitätsanalyse ein potentieller Einfluss des AT2-R auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität nach Myokardinfarkt analysiert.

### 4.1. Diskussion der Methodik

#### 4.1.1. Mausmodell

Die Effekte des AT2-R auf das kardiale *Remodeling* wurden in bisherigen Studien anhand verschiedener Tiermodelle untersucht: Verwendung fanden AT2-R-KO- und AT2-R-überexprimierende Mausmodelle mit einer ausgeschalteten beziehungsweise verstärkten Expression des AT2-R sowie pharmakologische AT2-R-Stimulation oder AT2-R-Blockade (Widdop et al., 2003). Diese Arbeit hat die Effekte des AT2-R auf das kardiale *Remodeling* sowohl mittels Ausschaltung des AT2-R anhand von AT2-R-KO-Mäusen als auch mittels spezifischer Stimulation des AT2-R mit dem AT2-R-Agonisten CGP-42112A an experimentell infarzierten Mäusen untersucht. Der Vorteil unseres experimentellen Ansatzes lag darin, dass sowohl der Effekt einer AT2-R-Defizienz als auch der Effekt einer pharmakologischen AT2-R-Aktivierung analysiert und interpretiert werden konnte. Der genetische *Knockout* des AT2-R bietet den Vorteil, dass eine möglicherweise endogene Stimulation des Rezeptors nach Myokardinfarkt durch Aktivierung des RAAS verhindert wird (Kaschina et al., 2008). Allerdings ist eine kompensatorische Expressionsteigerung des AT1-R in AT2-R-KO-Mäusen denkbar (Tanaka et al., 1999), ein Phänomen, das wir in unserem *Knockout*-Mausmodell jedoch

nicht beobachten konnten. Zudem entfallen im *Knockout*-Modell Effekte, die durch eine mögliche molekulare Interaktion beider Rezeptoren ausgelöst werden (Lévy, 2004).

Im Gegensatz zum *Knockout*-Modell besteht zudem bei der Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren zur Hemmung des AT2-R, z. B. dem AT2-R-Antagonisten PD 123319, insbesondere in höheren Dosierungen, das Problem der unspezifischen Beeinflussung weiterer Rezeptorsysteme (Macari et al., 1993). CGP-42112A hingegen ist ein hochselektiver, partieller AT2-R-Agonist (Whitebread et al., 1989) der in dieser Arbeit als therapeutische Option zur Behandlung des Myokardinfarkts untersucht wurde. Als problematisch ist die partiell-agonistische Eigenschaft von CGP-42112A am AT2-R anzusehen, die bei hohen endogenen Ligandenkonzentrationen *in vivo* zu einer Herabsetzung des AT2-R-Aktivierungsniveaus führen könnte.

Die Wahl der Maus als Versuchstier ergab sich aus der nachgewiesenen guten Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus, der Verfügbarkeit genetisch manipulierter Mausmodelle, dem Vorteil der schnellen Zuchtfolge und dem geringeren Kostenaufwand als bei größeren Säugetieren.

#### **4.1.2. Operative Induktion des Myokardinfarkts**

Das LAD-Ligationsmodell an der Maus ist ein etabliertes Modell zur Induktion kardialer Ischämie und Nekrose und wurde von uns nach publizierter Methodik durchgeführt (Zolotareva und Kogan, 1978; Michael et al., 1995). Die hervorgerufenen Veränderungen im Myokard nach Koronararterienligation sind vergleichbar mit den kardialen Erscheinungen des akuten Koronarsyndroms nach thrombotischem Verschluss einer Koronararterie beim Menschen (Zolotareva und Kogan, 1978), was eine gute Übertragbarkeit der Befunde auf die humane Pathophysiologie vermuten lässt. Allerdings hängt das Verfahren stark vom Operateur und seiner Erfahrung ab. Der Erfolg einer Infarzierung wird visuell durch Hypokinesie und regionale Zyanose des Herzens festgestellt und erfordert daher ein geübtes Auge und ausreichend praktische Erfahrung, um den Ligationserfolg beurteilen zu können. Die hier erzielten Infarktgrößen sind in Anbetracht der individuellen Gefäßanlage jeder Maus und unumgänglichen Schwankungen im Ligationssprozedere trotz mikroskopischer Hilfe variabel.

Als Anästhetikum wurde Isofluran verwendet, das eine geringe Löslichkeit im Blut aufweist und somit eine gute Steuerbarkeit der Narkosetiefe zulässt (Eger, 1981). Wie

andere Narkotika senkt es allerdings die Herzfrequenz, den Blutdruck und die Kontraktilität des Herzens (Eger 1981). Dies ist bei den Ergebnissen der funktionellen Messungen (Echokardiographie, Blutdruck) zwar zu bedenken, allerdings sollten sich die Isofluran-Effekte gleichmäßig auf alle Versuchsgruppen auswirken und somit die Gruppeneffekte in Bezug auf kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität nicht verzerren.

#### **4.1.3. Echokardiographie**

Die linksventrikuläre Funktion der Versuchstiere wurde in dieser Arbeit echokardiographisch untersucht. Transthorakale Echokardiographie ist eine gute nichtinvasive Methode zur Beurteilung von linksventrikulären morphologischen und funktionellen Veränderungen *in vivo*. Die Verlässlichkeit von Ergebnissen der Kleintierechokardiographie nach Myokardinfarkt ist unstrittig (Litwin et al., 1994; Hoit et al., 1995; Iwase et al., 1997). So belegen diverse Arbeiten die sehr gute Sensitivität und Spezifität der Echokardiographie bei der Detektion einer funktionellen Auswirkung von Unterschieden im linksventrikulären *Remodeling* nach Myokardinfarkt im Mäuseorganismus (Patten et al., 1998; Gao et al., 2000).

#### **4.1.4. Invasive Blutdruckmessung**

Da berichtet wurde, dass der AT2-R an der Blutdruckregulation beteiligt ist (Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995, Siragy et al., 1999; Bergaya et al., 2004; Abadir et al., 2006), war es maßgeblich, die Blutdrücke in AT2-R-KO-Mäusen und AT2-R-stimulierten WT-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu messen. Die invasive Messmethode bot sich als finale Untersuchung bei den infarzierten Mäusen an. Als Alternative wäre die plethysmographische Blutdruckmessung mittels Schwanzmanschette möglich gewesen, die aber ungenauere Messwerte als die invasive Blutdruckmessung liefert, eine Gewöhnung der Tiere an die Prozedur bedarf und zudem durch Stress-Induktion zu Blutdruckerhöhungen führen kann.

#### **4.1.5. Immunhistochemie**

Der Einfluss des AT2-R auf regeneratives Gefäßwachstum und Inflammationsgeschehen nach Myokardinfarkt wurde in dieser Arbeit immunhistochemisch untersucht. Die Immunhistochemie nutzt spezifische Antikörper,

um die Verteilung von bestimmten Antigenen sichtbar zu machen. Es wurden Antigene genutzt, die spezifisch nur in bestimmten Zelltypen oder Geweben (Endothelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen, Blutgefäße) exprimiert werden. Verwendung in dieser Arbeit fanden immunhistochemische Färbeverfahren nach der ABC- und LAB-Methode (Guesdon et al., 1979; Hsu et al., 1981). Die ABC-Methode erbringt das stärkste Signal und die geringste Hintergrundfärbung im Vergleich zu anderen Enzym-Methoden (Hsu and Raine, 1981; Hsu et al., 1981). Von der LAB-Methode hingegen nimmt man an, dass sie eine bis zu acht Mal höhere Sensitivität als die ABC-Methode aufweist (Giorno, 1984). In dieser Arbeit wurden beide Methoden zum Nachweis der zu untersuchenden Strukturen erprobt und letztlich die jeweils am besten geeignete Färbemethode verwendet. Es wurde immunhistochemisch der Endothelzellmarker CD31 untersucht. Bei diesem handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, welches überwiegend und spezifisch auf Endothelzellen exprimiert wird (Newman, 1997). Vorarbeiten zeigen, dass die immunhistochemische Färbung von Gefäßen mittels Antikörpern gegen CD31 eine Standardmethode zur Beurteilung von Angiogenese darstellt und anderen Methoden in diesem Zusammenhang überlegen ist (Parums et al., 1990; Ismail et al., 2003). Arteriogenese wurde mittels immunhistochemischer Färbung eines Antikörpers gegen  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) untersucht. Bei  $\alpha$ -SMA handelt es sich um eine Isoform von Aktin, die von glatten Gefäßmuskelzellen, nicht aber von Myokard, Fibroblasten oder quergestreifter Muskulatur exprimiert wird (Skalli et al., 1986) und daher zur Markierung von Arteriolen und Arterien in der Herzmuskulatur gut geeignet ist (Cotton et al., 2002; Dor et al., 2002). Ebenfalls immunhistochemisch untersucht wurde das Ausmaß des Inflammationsgeschehens nach Myokardinfarkt. Der immunhistochemische T-Zell-Nachweis ist gut etabliert. T-Lymphozyten exprimieren das CD3-Antigen (Abbas und Lichtmann, 2003), welches in dieser Arbeit mittels eines CD3-Antikörpers visualisiert wurde. Auch die Monozyten- und Makrophageninfiltration des Infarktgebiets wurde immunhistochemisch mittels Mac-2-Markierung untersucht. Bei Mac-2 handelt es sich um ein Oberflächenantigen von Monozyten und Makrophagen (Ho und Springer, 1982). Schließlich noch fand ein immunhistochemischer Nachweis des AT2-R Verwendung.

#### **4.1.6. Fibroseanalyse**

Das Ausmaß der Fibrose wurde anhand Sirius-Rot-Färbungen quantifiziert. Die Kollagenfärbung mit Sirius-Rot und die Detektion kardialer Fibrose wurden bereits

häufig angewandt (Cleutjens et al., 1995; Lutgens et al., 1999). Quantifiziert wurde das Ausmaß kardialer Fibrose in dieser Arbeit mittels zirkular-polarisiertem Strahlengang im Lichtmikroskop (Whittaker et al., 1994). Einfache Lichtmikroskopie lässt gute qualitative Aussagen über Sirius-Rot gefärbte Kollagenfasern zu, Quantifizierungen allerdings fallen schwierig aus. Polarisiertes Licht dagegen ist in dieser Hinsicht sehr effektiv und sensitiv auf Grund seiner Eigenschaft, mit Kollagen auf Molekülebene zu interagieren. Früher häufiger verwendetes linear-polarisiertes Licht hat gegenüber zirkular-polarisiertem Licht den Nachteil, dass einige Teile der Kollagenfasern nicht erfasst werden (Whittaker et al., 1994).

#### **4.1.7. Real-Time-PCR**

Mittels *Real-Time-PCR* wurde die mRNA-Expressionen des AT1-R, des AT2-R, des *Monocyte Chemotactic Proteins-1* (MCP-1) und des *Transforming Growth Factors-Beta* (TGF- $\beta$ ) bestimmt.

Hierfür kam das TaqMan system 7900 HT zum Einsatz und es wurden validierte Genexpressions-Assays der Firma Applied Biosystems verwendet, welche genomische DNA nicht amplifizieren und somit hochspezifisch die Transkripte der genannten Marker detektieren. Zudem wurden die Ergebnisse auf die Expression akzeptierter *Housekeeping*-Gene normalisiert, um Pipettierschwankungen auszugleichen. Die AT1- und AT2-R mRNA-Expression waren essentiell zu bestimmen, um eine eventuell veränderte Expression der Rezeptoren im *Knockout*- bzw. AT2-R-stimulierten Mäusen detektieren und so die Ergebnisse besser einordnen zu können.

MCP-1 wirkt chemotaktisch und aktivierend auf Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten *in vitro* (Jiang et al., 1992; Carr et al., 1994; Lukacs et al., 1997). *In vivo* spielt es eine wichtige Rolle im *Recruitment* von Monozyten/Makrophagen und im linksventrikulären *Remodeling* nach Myokardinfarkt (Dewald et al., 2005). Auch im Rahmen von Arteriogenese spielen Cytokine wie MCP-1 eine wichtige Rolle und verstärken Kollateralarterienwachstum (Carmeliet, 2003). Abbau von Monozyten mindert Kollateralarterienwachstum, wohingegen die Zufuhr von Monozyten es fördert (Kamihata et al., 2002; Heil et al., 2002).

TGF- $\beta$  spielt eine entscheidende Rolle der kardialen Wundheilung nach Infarkt (Bujak und Frangogiannis, 2007) und moduliert unter anderem Ang II-getriggert das kardiale Fibrosegeschehen durch Verstärkung der Kollagensynthese in kardialen Fibroblasten

(Sun et al., 1998; Chen et al., 2004; Bujak und Frangogiannis, 2007). Außerdem exprimieren und sezernieren im Rahmen der Arteriogenese aktivierte Endothelzellen unter anderem TGF- $\beta$ , welches die Migration und das lokale Wachstum von glatten Muskelzellen stimulieren und letztlich die Gefäßerweiterung induzieren kann (Carmeliet, 2000; Heil et al., 2006).

## **4.2. Diskussion der Ergebnisse**

In dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass CGP-42112A-vermittelte AT2-R-Stimulation einen negativen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität nach Myokardinfarkt hat. Zum anderen konnten wir beobachten, dass AT2-R-Defizienz nicht wie angenommen mit einer erhöhten, sondern mit einer eher erniedrigten Mortalität nach experimentellem Myokardinfarkt im Mausmodell assoziiert ist.

### **4.2.1. Mortalität**

Wir konnten nachweisen, dass eine pharmakologische Aktivierung des AT2-Rezeptors in Mäusen durch den partiellen AT2-R-Agonisten CGP-42112A im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren der Kontrollgruppe zu einer Zunahme der 7-Tages-Mortalität nach Myokardinfarkt führte. Zudem waren die Lungengewichte in CGP-42112A behandelten WT-Mäusen signifikant größer als die von scheinbehandelten WT-Mäusen, was auf ein stärker ausgeprägtes Linksherzversagen mit Lungenstauung in CGP-42112A-behandelten WT-Mäusen schließen lässt und zur höheren Mortalität dieser Gruppe möglicherweise beigetragen haben könnte. Des Weiteren zeigte sich in ähnlicher Tendenz eine nicht-signifikant niedrigere Mortalität von infarzierten AT2-R-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen.

Der Einfluss des AT2-R-Agonisten CGP-42112A auf das Überleben nach experimentellem Myokardinfarkt wurde bislang noch nicht untersucht. Vorarbeiten berichteten im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie hauptsächlich von einem positiven Einfluss des AT2-R auf das Überleben im Mausmodell des Myokardinfarkts, wobei vor allem AT2-R-KO- und WT-Mäuse diesbezüglich verglichen wurden. Oishi und Kollegen fanden eine signifikant höhere Mortalität in AT2-R-KO-Mäusen nach Myokardinfarkt und stellten in einer weiteren Arbeit einen Beitrag des AT2-R zum kardioprotektiven Effekt unter AT1-R-Gabe fest (Oishi et al., 2003 und 2006). Auch Adachi und Kollegen beobachteten eine signifikant niedrigere 7-Tages-Überlebensrate

von AT2-R-KO- im Vergleich zu WT-Mäusen nach Myokardinfarkt (Adachi et al., 2003). Ichihara und Kollegen hingegen fanden zwar reduzierte linksventrikuläre Dilatation und Fibrose nach Myokardinfarkt in AT2-R-KO-Mäusen, die Mortalität war aber auch hier höher in AT2-R-KO-Mäusen als Folge einer erhöhten Rate kardialer Ruptur in der ersten Woche nach Infarktinduktion. In der gleichen Arbeit fanden sich allerdings nach 6 Wochen keine signifikanten Unterschiede mehr (Ichihara et al., 2002). Andere Arbeitsgruppen wiederum berichteten von keiner wesentlichen Rolle des AT2-R auf das Überleben im Myokardinfarkt-*Remodeling*-Modell (Xu et al., 2002).

Die Diskrepanz zwischen den publizierten und unseren Ergebnissen könnte zum einen auf der Verwendung verschiedener Mausstämme beruhen. So wurden in einigen der genannten Studien AT2-R-KO-Mäuse des C57/BL6-Hintergrundes verwendet (Xu et al., 2002, Ichihara et al., 2002). Allerdings wurde ein Teil der diskrepanten Befunde wie auch in der vorliegenden Arbeit in AT2-R-KO-Mäusen des FVB/N-Hintergrundes erhoben (Oishi et al., 2003 und 2006).

Des Weiteren lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse anhand der Anzahl der Versuchstiere bewerten, die in dieser Studie mit n=38 (AT2-R-KO) und n=44 (WT) deutlich höher war als in den genannten Vorarbeiten. Auch sind auf Grund des technisch diffizilen Verfahrens der Infarzierung unterschiedliche Infarktgrößen durch unterschiedliche Operateure als beeinflussende Variable denkbar. Letztlich muss zudem darauf hingewiesen werden, dass unspezifische Effekte von CGP-42112A als Ursache für die negativen Effekte der Substanz auf das Überleben nach Myokardinfarkt nicht ausgeschlossen werden können, obwohl eine hohe Selektivität von CGP-42112A für den AT2-R dokumentiert wurde (Whitebread et al., 1989).

#### **4.2.2. Einfluss des AT2-R auf die kardiale Funktion**

Der negative Einfluss einer pharmakologischen AT2-R-Stimulation auf das *Remodeling* konnte in dieser Studie zudem mittels transthorakaler Echokardiographie bestätigt werden: AT2-R-Stimulation mit CGP-42112A führte zu einer signifikant stärkeren Dilatation des linken Ventrikels im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den übrigen echokardiographisch bestimmten Parametern, insbesondere dem Surrogatmarker für kardiale Kontraktilität, *Fractional Shortening* (FS), ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Auch Ichihara und Kollegen berichteten, dass der AT2-R das kardiale *Remodeling* negativ beeinflussen kann. So konnte in AT2-R-KO-Mäusen echokardiographisch eine

reduzierte linksventrikuläre Dilatation nach Myokardinfarkt beobachtet werden (Ichihara et al., 2002). Diesen Befund konnten wir in unseren vergleichenden Untersuchungen zwischen AT2-R-KO- und Wildtyp allerdings nicht nachvollziehen, warum ist unklar. Oishi und Kollegen hingegen fanden eine stärkere linksventrikuläre Dilatation und Fibrose in AT2-R-KO- als in WT-Mäusen (Oishi et al., 2003 und 2006), Befunde, die auf einen kardioprotektiven Effekt des AT2-R im Post-Infarkt-*Remodeling* hindeuten. Kaschina und Kollegen berichteten erst kürzlich über einen kardioprotektiven Effekt des AT2-R-Agonisten Compound 21 im experimentellen Myokardinfarkt-Modell der Ratte, der vermutlich durch anti-apoptische und anti-inflammatorische Mechanismen vermittelt wird. So konnte in echokardiographischen Analysen eine Verbesserung fast aller untersuchter Parameter mit Ausnahme des linksventrikulären Durchmessers beobachtet werden (Kaschina et al., 2008). Als Vorteil der Untersuchungen von Kaschina und Kollegen sei die Verwendung des selektiven AT2-R-Agonisten Compound 21 gegenüber dem selektiven, partiellen, und somit je nach Aktivierungsgrad des AT2-Rezeptorsystems agonistische bzw. antagonistische Eigenschaften aufweisenden AT2-R-Agonisten CGP-42112A in dieser Arbeit erwähnt. Ob die pharmakologischen Unterschiede der beiden AT2-R-Agonisten allerdings die konträren Befunde erklären können, ist fraglich. In weiteren Studien wurde in transgenen Mäusen, die den in AT2-R kardial überexpressieren, mittels kardialer Magnetresonanztomographie ein kardioprotektiver Effekt des AT2-R beobachtet (Bove et al., 2004 und 2005), wobei aber hier die Unterschiede sowohl des Tiermodells als auch der Methode den direkten Vergleich zu unseren Ergebnissen erschweren.

#### **4.2.3. Einfluss des AT2-R auf den Blutdruck**

Systolische und diastolische Blutdrücke wurden invasiv in den Versuchstieren erfasst und keine signifikanten Differenzen der Blutdruckwerte in den Vergleichsgruppen beobachtet. Damit wurden die Ergebnisse vorhergehender Studien bestätigt, in denen von einem basal nicht oder nur marginal erhöhtem Blutdruck in AT2-R-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen berichtet wurde (Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995). Ob AT2-R-Stimulation mittels CGP-42112A Effekte auf den Blutdruck hat, wurde bislang nicht untersucht. Wir konnten aber zeigen, dass die Kurzzeit-Stimulation mit CGP-42112A über 7 Tage keinen signifikanten Effekt auf den systemischen Blutdruck ausübte.

Vasodilatatorische Eigenschaften des AT<sub>2</sub>-R werden seit langem vermutet, wobei von einer Interaktion des AT<sub>2</sub>-R mit Bradykinin unter Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) und cyclischem Guanosin-3`-5`-Monophosphat (cGMP) berichtet wurde (Bergaya et al., 2004; Abadir et al., 2006). Tatsächlich konnten Siragy und Kollegen zeigen, dass Ang II-Infusionen in AT<sub>2</sub>-R-KO-Mäusen im Gegensatz zu WT-Mäusen zu keinem Anstieg der Bradykinin- und NO-Produktion führte, so dass diese Effektoren möglicherweise die divergente Blutdruckregulation in AT<sub>2</sub>-R-KO-Mäusen erklären könnte (Siragy et al., 1999). Ob die beschriebenen Effekte tatsächlich zu messbaren Veränderungen des systemischen Blutdrucks im Infarktmodell der Maus führen, ist unklar, da wir in AT<sub>2</sub>-R-KO-Mäusen (sowohl in scheinoperierten als auch in infarzierten Mäusen) einen im Trend eher niedrigeren Blutdruck als in WT-Mäusen messen konnten.

#### **4.2.4. Kardiale Fibrose und Expression von TGF- $\beta$**

Wir konnten zeigen, dass es unter der pharmakologischen Stimulation mit dem AT<sub>2</sub>-R-Agonisten CGP-42112A zu einer signifikanten Zunahme kardialer Fibrose (im Nicht-Infarktbereich) im Rahmen des *Remodelings* nach Myokardinfarkt kam. In AT<sub>2</sub>-R-KO-Mäusen waren die fibrotischen Veränderungen nach Myokardinfarkt allerdings vergleichbar ausgeprägt wie die in WT-Mäusen.

Der Einfluss des AT<sub>2</sub>-R auf die Fibrose ist bislang nicht eindeutig geklärt. Vorarbeiten bestätigen allerdings überwiegend den in dieser Arbeit beobachteten Fibrose-induzierenden Effekt des AT<sub>2</sub>-R. So konnten Brilla und Kollegen zeigen, dass Ang II die Kollagensynthese in kardialen Fibroblasten durch sowohl den AT<sub>1</sub>- als auch den AT<sub>2</sub>-R stimuliert (Brilla et al., 1993). Senbonmatsu und Kollegen konnten zeigen, dass eine Stimulation des AT<sub>2</sub>-R die Kollagensynthese steigert (Senbonmatsu et al., 2000). Ichihara und Kollegen beschrieben einen Fibrose-induzierenden Effekt des AT<sub>2</sub>-R im tierexperimentellen Modell der Ang II-vermittelten Hypertonie (Ichihara et al., 2001). Mifune und Kollegen konnten *in vitro* beobachten, dass die pharmakologische Stimulation des AT<sub>2</sub>-R mit CGP-42112A die Kollagensynthese von Fibroblasten stimuliert (Mifune et al., 2000). Tschöpe und Kollegen hingegen fanden trotz vergleichbarer Methodik keine signifikanten Unterschiede im Fibroseausmaß zwischen AT<sub>2</sub>-R-KO- und WT-Mäusen drei Wochen nach Myokardinfarkt (Quantifizierung der Sirius-Rot-Färbung) und begründeten die unterschiedlichen Ergebnisse mit verschiedenen Versuchsmodellen und Fibrorestimuli (Tschöpe et al., 2005).

Zudem war die Zunahme der kardialen Fibrose in CGP-42112A-behandelte Mäusen mit einer verstärkten kardialen mRNA-Expression des pro-fibrotischen TGF- $\beta$  assoziiert. In AT2-R-KO-Mäusen war die Expression von TGF- $\beta$  nicht-signifikant schwächer als in WT-Mäusen. Somit könnte die verstärkte Expression des TGF- $\beta$  in CGP-42112A-behandelten Mäusen möglicherweise die Zunahme der kardialen Fibrose in den so behandelten Mäusen erklären. So beobachteten bereits zahlreiche andere Studien zuvor eine wichtige Rolle von TGF- $\beta$  im Fibrosegeschehen nach Myokardinfarkt (Sun et al., 1998; Chen et al., 2004; Bujak und Frangogiannis, 2007).

#### **4.2.5. Kardiale AT1- und AT2-R-Expression**

Die AT1- und AT2-R-Expression wurden mittels *Real-Time-PCR* bestimmt. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *Sham*-operierten und infarzierten Mäusen. Seit langem ist bekannt, dass myokardiale Ischämie mit einer Aktivierung des RAAS einhergeht (Hirsch et al., 1991; Pfeffer, 1991; Lindpainter et al., 1993; Meggs et al., 1993; Schieffer et al., 1994; Weber, 1997). Vorarbeiten berichteten in diesem Zusammenhang häufig von einer Hochregulation beider Ang II-Rezeptoren, die wir in dieser Arbeit allerdings nicht bestätigen konnten (Meggs et al., 1993; Nio et al., 1995; Volpe et al., 2003). Die meisten Arbeiten verwendeten allerdings als Versuchstier die Ratte und untersuchten zudem nur den in Nagern ubiquitär exprimierten Subtyp a des AT1-R (Meggs et al., 1993; Nio et al., 1995). Zudem war der in dieser Arbeit gewählte Analysezeitpunkt (7 Tage Post-Myokardinfarkt) möglicherweise nicht optimal, um den Einfluss des akuten Infarktgeschehens auf die Regulation der AT1- und AT2-R-Expression am Herzen detektieren zu können.

Des Weiteren fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der AT1-R mRNA-Expression zwischen WT- und AT2-R-KO-Mäusen. Die von Tanaka und Kollegen beschriebene Hochregulation des AT1-R in AT2-R-KO-Mäusen konnte somit in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Tanaka et al., 1999). Schließlich wurden auch keine signifikanten Unterschiede zwischen AT2-R-stimulierten und scheinbehandelten WT-Mäusen hinsichtlich der AT1- und AT2-R mRNA-Expression beobachtet. AT2-R-Stimulation scheint sich somit nicht im Sinne eines positiven oder negativen Feedbackmechanismus auf die Expression der Ang II-Rezeptorsubtypen auszuwirken.

#### 4.2.6. Gefäßwachstum

Erstmals wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen des AT2-R auf das vaskuläre *Remodeling* nach Myokardinfarkt untersucht. Es wurde kein signifikanter Einfluss des AT2-R auf die infarktassoziierte Gefäßneubildung beobachtet. So konnten wir keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Kapillar-, Arteriolen- und Arteriendichte in den verschiedenen versuchsgruppen (WT- vs. AT2-R-KO-Mäuse und CGP-42112A- vs. scheinbehandelte WT-Mäuse) feststellen.

In den Infarktgebieten aller Versuchsgruppen war die Gefäßdichte deutlich höher als in den Nicht-Infarktgebieten ( $P < 0,01$ ). Dieses Ergebnis deckt sich mit der bekannten Erkenntnis, dass ein Myokardinfarkt mit regenerativem Gefäßwachstum, insbesondere im hypoxischen Areal der Infarktzone, einhergeht (Nelissen-Vrancken et al., 1996).

In Vorarbeiten wurde bislang von pro-angiogenetischen, aber auch anti-angiogenetischen Effekten des AT2-R *in vivo* berichtet.

Walther und Kollegen beobachteten einen pro-angiogenetischen Effekt des AT2-R, wobei als *in vivo*-Angiogenese-Assay ein Alginat-Implant-Modell, bei dem tumorzelltragende Alginatkügelchen in das inguinale Fettpolster von AT2-R-KO Mäusen implantiert werden, zum Einsatz kam. In dieser Arbeit zeigte sich zudem im murinen Ischämiemodell am Hinterlauf ein pro-angiogenetischer Effekt des AT2-R *in vivo* (Walther et al., 2003). Einen dagegen anti-angiogenetischen Effekt des AT2-R *in vivo* beobachteten Munzenmaier und Kollegen auf mikrovaskuläre Angiogenese des Cremaster-Muskels der Ratte, ebenso wie Silvestre und Kollegen in einem Modell von operativ induzierter Ischämie der Hinterextremität an WT- und AT2-R-KO-Mäusen (Munzenmaier und Green, 1996; Silvestre et al., 2002). Unsere Ergebnisse hingegen implizieren, dass der AT2-R im Mausmodell des Myokardinfarkts - möglicherweise aufgrund des geringen Expressionsniveaus in vaskulären Endothelzellen - vermutlich keine relevanten Effekte auf die Gefäßneubildung ausübt.

#### 4.2.7. Einfluss des AT2-R auf kardiale Inflammation und die MCP-1-Expression

Das Ausmaß des Inflammationsgeschehens nach Myokardinfarkt wurde in dieser Arbeit immunhistochemisch untersucht. Das Ausmaß der T-Lymphozyteninfiltration des Infarktgebiets war in AT2-R-KO-Mäusen signifikant größer als in WT-Mäusen. Nicht-signifikant unterschiedlich hingegen war das Ausmaß der Monozyten-/Makrophageninfiltration in das Infarktgebiet von AT2-R-KO- im Vergleich zu WT-

Mäusen. Unsere Ergebnisse deuten somit auf einen moderat anti-inflammatorischen Effekt des AT2-R hin, der allerdings nicht in den CGP-42112A-behandelten Mäusen nachvollzogen werden konnte. Dennoch kann vermutet werden, dass pharmakologische AT2-R-Stimulation das Potential hat, anti-inflammatorische Effekte nach Myokardinfarkt zu vermitteln. So wurde berichtet, dass Compound 21-vermittelte AT2-R-Stimulation anti-inflammatorische Effekte im Prozess des Postinfarkt-*Remodelings* ausübt (Kaschina et al., 2008).

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass das auf Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten chemotaktisch und aktivierend wirkende *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) in infarzierten gegenüber *Sham*-operierten Mäusen signifikant hochreguliert wurde. Es ist vielfach beschrieben worden, dass MCP-1 eine wichtige Rolle im linksventrikulären *Remodeling* nach Myokardinfarkt spielt und im ischämischen Myokard der Maus hochreguliert wird (Tarzami et al., 2002; Dewald et al., 2005). Zwischen WT- und AT2-R-KO-Mäusen bzw. zwischen AT2-R-stimulierten und scheinbehandelten WT-Mäusen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Wu und Kollegen hingegen beobachteten *in vivo* und *in vitro* einen hemmenden Effekt des AT2-R auf die MCP-1-Expression. So zeigte sich in AT2-R-KO-Mäusen eine gesteigerte MCP-1-Expression in verletzten Arterien. Zudem führte AT2-R-Stimulation an glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Hemmung der AT1-R-vermittelten MCP-1-Expression (Wu et al., 2001 und 2004). Die genannten Arbeiten unterscheiden sich jedoch erheblich im experimentellen Ansatz zur vorstehenden Arbeit. Des Weiteren werden Chemokine, wie z. B. MCP-1, akut in der frühen, inflammatorischen Phase des *Remodelings* nach Myokardinfarkt (3 bis 72 h) induziert (Frangiogannis, 2006), so dass die in dieser Arbeit gemessenen MCP-1 mRNA-Expression 7 Tage nach Myokardinfarkt möglicherweise nicht repräsentativ für die akuten Expressionsänderungen von MCP-1 am infarzierten Herzen der Maus ist.

## 5. Zusammenfassung

Nach Myokardinfarkt kommt es zu kardiovaskulären Umbauvorgängen, dem sogenannten *Remodeling*. Dieses umfasst unter anderem kardiale Fibrose und Hypertrophie, Inflammation und einen Umbau der Gefäßarchitektur, wobei man hier differenziert zwischen Angiogenese (Sprossen neuer Kapillaren aus präexistenten Blutgefäßen), Arteriogenese (Kollateralerterienwachstum) und Vaskulogenese (stimuliert durch endotheliale Vorläuferzellen). Angiotensin II beeinflusst das *Remodeling* am Herzen über zwei heptahelikale Rezeptoren, den AT1- und den AT2-Rezeptorsubtyp (AT1-R / AT2-R). Die AT2-R-Expression erreicht zu Beginn der murinen Neonatalentwicklung ein Maximum und fällt im adulten Organismus ab. In der kardiovaskulären Pathophysiologie wurde allerdings häufig eine Re-Expression des AT2-R am Herzen beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von AT2-R-Defizienz bzw. der Effekt einer pharmakologischen AT2-R-Stimulation mit dem selektiven AT2-R-Agonisten CGP-42112A auf das kardiovaskuläre *Remodeling* nach experimentellem Myokardinfarkt untersucht. In diesem Zusammenhang wurde die Mortalität der infarzierten Mäuse analysiert und die linksventrikuläre Funktion sowie die Blutdrücke der genetisch veränderten bzw. pharmakologisch behandelten Mäuse im Vergleich zu adäquaten Kontrollgruppen echokardiographisch bzw. mittels invasiver Blutdruckmessung bestimmt. Für histologische Untersuchungen wurden die infarzierten Herzen der Versuchstiere entnommen und die Gefäßdichte, inflammatorische Infiltrate sowie kardiale Fibrose computergestützt quantifiziert. Mittels *Real-Time*-PCR wurde das Expressionsniveau der Ang II-Rezeptoren sowie die Expression des chemotaktisch wirkenden Faktors MCP-1 und des Fibrose-induzierenden Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  untersucht.

Hierbei konnten wir zeigen, dass pharmakologische AT2-R-Stimulation durch den AT2-R-Agonisten CGP-42112A einen schädigenden Einfluss auf das *Remodeling* (Zunahme kardialer Fibrose und Induktion der TGF- $\beta$ -Expression, vermehrte linksventrikuläre Dilatation, erhöhte Lungengewichte als Ausdruck des Linksherzversagens) und das Überleben der Mäuse nach Myokardinfarkt ausübte und somit vermutlich keine therapeutische Option zur Behandlung des Myokardinfarkts darstellt. Im Gegensatz dazu konnten wir keine signifikanten Effekte einer AT2-R-Defizienz auf die untersuchten Parameter der Morbidität und Mortalität nach Myokardinfarkt feststellen, wobei jedoch die 7-Tages Mortalität AT2-R-defizienter

Mäuse entgegen bereits publizierter Studien im Trend niedriger war als die von Wildtyp-Mäusen.

Insbesondere in Anbetracht der breiten Verwendung von AT1-R-Antagonisten, deren Anwendung zu relativer AT2-R-Überaktivierung führt, sind gerade die in dieser Arbeit beobachteten negativen Eigenschaften einer AT2-R-Stimulation nicht nur von wissenschaftlicher sondern möglicherweise auch klinischer Bedeutung. Zur Klärung der eher unklaren pathophysiologischen Bedeutung des AT2-R im kardiovaskulären System ist unserer Ansicht nach daher weitere Forschung erforderlich und wünschenswert.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
ACE	Angiotensin-Conversions-Enzym
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANGPT	Angiopietin
AT1-R	Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1
AT1-R-Antagonist	Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1-Antagonist
AT2-R	Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 2
AT2-R-KO	<i>AT2-R-Knockout</i>
ATIP	<i>AT2-R-Interacting Protein</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
CD 3	<i>Cluster of differentiation molecule 3</i>
CD 31	<i>Cluster of differentiation molecule 31</i>
EPC	endotheliale Progenitorzelle
FS	<i>Fractional Shortening</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible-Factor 1</i>
LVEDD	Linksventrikuläre enddiastolische Fläche
LVESD	Linksventrikuläre endsystolische Fläche
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MKP-1	<i>MAP Kinase Phosphatase-1</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
PDGF-B	<i>Platelet-derived Growth Factor Subunit B</i>
PP2A	<i>Protein Phosphatase 2A</i>
PPAR- $\gamma$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-<math>\gamma</math></i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
RT-PCR	<i>Real-Time-PCR</i>
SHP-1	<i>Src Homology 2 Domain-Containing Protein-Tyrosine Phosphatase</i> 1
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta-<math>\beta</math></i>
uPA	<i>Urokinase-type Plasminogene Activator</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	Wildtyp

## 7. Literatur

Abadir PM, Periasamy A, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension*. 2006; 48:326-22.

Abbas AK, Lichtmann AH. *Cellular and Molecular Immunology* (5th Edition). Herausgeber: Saunders, Philadelphia. 2003.

AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*. 2001; 276:39721-6.

Adachi Y, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara H, Takahashi N, Kawakami R, Nakanishi M, Nakagawa Y, Tanimoto K, Saitoh Y, Yasuno S, Usami S, Iwai M, Horiuchi M, Nakao K. Angiotensin II Type 2 Receptor Deficiency Exacerbates Heart Failure and Reduces Survival After Acute Myocardial Infarction in Mice. *Circulation*. 2003; 107:2406-2408.

Akishita M, Iwai M, Wu L, Zhang, Ouchi Y, Dzau VJ, Horiuchi M. Inhibitory Effect of Angiotensin II Type 2 Receptor on Coronary Arterial Remodeling After Aortic Banding in Mice. *Circulation*. 2000; 102:1684-1689.

Azizi M. Blockade of the renin-angiotensin system by a combination of ACE inhibitors and AT1 receptor antagonists. *Rev Prat*. 2004; 54(11):1167-74.

Azizi M, Bissery A, Lamarre-Cliché M, Ménard J. Integrating Drug Pharmacokinetics for Phenotyping Individual Renin Response to Angiotensin II Blockade in Humans. *Hypertension*. 2004; 43:785-790.

Bell L, Madri JA. Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am J Pathol*. 1990; 137:7-12.

Benndorf RA, Boger RH, Ergun S, Steenpass A, Wieland T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circ Res*. 2003; 93:438-47.

Benndorf RA, Rudolph T, Appel D, Schwedhelm E, Maas R, Schulze F, Silberhorn E, Böger RH. Telmisartan improves insulin sensitivity in nondiabetic patients with essential hypertension. *Metabolism*. 2006; 55(9):1159-64.

Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N,

- Wang J, Avery MA, Kurtz TW. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR $\gamma$ -modulating activity. *Hypertension*. 2004; 43:993–1002.
- Bergaya S, Hilgers RH, Meneton P et al. Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT<sub>2</sub> receptors. *Circ Res*. 2004; 94:1623-9.
- Birkenhager WH, Staessen JA. Dual inhibition of the renin system by aliskiren and valsartan. *Lancet*. 2007; 370:195-196.
- Boot GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*. 1996; 28:635-640.
- Bove CM, Gilson WD, Scott CD, Epstein FH, Yang Z, Dimaria JM, Berr SS, French BA, Bishop SP, Kramer CM. The angiotensin II type 2 receptor and improved adjacent region function post-MI. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2005; 7:459-464.
- Bove CM, Yang Z, Gilson WD, Epstein FH, French BA, Berr SS, Bishop SP, Matsubara H, Carey RH, Kramer CM. Nitric Oxide mediates benefits of angiotensin II type 2 receptor overexpression during post-infarct remodeling. *Hypertension*. 2004; 43:680-685.
- Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard At to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26:657-64.
- Brede M, Roell W, Ritter O, Wiesmann F, Jahns R, Haase A, Fleischmann BK, Hein L. Cardiac hypertrophy is associated with decreased eNOS expression in angiotensin AT<sub>2</sub> receptor-deficient mice. *Hypertension*. 2003; 42:117-1182.
- Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, et al. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblast: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26:809–820.
- Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- $\beta$  signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007; 74:184-95.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000; 6:389-95.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9:653-60.
- Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med*. 2004; 255:538-561.

- Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(9):3652–3656.
- Chassagne C, Adamy C, Ratajczak P, Gingras B, Teiger E, Planus E, Oliviero P, Rappaport L, Samuel JL, Meloche S. Angiotensin II AT(2) receptor inhibits smooth muscle cell migration via fibronectin cell production and binding. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 282:C654-64.
- Chen K, Mehta JL, Li D, Joseph L, Joseph J. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res*. 2004; 95(12):1167-73.
- Chen XL, Tummala E, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1998; 83:952-9.
- Cleutjens JP, Verluyten, MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*. 1995; 147:325-338.
- Cotton, J. M., M. R. Thomas, B. J. Dunmore, J. Salisbury, A. M. Shah, and N. P. Brindle. Angiogenesis in chronically ischaemic human heart following percutaneous myocardial revascularisation. *Heart*. 2002; 87:281-3.
- Cui TX, Nakagami H, Nahmias C, Shiuchi T, Takeda-Matsubara Y, Li JM, Wu L, Iwai M, Horiuchi M. Angiotensin II subtype 2 receptor activation inhibits insulin-induced phosphoinositide 3-kinase and Akt and induces apoptosis in PC12W cells. *Mol Endocrinol*. 2002; 16:2113-23.
- D'Amore A, Black J, Thomas W. The AT2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize AT1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension*. 2005; 46:1347–1354.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52:415-472.
- Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*. 2005; 96:881-9.

- Diet F, Pratt RE, Berry GJ, et al. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 1996; 94:2756±2767.
- Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res.* 1997; 81:970-6.
- Dor, Y., V. Djonov, R. Abramovitch, A. Itin, G. I. Fishman, P. Carmeliet, G. Goelman, and E. Keshet. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *Embo J.* 2002; 21:1939-47.
- Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10:262-7.
- Eger E. Isoflurane: a review. *Anesthesiology.* 1981; 55:559-576.
- Ereso AQ, Ramirez RM, Sadjadi J, Cripps MW, Cureton EL, Curran B, Victorino GP. Angiotensin II type 2 receptor provides an endogenous brake during inflammation-induced microvascular fluid leak. *J Am Coll Surg.* 2007; 205:527-33.
- Fabre JE, Rivard A, Magner M, Silver M, Isner JM. Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation.* 1999; 99:3043-3049.
- Falcon BL, Veerasingham SJ, Sumners C, Raizada MK. Angiotensin II Type 2 Receptor-Mediated Gene Expression Profiling in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Hypertension.* 2005; Apr;45(4):692-7.
- Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest.* 1978; 73:843-849.
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage. Urban & Fischer, München • Jena, 2001; S:479 (U. Förstermann).
- Frangiogannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002; 53:31-47.
- Frangiogannis NG. The Mechanistic Basis of Infarct Healing. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8:11-12.

- Gao X-M, Dart AM, Dewar E, Jennings G, Du X-J. Serial echocardiographic assessment of leftventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res.* 2000; 45:330-338.
- Gradmann AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP. Aliskiren, a Novel Orally Effective Renin Inhibitor, Provides Dose-Dependent Antihypertensive Efficacy and Placebo-Like Tolerability in Hypertensive Patients. *Circulation.* 2005; 111:1012-1018.
- Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem.* 1979; 27:1131-9.
- Guilluy C, Rolli-Derkinderen M, Loufrani L, Bourgé A, Henrion D, Sabourin L, Loirand G, Pacaud P. Ste20-related kinase SLK phosphorylates Ser188 of RhoA to induce vasodilation in response to angiotensin II Type 2 receptor activation. *Circ Res.* 2008; 102:1265-74.
- Hanh AW, Jonas U, Buhler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett* 1994; 347:178±180.
- Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y, Komuro I. Angiotensin II Type 1A Receptor Knockout Display Less Ventricular Remodeling and Improved Survival After Myocardial Infarction. *Circulation.* 1999; 100:2093-20.
- Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med.* 2006; 10:45-55.
- Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283:H2411-H2419.
- Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. *Nature.* 1995; 377:744-747.
- Henrion D, Kubis N, Lévy BI. Physiological and Pathophysiological Functions of the AT2 Subtype Receptor of Angiotensin II: From Large Arteries to the Microcirculation. *Hypertension.* 2001; 38:1150-1157.

- Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, et al. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin-converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res.* 1991; 69:475-82.
- Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology.* 1982; 128(3):1221-1228.
- Hoch NE, Guzik TJ, Chen W, Deans T, Maalouf SA, Gratzke P, Weyand C, Harrison DG. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 296(2):R208-16.
- Horiuchi M, Akishita, Dzau VJ. Recent Progress in Angiotensin II Type 2 Receptor Research in the Cardiovascular System. *Hypertension.* 1999; 33:613-621.
- Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29:577-580.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29(4): 577-580.
- Hutchins GM and Bulkley BH. Infarct expansion versus expansion: two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1978; 41:1127-3
- Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E Jr, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation.* 2001; Jul 17;104(3):346-51.
- Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E Jr, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Target deletion of angiotensin II type 2 receptor caused cardiac rupture after acute myocardial infarction. *Circulation.* 2002;106:2244-2249.
- Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 1995; 377:748-50.
- Ichiki T. Role of Renin Angiotensin System in Angiogenesis: It Is Still Elusive. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2004; 24:622-624.
- Isbell DC, Voros S, Yang Z, DiMaria JM, Berr SS, French BA, Epstein FH, Bishop SP, Wang H, Roy RJ, Kemp BA, Matsubara H, Carey RM, Kramer CM. Interaction

- between bradykinin subtype 2 and angiotensin II receptors during post-MI left ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293:H3372-H3378.
- ISIS-4 (Fourth International Study of Infant Survival) Collaborative Group. A randomized factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate and intravenous magnesium sulphate in over 58050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet*. 1995; 345:669-685.
- Ismail JA, Poppa V, Kemper LE, Scatena M, Giachelli CM, Coffin JD, Murry CE. Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardiovascular Pathology*. 2003; 12(2):82-90.
- Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*. 1992; 148:2423-2428.
- Jurewicz M, McDermott DH, Sechler JM, Tinckam K, Takakura A, Carpenter CB, Milford E, Abdi R. Human T and Natural Killer Cells Possess a Functional Renin-Angiotensin System: Further Mechanisms of Angiotensin II-Induced Inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18:1093–1102.
- Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Amano K, Iba O, Imada T, Iwasaka T. Improvement of Collateral Perfusion and Regional Function by Implantation of Peripheral Blood Mononuclear Cells Into Ischemic Hibernating Myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:1804-1810.
- Kang K-H, Park S-Y, Rho SB, Lee J-H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008; 79:150-60.
- Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation: A Novel Option of Therapeutic Interference With the Renin-Angiotensin System in Myocardial Infarction? *Circulation*. 2008; 118:2523 – 2532.
- Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL. Cell Type-Specific Regulation of Angiogenic Growth Factor Gene Expression and Induction of Angiogenesis in Nonischemic Tissue by a

- Constitutively Active Form of Hypoxia-Inducible Factor 1. *Circ Res.* 2003; 93:1074-1081.
- Kintscher U, Wakino S, Kim S, Fleck E, Husch WA, Law RE. Angiotensin II induces migration and Pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes. *Hypertension.* 2001; 37:587-593.
- Kou B, Vatish M, Singer DR. Effects of angiotensin II on human endothelial cells survival signalling pathways and its angiogenic response. *Vascul Pharmacol.* 2007; 47:199-208.
- Kurisu S, Ozono R, Oshima T, Kambe M, Ishida T, Sugino H, Matsuura H, Chayama K, Teranishi Y, Iba O, Amano K, Matsubara H. Cardiac Angiotensin II Type 2 Receptor Activates the Kinin/NO System and Inhibits Fibrosis. *Hypertension.* 2003; 41:99-107.
- Lévy BI. Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin–angiotensin system. *Circulation.* 2004; 109:8–13.
- Lévy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens.* 2005; 18:134S-141S.
- Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Okumura K, Murohara T. Role of Bradykinin, Nitric Oxide, and Angiotensin II Type 2 Receptor in Imidapril-Induced Angiogenesis. *Life Sci.* 2008; 80:82-88.
- Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by angiotensin II. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2000; Dec;22(10):709-23.
- Lindpainter K, Lu W, Niedermajer N, Schieffer B, Just H, Ganten D, Drexler H. Selective Activation of Cardiac Angiotensinogen Gene Expression in Post-infarction Ventricular Remodeling in the Rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1993; 25: 133-143.
- Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation.* 2004; 109(22):2692-7.
- Lukacs NW, Chensue SW, Karpus WJ, Lincoln P, Keefer C, Strieter RM, Kunkel SL. C-C chemokines differentially alter interleukin-4 production from lymphocytes. *Am J Pathol.* 1997; 150:1861-1868.

- Lutgens E, Daemen MJAP, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JFM. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional change. *Cardiovasc Research*. 1999; 41(3):586-593.
- Macari D, Bottari SP, Whitebread S, De Gasparo M, Levens N. Renal actions of the selective angiotensin AT2 receptor ligands CGP 42112B and PD 123319 in the sodium-depleted rat. *Eur J Pharmacol*. 1993 ;249 :85-93.
- Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso I, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Alessandra B, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*. 2005; 105:199-206.
- Matsubara H. Pathophysiological Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Cardiovascular and renal Diseases. *Circ. Res*. 1998; 83:1182-1191.
- Meggs LG, Coupet J, Huang H, Cheng W, Li P, Capasso JM, Homcy CJ, Anversa P. Regulation of angiotensin II receptors on ventricular myocytes after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 1993; 72:1149-1162.
- Mehta PK and Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 292: C38-C97.
- Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1995; 269:H2147-H2154.
- Mifune M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, et al. Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2000; 36:845– 850.
- Müller P, Flesch G, de Gasparo M, Gasparini M, Howald H. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the angiotensin II antagonist valsartan at steady state in healthy, normotensive subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1997; 52 :441-449.
- Munk VC, Sanchez de Miguel L, Petrimpol M, Butz N, Banfi A, Eriksson U, Hein L, Humar R, Battagay EJ. Angiotensin II Induces Angiogenesis in the Hypoxic Adult Mouse Heart In Vitro Through an AT2-B2 Receptor Pathway. *Hypertension*. 2007; 49:1178-1185.

- Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*. 1996; 27:760-765.
- Nadal JA, Scicli GM, Carhini LA, Scicli AG. Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282:H739-48.
- Nelissen-Vrancken HJMG, Debets JJM, Snoeckx LHEH, Daemen MJAP, Smits JFM. Time-Related Normalization of Maximal Coronary Flow in Isolated Perfused Hearts of Rats With Myocardial Infarction. *Circulation*. 1996; 93: 349-355.
- Newman, P. J. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*. 1997; 99:3-8.
- Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell signal*. 2002; 14:381-95.
- Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of Gene Transcription of Angiotensin II Receptor Subtypes in Myocardial Infarction. *J. Clin. Invest*. 1995; 95:46-54.
- Nissen SE. Angiotensin-receptor blockers and cancer: urgent regulatory review needed. *Lancet Oncol*. 2010
- Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di Benedetto M, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud PO, Nahmias C. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem*. 2004; 279:28989-97.
- Oishi Y, Ozono R, Yano Y, Teranishi Y, Akishita M, Horiuchi M, Oshima T, Kambe M. Cardioprotective Role of AT2 Receptor in Postinfarction Left Ventricular Remodeling. *Hypertension*. 2003; 41:814-818.
- Oishi Y, Ozono R, Yoshizumi M, Akishita M, Horiuchi M, Oshima T. AT2 receptor mediates the cardioprotective effects of AT1 receptor antagonist in post-myocardial infarction remodeling. *Life Sci*. 2006; 80(1):82-8.

- Oparil S, Yarows SA, Patel S, Fang H, Zhang J, Satlin A. Effective and safety of combined use of lisinopril and valsartan in patients with hypertension: a randomised, double-blind trial. *Lancet*. 2007; 370:221-229.
- Ozono R, Matsumoto T, Shingu T, Tetsuya O, Yasuhiro T, Kambe M, Masuura H, Kajiyama, Wang Z, Moore AF, Carey RM. Expression and localization of angiotensin subtype receptor proteins in the hypertensive rat heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 278:R781-R789.
- Parums, D. V., J. L. Cordell, K. Micklem, A. R. Heryet, K. C. Gatter, and D. Y. Mason. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol*. 1990; 43:752-7.
- Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1998; 275:H1812-1820.
- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1991; 260:H1406-1414.
- Pfeffer JM. Progressive ventricular dilation in experimental myocardial infarction and its attenuation by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol*. 1991; 68:17D-25D.
- Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ Jr, Cuddy TE, Davis BR, on behalf of the SAVE Investigators. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: results of the Survival and Ventricular Enlargement Trial. *N Engl J Med*. 1992; 327:669-677.
- Pfeffer MA. Left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Cardiologia*. 1994; 39:25-6.
- Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990; 81:1161-1172.
- Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM. Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial Investigators. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by

- heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med.* 2003; 348:1893-1906.
- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1991; 260:H1406-14.
- Rakusan K, Chvojkova Z, Oliviero P, Ostadalova I, Kolar F, Chassagne C, Samuel JL, Ostadal B. ANG II type 1 receptor antagonist irbesartan inhibits coronary angiogenesis stimulated by chronic intermittent hypoxia in neonatal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292(3):H1237-44.
- Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularisation and regeneration. *Nat Med.* 2003; 9(6):702-12.
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000; 275:26765-71.
- Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci.* 2006; 31:342-8.
- Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development.* 2005; 19:2199-2211.
- Sasaki K, Murohara T, Ikeda H, Sugaya T, Shimada T, Shintani S, Imaizumi T. Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest.* 2002; 109:603-611.
- Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M, Seitz S, Holtz J, Riede UN, Drexler H. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 1994; 89:2273-2282.
- Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  activity. *Circulation.* 2004; 109:2054–2057.
- Schwabe U, Paffrath D (Hrsg). Anlauf M (Autor). *Arzneimittelverordnungs-Report 2009.* S.203-230. Springer Verlag

- Semenza GL. Vasculogenesis, Angiogenesis, and Arteriogenesis: Mechanisms of Blood Vessel Formation and Remodeling. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007; 102:840-847.
- Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price E jr, Roberts RL, Imboden H, Fitzgerald TG, Gaffney FA, Inagami T. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *The EMBO Journal*. 2003; 22:6471-6482.
- Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E Jr, Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest*. 2000; 106:R25-R29.
- Silvestre JS, Tamarat R, Senbonmatsu T, Ichiki T, Ebrahimian T, Iglarz M, Besnard S, Duriez M, Inagami T, Levy BI. Antiangiogenic Effect of Angiotensin II Type 2 Receptor in Ischemia-Induced Angiogenesis in Mice hindlimb. *Circ. Res*. 2002; 90:1072-1079.
- Siragy HM, Inagami T, Ichiki T, Carey RM. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT2) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:6506-10.
- Skalli, O., P. Ropraz, A. Trzeciak, G. Benzonana, D. Gillessen, and G. Gabbiani. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*. 1986; 103:2787-96.
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest*. 1995; 95:651-7.
- Strauss MH and Hall AS. Angiotensin Receptor Blockers May Increase Risk of Myocardial Infarction: Unraveling the ARB-MI Paradox. *Circulation*. 2006; 114:838-854.
- Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Ramires FJ. Angiotensin II, Transforming Growth Factor- $\beta$  1 and Repair in the Infarcted Heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30:1559-69.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow derived endothelial progenitor cells for neovascularisation. *Nature America*. 1999; 5:434-438.

- Tanaka M, Tsushida S, Imai T, Fujii N, Miyazaki H, Ichiki T, Naruse M, Inagami T. Vascular response to angiotensin II is exaggerated through an upregulation of AT1 receptor in AT2 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 258:194-98.
- Tarzami ST, Cheng R, Miao W, Kitsis RN, Berman JW. Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34:209-21.
- Tea BS, Sarkissian SD, Touyz RM, Hamet P, DeBlois D. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension.* 2000; 35:1069-1073.
- The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection and congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1991; 325:293-302.
- Tschöpe C, Westermann D, Dhayat N, Dhayat S, Altmann C, Steendijk P, Schultheiss HP, Walther T. Angiotensin AT2 receptor deficiency after myocardial infarction: its effects on cardiac function and fibrosis depend on the stimulus. *Cell Biochem Biophys.* 2005; 43(1):45-52.
- Volpe M, Musumeci B, de Paolis P, Savoia C, Morganti A. Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens.* 2003; 21:1429-1443.
- Walther T, menrad A, Orzechowski H-D, Siemeister G, Paul M, Schirner M. Differential regulation of in vivo angiogenesis by angiotensin II receptors. *The FASEB Journal.* 2003; 17:2061:2067.
- Weber KT, Brilla CG. Pathological Hypertrophy and Cardiac Interstitium: Fibrosis and Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Circulation.* 1991; 83:1849-1865.
- Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circ Res.* 1997; 96:4065–4082.
- Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens.* 1999; 12:205S-213S.
- Werry TD, Christopoulos A, Sexton PM. Mechanisms of ERK-1/2 regulation by seven-transmembrane-domain receptors. *Curr Pharm Des.* 2006; 12:1683-702.
- WHO. The Atlas of heart disease and stroke. Geneva: World Health Organization, 2004.

- Widdop RE, Jones ES, Hannan RE, Gaspari TA. Angiotensin AT2 receptors : cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol.* 2003; 140:809-824.
- Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 2003; 93: P3–P13
- Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 163(1):284-91.
- Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol.* 1994; Sep-Oct;89(5):397-410.
- Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Scheffe JH, Kruse ML, Stoll M, Unger T. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:57-64.
- Wu L, Iwai M, Nakagami H, Li Z, Chen R, Suzuki J, Akishita M, de Gasparo M, Horiuchi M. *Circulation.* 2001; 104:2716-2721.
- Wu L, Iwai M, Li Z, Shiuchi T, Min LJ, Cui TX, Li JM, Okumura M, Nahmias C, Horiuchi M. Regulation of inhibitory protein-kappaB and monocyte chemoattractant protein-1 by angiotensin II type 2 receptor-activated Src homology protein tyrosine phosphatase-1 in fetal vascular smooth muscle cells. *Mol Endocrinol.* 2004; Mar18(3):666-78.
- Xu J, Carretero OA, Liu YH, Shesely EG, Yang F, Kapke A, Yang XP. Role of AT2 receptors in the cardioprotective effect of AT1 antagonists in mice. *Hypertension.* 2002; 40:244-250.
- Yamada H, Akishita M, Horiuchi M. Regulation of vascular development and differentiation by angiotensin II type 2 receptor. *Circulation.* 1997; 96:I-2668.
- Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci.* 1998; 63:289-295.

Zolotareva AG, Kogan ME. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa*. 1978; 20:308-314.

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen danke ich für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Rainer Böger für die Aufnahme in seinen Arbeitsbereich und die Überlassung des Themas.

Ein ganz besonderes Wort des Dankes möchte ich an Herrn Prof. Dr. med. Ralf Benndorf richten für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und geduldige Unterstützung. Auch für die mühevoll abschließende Durchsicht möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere denen des Arbeitsbereiches Klinische Pharmakologie, für deren freundlichen und hilfsbereiten Umgang.

Schließlich möchte ich in diesem Zusammenhang meiner Familie und insbesondere meinen Eltern meinen ganz besonderen Dank aussprechen, ohne deren Unterstützung ich mein Studium und diese Arbeit hätte niemals verwirklichen können.

## 9. Lebenslauf

**Name** Martha Maria Kirstein, \*14. Januar 1984 in Gdingen (Polen)

### Schulbildung

1990 - 1994 Heinrich-Wolgast-Schule in Hamburg

1994 - 2003 Gymnasium Klosterschule in Hamburg mit Abitur im Jahre 2003

### Hochschulausbildung

2003 - 2009 Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

12/2009 Approbation als Ärztin

### Berufstätigkeit

Seit 03/2010 Assistenzärztin an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover

### Beginn der Dissertation

Seit 2007 „Der Einfluss des Angiotensin II-Rezeptorsubtyps 2 auf das kardiovaskuläre *Remodeling* nach experimentellem Myokardinfarkt“ am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

### Publikation

03/2010 Benndorf RA, Kirstein M, Biermann D, et al., Effect of AT2 receptor deficiency as well as pharmacological AT2 receptor stimulation on myocardial infarction-associated morbidity and mortality. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55 (10A)

Hamburg, den 13.09.2010

Martha Maria Kirstein

## **10. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel, nicht benutzt und, die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen, einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes, kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt, oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Martha Maria Kirstein