

Aus dem Institut Experimental and Clinical Research Center (ECRC)  
und der Medizinischen Klinik m.S. Nephrologie und Internistische  
Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Selektivität und Vermittlung des myogenen  
Tonus am Angiotensin II Typ-1-Rezeptor in der perfundierten  
Mausniere

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sophie Nickel

aus Ludwigsfelde, Deutschland

Datum der Promotion: 03.03.2023

# Vorwort

## Veröffentlichungen im Rahmen der Promotionsarbeit

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Cui, Y., Kassmann, M., Nickel, S., Zhang, C., Alenina, N., Anistan, Y. M., Schleifenbaum, J., Bader, M., Welsh, D. G., Huang, Y. & Gollasch, M. (2020). Myogenic Vasoconstriction Requires Canonical G<sub>q</sub>/11 Signaling of the Angiotensin II Type 1a Receptor in the Murine Vasculature. *bioRxiv*, 2020.09.09.289280. <https://doi.org/10.1101/2020.09.09.289280>

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	VIII
Abstract .....	IX
1. Einleitung .....	1
Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und die Angiotensin-Rezeptor- vermittelte Signaltransduktion .....	1
AT1a-Rezeptoren .....	2
Funktionelle Selektivität an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren .....	5
Myogener Tonus.....	8
Fragestellung.....	9
2. Material und Methodik .....	9
Chemikalien und Lösungen .....	9
Versuchstiere und Präparierung .....	10
Polymerasekettenreaktion (PCR).....	12
Perfusion der isolierten Nieren.....	12
Statistische Auswertung.....	15
Einhaltung wissenschaftliche Richtlinien.....	15
3. Ergebnisse .....	15
Die Vermittlung des myogenen Gefäßtonus über den klassischen $G_{q/11}$ -Signalweg des AT1aR.....	15
Die Rolle des AT1bR in der Vermittlung des myogenen Tonus.....	20
4. Diskussion.....	23
Zusammenfassung .....	23
Schlüsselrolle des AT1aR als Mechanosensor .....	26
Der kanonische $G_{q/11}$ - Signalweg des AT1aR bewirkt den myogenen Gefäßtonus in der Niere .....	27

Funktioneller Agonismus als vielversprechender Therapieansatz .....	29
5. Literaturverzeichnis .....	31
6. Eidesstattliche Versicherung .....	40
7. Anteilserklärung an erfolgter Publikation .....	41
8. Lebenslauf .....	42
9. Danksagung .....	43

## Abkürzungsverzeichnis

7TMR	7-Transmembrandomänenrezeptor
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Ang	Angiotensin
AP2	Clathrin-Adapter-Komplex
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Blocker
ARDS	akutes Lungenversagen
AT1aR	Angiotensin II Typ-1a-Rezeptor
AT1bR	Angiotensin II Typ-1b-Rezeptor
AT1R	Angiotensin-1-Rezeptor
AT2R	Angiotensin-2-Rezeptor
BAC	künstliches Bakterienchromosom
BAD	BCL2-assoziierten Agonisten des Zelltods
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
DAG	Diacylglycerin
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Östrogenrezeptor
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
JAK	Janus-Kinase
MAP	arterieller Mitteldruck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MLC	Myosin-Leichtketten
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MNK1	MAPK-interagierende Serin/Threonin-Kinase 1
NF-κB	kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKB/ Akt	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phosphoinositidphospholipase C

RGS2	Regulator des G-Protein-Signalwegs-2
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Ryr2	Ryanodine-Typ-2- Rezeptor-Gen
S II	Sar, Ile -Angiotensin II
SMMHC	Glattmuskelzell-Myosinschwerkette
STAT-Proteine	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TRV027	Trevena 120027
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische AT1aR-Signaltransduktion.....	7
Abbildung 2: SMMHC-CreER: Transgenes Mausmodell .....	11
Abbildung 3: Versuchsaufbau Nierenperfusion.....	14
Abbildung 4: Gefäßregulation in <i>Agtr1a</i> <sup>-/-</sup> .....	17
Abbildung 5: Gefäßregulation in <i>Agtr1a</i> <sup>-/-</sup> , Sar-Ile II. ....	18
Abbildung 6: Gefäßregulation mit Gα <sub>q/11</sub> -Inhibitor FR900359.....	19
Abbildung 7: Gefäßregulation in <i>Agtr1b</i> <sup>-/-</sup> .....	21
Abbildung 8: Gefäßregulation in SMMHC– <i>Agtr1a</i> <sup>-/-</sup> x <i>Agtr1b</i> <sup>-/-</sup> .....	22
Abbildung 9: Gefäßregulation in SMMHC– <i>Agtr1a</i> <sup>-/-</sup> .....	25
Abbildung 10: Vermittlung des myogenen Tonus .....	28

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die Angiotensin II-Typ-1-Rezeptoren (AT1R) sind 7-Transmembran- und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mechanisch aktiviert werden können. Der native Agonist Angiotensin II (Ang II) stimuliert sowohl den klassischen G-Protein-abhängigen als auch den alternativen  $\beta$ -Arrestin-2-vermittelten Weg, während der funktionell selektive Agonist Sar, Ile-Angiotensin II (S II) nur den alternativen Weg aktiviert. Diese funktionelle Selektivität verspricht vorteilhafte therapeutische Effekte bei kleinem Nebenwirkungsspektrum gegenüber dem konventionellen Rezeptoragonismus. Der myogene Tonus ist die angeborene, autoregulatorische Fähigkeit kleiner Arterien – insbesondere der Arteriolen – sich bei steigendem Perfusionsdruck zu kontrahieren oder bei sinkendem Perfusionsdruck zu erweitern, um die Organperfusion konstant zu halten, ohne dass das autonome Nervensystem aktiviert wird.

**Fragestellung:** In dieser Studie wurde anhand verschiedener muriner Tiermodelle die Hypothesen untersucht, ob 1) der Angiotensin II Typ-1a-Rezeptor der vorherrschende Rezeptorsubtyp bei der Regulation des myogenen Gefäßtonus ist und ob 2) der myogene Tonus über den klassischen  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten und/oder den alternativen  $\beta$ -Arrestin vermittelten Signalweg vermittelt wird.

**Methoden:** *Agtr1a*<sup>+/+</sup>, *Agtr1a*<sup>-/-</sup> und Tamoxifen-induzierbare glatte Muskelzell-spezifische Einzel- oder Doppel-Knockout-Mäuse (*SMMHC-Agtr1a*<sup>-/-</sup>  $\times$  *Agtr1b*<sup>-/-</sup>) wurden für die isolierte Nierenperfusion verwendet, um Unterschiede des Perfusionsdrucks in den jeweiligen Gruppen zu messen und diese in Relation zu setzen. Um eine Beteiligung der untersuchten Signaltransduktionswege beurteilen zu können, wurden Substanzen wie der native Agonist Ang II, der funktionell selektive Agonisten S II und der  $G_{q/11}$ -Inhibitor FR900359 verwendet.

**Ergebnisse:** Die myogene und Ang II-abhängige Vasokonstriktion waren unauffällig in der perfundierten Niere von *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Mäusen, jedoch vermindert in perfundierten Nieren von *Agtr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen. Der selektive  $G_{q/11}$ -Inhibitor verringerte den myogenen Tonus und die Ang II-abhängige Vasokonstriktion, während der  $\beta$ -Arrestin-abhängige Ligand S II keinerlei Wirkung auf den Perfusionsdruck zeigte.

**Schlussfolgerung:** Mechanisch aktivierte AT1aR vermitteln die myogene Autoregulation in perfundierten Nierenarterien über kanonische  $G_{q/11}$ -Signalwege.

## Abstract

**Background:** The AT1 receptors are seven-transmembrane- and well described mechano-activated G-Protein-coupled receptors. The balanced agonist Angiotensin II (Ang II) stimulates both the classical G-protein-dependent pathway and the alternative  $\beta$ -arrestin-2 pathway, whereas the biased agonist Sar, Ile-Angiotensin II (S II) only activates the alternative pathway. This selective activation promises beneficial therapeutic effects, with a small spectrum of side effects, compared to conventional agonism. The myogenic tone is an inherent, auto-regulatory ability of small arteries – especially of the arterioles – to contract in response to increasing perfusion pressure or to dilate in response to decreasing perfusion pressure to maintain constant organ perfusion without activating the autonomic nervous system.

**Question:** This study used various murine animal models to investigate the hypotheses of 1) whether the Angiotensin II type 1a receptor is the predominant receptor subtype in the regulation of myogenic vascular tone and 2) whether myogenic tone is elicited via the classical  $G_{q/11}$ -protein-coupled and/or the alternative  $\beta$ -arrestin-mediated signalling pathway.

**Methods:** *Agtr1a*<sup>+/+</sup>, *Agtr1a*<sup>-/-</sup> and tamoxifen-inducible smooth muscle cell-specific single or double knockout mice (*SMMHC*–*Agtr1a*<sup>-/-</sup>  $\times$  *Agtr1b*<sup>-/-</sup>) were used for the perfusion of isolated kidneys to measure differences in perfusion pressure in the respective groups and to relate them to each other. In order to assess the involvement of the signal transduction pathways studied, we used compounds such as the native agonist angiotensin II, the functionally selective agonist Sar, Ile- Ang II and the  $G_{\alpha q/11}$  inhibitor FR900359.

**Results:** Myogenic and Ang II-dependent vasoconstriction was normal in perfused kidneys of *Agtr1b*<sup>-/-</sup> mice but fell in *Agtr1a*<sup>-/-</sup> mice. The  $G_{\alpha q/11}$  blocker reduced myogenic tone and Ang II-dependent vasoconstriction, whereas the  $\beta$ -arrestin-biased agonist S II had no effect.

**Conclusion:** Mechano-activated AT1aR mediate myogenic autoregulation in perfused renal arteries via canonical  $G_{q/11}$  signalling pathways.

# 1. Einleitung

## Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und die Angiotensin-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Die Niere ist ein lebenswichtiges Organ, welche für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen sowie die Regulation des Säure-Basen-Haushalts und der Elektrolyte (Kasper et al., 2016) verantwortlich ist. Sie ist neben der Leber an der Gluconeogenese beteiligt, ist Zielorgan sowie Bildungsort verschiedener Hormone und an der Blutdruckregulation beteiligt (Silbernagl et al., 2010).

Das proteolytische Enzym Renin, welches von Zellen des juxtaglomerulären Apparats in der Niere synthetisiert wird, steuert die Synthese von Angiotensin II (Ang II). Renin spaltet Angiotensin I (Ang I) aus Angiotensinogen (Atlas, 2007), welches wiederum im Anschluss durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) zu Ang II gespalten wird. Dieses Peptidhormon spielt eine wichtige Rolle für die Regulation von Elektrolythaushalt und Blutdruck (Sparks et al., 2014).

Ang II entfaltet seine Wirkung über zwei mögliche Subtypen aus der Familie der 7-Transmembrandomänenrezeptoren (7TMR), dem Angiotensin II Typ-1-Rezeptor (AT1R) und dem Angiotensin II Typ-2-Rezeptor (AT2R), denen gegensätzliche Wirkungsweisen zugeschrieben werden (Porrello et al., 2009; Turu et al., 2019). AT2R wirken vorwiegend wachstumshemmend und apoptotisch (Iriki et al., 1976) über die Aktivierung von G<sub>i</sub>-Proteinen und Tyrosin-Phosphatasen (Porrello et al., 2009). AT2R sind vor allem in Geweben von Feten und Neonaten stark exprimiert, wohingegen sie bei Erwachsenen spärlich vertreten sind (Iriki et al., 1976). Der AT1R hingegen ist vornehmlich an der Entstehung von Gefäßpathologien im Zusammenhang mit arteriellem Hypertonus beteiligt (Sparks et al., 2011; Violin & Lefkowitz, 2007).

Ang II wirkt vasokonstriktorisch auf glatte Muskelzellen in Blutgefäßen und induziert die Freisetzung von Vasopressin in der Neurohypophyse und von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Es wirkt damit blutdrucksteigernd (Balakumar & Jagadeesh, 2014; Silbernagl et al., 2010) und ist somit möglicher Angriffspunkt für medikamentöse Therapien (Gomes et al., 2016; Zou et al., 2004).

Der Mensch besitzt nur eine Form des AT1R, wohingegen bei Nagern zwei Rezeptorisoformen bekannt sind, die auf zwei verschiedenen Genen basieren (Hercule et al., 2007; Iwai & Inagami, 1992; Madhun et al., 1993). Das Gen „*Agtr1a*“ codiert für den

Angiotensin II Typ-1a-Rezeptor (AT1aR), das „*Agtr1b*“-Gen für den Angiotensin II Typ-1b-Rezeptor (AT1bR) (Oliverio et al., 1998). Hierbei unterscheiden sich die Rezeptorexpression je nach Gewebe: in kardiovaskulärem Gewebe wird vor allem der AT1aR exprimiert. In der Nebenniere und im Hypophysenvorderlappen dominieren die AT1bR (Guo et al., 2001; Ito et al., 1995).

## **AT1a-Rezeptoren**

Die Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 gehören zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren, welche mit G-Proteinen interagieren, die der  $G_{q/11}$ -Familie angehören (Ahn, Wei, et al., 2004). Sie sind an einer Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen beteiligt, die über eine Rezeptoraktivierung vermittelt werden. Gut erforscht ist der sogenannte „klassische“, G-Protein vermittelte Weg.

Hierbei sind der Rezeptor und der G-Protein-Komplex im inaktiven Zustand nicht miteinander, sondern mit der Membran assoziiert. Wird der AT-Rezeptor durch einen Agonisten aktiviert, bindet dieser an den G-Protein-Komplex, und führt zur Abspaltung von Guanosindiphosphat (GDP) (Benovic & Keen, 2004). Der nun freie Rezeptor-Protein-Komplex besitzt eine erhöhte Affinität für Guanosintriphosphat (GTP), welches am G-Protein bindet. Dies führt zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in eine  $\alpha$ - und eine  $\beta\gamma$ -Untereinheit (Lin & Smrcka, 2011), die fortan Enzyme, wie beispielsweise die Phosphoinositidphospholipase C (auch Phospholipase C, PLC  $\beta$ ) aktivieren kann (Hamm, 1998; Svoboda et al., 2004). Die Phospholipase C wiederum spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat ( $PIP_2$ ) in die „Second Messenger“ Moleküle Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) (Rakesh et al., 2010).  $IP_3$  verursacht über eine Bindung an den  $IP_3$ -Rezeptor einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und führt zu einer Veränderung des Zellstoffwechsels (Hanson et al., 2004). DAG kann in Verbindung mit Calciumionen ( $Ca^{2+}$ ) gemeinsam die Proteinkinase C (PKC) aktivieren, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt. Weiterhin kommt es zur Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Insulinrezeptor), des nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) und von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Balakumar & Jagadeesh, 2014; Zimnol et al., 2017). Diese begünstigen die Expression proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren (Balakumar & Jagadeesh, 2014). In Abbildung 1 ist der „klassische Weg“ der  $G_{q/11}$ -Rezeptoraktivierung noch einmal schematisch dargestellt.

Ein weiterer Pfad der Signaltransduktion nach Aktivierung des AT1-Rezeptors läuft über sogenannte „Mitogen-aktivierte Proteinkinasen“ (MAPK) wie die extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK) 1 / 2 (Ahn, Shenoy, et al., 2004; Balakumar & Jagadeesh, 2014). Darüber hinaus kann durch Ligandenbindung am AT1-Rezeptor eine Assoziation des C-Terminus des AT1-Rezeptors mit der Janus-Kinase (JAK) 2 erfolgen, welches die Mobilisation der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT-Proteine) in den Zellkern bewirkt und eine Aktivierung des Jak2-STAT3-Signalwegs auslösen kann (Balakumar & Jagadeesh, 2014; Zou et al., 2004). AT1R sind ebenfalls in der Lage an  $G\alpha_{i/o}$ - und  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine zu koppeln und Signalkaskaden über die Inhibition der Adenylatzyklase, die Aktivierung der Phospholipase D und der Rho-Kinase zu vermitteln, die final zu einer Regulation von L-Typ  $Ca_v1.2$ -Kanälen in glatten Muskelzellen führen können (Hunyady & Catt, 2006; Turu et al., 2019; Wang et al., 2018).

Infolge der Rezeptoraktivierung gibt es neben diesem „klassischen“ einen weiteren Signalweg, bei dem der Rezeptor von G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen (GRK) phosphoryliert wird (Gurevich & Gurevich, 2019). Diese Phosphorylierung ermöglicht das Rekrutieren zytosolischen  $\beta$ -Arrestins an den Rezeptor (Hodavance et al., 2016; Lefkowitz, 2013; Shenoy & Lefkowitz, 2011) und bewirkt dessen allosterische Hemmung.  $\beta$ -Arrestin spielt somit eine entscheidende Rolle im Prozess der Rezeptor-desensibilisierung (Zidar et al., 2009), bei dem der Rezeptor bei erneuter Ligandenbindung keine Reaktion mehr auslösen kann (Guo et al., 2001; S. Rajagopal et al., 2011).

$\beta$ -Arrestine können als Adapterproteine, Signalwandler und Gerüst für bestimmte Signalmoleküle wirken (Ahn, Wei, et al., 2004). Sie sind in der Lage Transduktionskaskaden unabhängig von und parallel zu G-Protein-abhängiger Signalvermittlung zu aktivieren (Grisanti et al., 2018; Li et al., 2018). Außerdem können  $\beta$ -Arrestine mit vielen endozytotischen Proteinen und Signalmittlern wie Clathrin und dem Clathrin-Adapter-Komplex AP2 (siehe Abb. 1) interagieren, so dass ihnen eine besondere Relevanz bei der Rezeptor-Internalisierung zugeschrieben wird (Kule et al., 2004; Ma & Pei, 2007). Zusätzlich ist  $\beta$ -Arrestin 2 an der MAPK-Aktivierung beteiligt, dabei insbesondere an jener der ERK 1 / 2 (Ahn, Wei, et al., 2004).

Derzeit sind vier Subtypen von  $\beta$ -Arrestin bekannt (Ahn, Shenoy, et al., 2004; Nuber et al., 2016), von denen zwei eine Rolle bei der AT1aR Signaltransduktion spielen (Gesty-Palmer et al., 2006).  $\beta$ -Arrestin 1 und 2 haben gegensätzliche Wirkungen auf die AT1a-

rezeptorvermittelte ERK Signalisierung. Während  $\beta$ -Arrestin 1 ein Inhibitor ist, aktiviert  $\beta$ -Arrestin 2 die ERK 1 / 2 nach erfolgter AT1aR-Stimulation (Gesty-Palmer et al., 2006; Hodavance et al., 2016; Hoffmann et al., 2008).

Nach der Bindung des Agonisten Ang II am AT1aR können zwei mögliche Signalkaskaden stimuliert werden, welche durch unabhängige Mechanismen zur Aktivierung von ERK 1 / 2 führen (Ahn, Shenoy, et al., 2004).

Zum einen erfolgt die Aktivierung am AT1R also durch die klassische G-Protein-abhängige und zum anderen durch die  $\beta$ -Arrestin-vermittelte Signalgebung (Ahn, Wei, et al., 2004). Diese beiden Signalwege unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Kinetik (Kovacs et al., 2009). Während der  $G_{q/11}$ -abhängige Weg sehr kurzlebig ist und schnell abläuft, ist der  $\beta$ -Arrestin Weg beständig und lang andauernd (Ahn, Shenoy, et al., 2004). Weiterhin gibt es einen Unterschied bezüglich der Lokalisation der aktivierten ERKs. Durch  $G_{\alpha_{q/11}}$  werden besonders die ERKs im Zellkern stimuliert, wohingegen  $\beta$ -Arrestin diejenigen im Zytosol aktiviert (Aplin et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass es unterschiedliche physiologische Endpunkte der ERK-Aktivierung gibt (Kim et al., 2005; Patel et al., 2010). Wie in Abbildung 1 dargestellt, aktivieren nukleäre ERKs die Gentranskription, die für zelluläre Differenzierung, Proliferation und das Wachstum notwendig ist. Zytosolische ERKs hingegen führen zu einer verminderten Phosphorylierung zytoplasmatischer Proteine und damit zu einer Regulation von Zellmobilität und Apoptose (Cervantes et al., 2010). Auf diesem Wege sorgt die  $\beta$ -Arrestin-abhängige ERK-Aktivierung für eine Regulierung der Proteinsynthese über die MAPK-interagierende Serin/Threonin-Kinase 1 (MNK1) sowie die anti-apoptotische Signalgebung durch Steuerung der Phosphorylierung des BCL2-assoziierten Agonisten des Zelltods (BAD) (Wang et al., 2018).

Auch für den Gefäßmuskeltonus scheint die ERK-Aktivität eine wichtige Rolle zu spielen: So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass bei arteriellem Hypertonus die ERK-Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen erhöht ist (Roberts, 2012). Durch Hemmung der ERK-Aktivierung konnte die Vasokonstriktion sowie die Zellproliferation reduziert werden (Roberts, 2012).

## **Funktionelle Selektivität an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren**

Wie oben bereits beschrieben, können G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) komplexe Signaltransduktionswege aktivieren. Neben klassischen Liganden, die eine Interaktion von GPCRs mit assoziierten G-Proteine stimulieren, gibt es einen weiteren Ligandentyp, sogenannte „funktionell selektive“ oder „biased“ Liganden, welche G-Protein-unabhängig interagieren (S. Rajagopal et al., 2011; Whalen et al., 2011). Die funktionelle Selektivität bezieht sich auf die Eigenschaft einiger Liganden, GPCR an verschiedene, „ausgewählte“ Effektoren zu koppeln und somit ein Liganden-spezifisches Signaltransduktionsprofil zu erzeugen, während native oder „balanced“ Agonisten gleichsam auf allen möglichen nachgeschalteten Signalwegen des Rezeptors wirken (Kenakin, 2007; Kendall et al., 2011).

„Biased“ Liganden sind in der Lage spezifische Teilkaskaden einer Rezeptorantwort zu vermitteln und können somit genutzt werden bestimmte Signalwege präzise zu steuern. Sie werden als vielversprechende neue Therapeutika betrachtet, die ein deutlich kleineres Nebenwirkungsspektrum haben als die vollwertigen Agonisten (S. Rajagopal et al., 2011; Reiter et al., 2012). Funktionell selektive  $\beta$ -Arrestin-Liganden stabilisieren nach Bindung an den GPCR bestimmte Konformationen des Rezeptors (Rakesh et al., 2010) und interagieren mit ausgewählten Signalmolekülen, um eine spezifische intrazelluläre Teilkaskade zu aktivieren und diese in Dauer und Signalstärke zu modulieren (Hodavance et al., 2016).

Der AT<sub>1</sub>aR, ein GPCR, ist ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Behandlung von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems. Über den klassischen G-Protein-abhängigen Signalweg wird nach Ligandenbindung (Ang II) eine Vasokonstriktion vermittelt. Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor ist somit an der Entstehung von arteriellem Hypertonus und einer Herzmuskelhypertrophie über die Aktivierung von G<sub>q/11</sub> beteiligt (Grisanti et al., 2018). Zusätzlich aktiviert Ang II auch den  $\beta$ -Arrestin-Signalweg, welcher sowohl für die Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung als auch für die G-Protein unabhängig vermittelten Wachstums- und Überlebensmechanismen der Zelle verantwortlich ist (Luttrell & Lefkowitz, 2002).

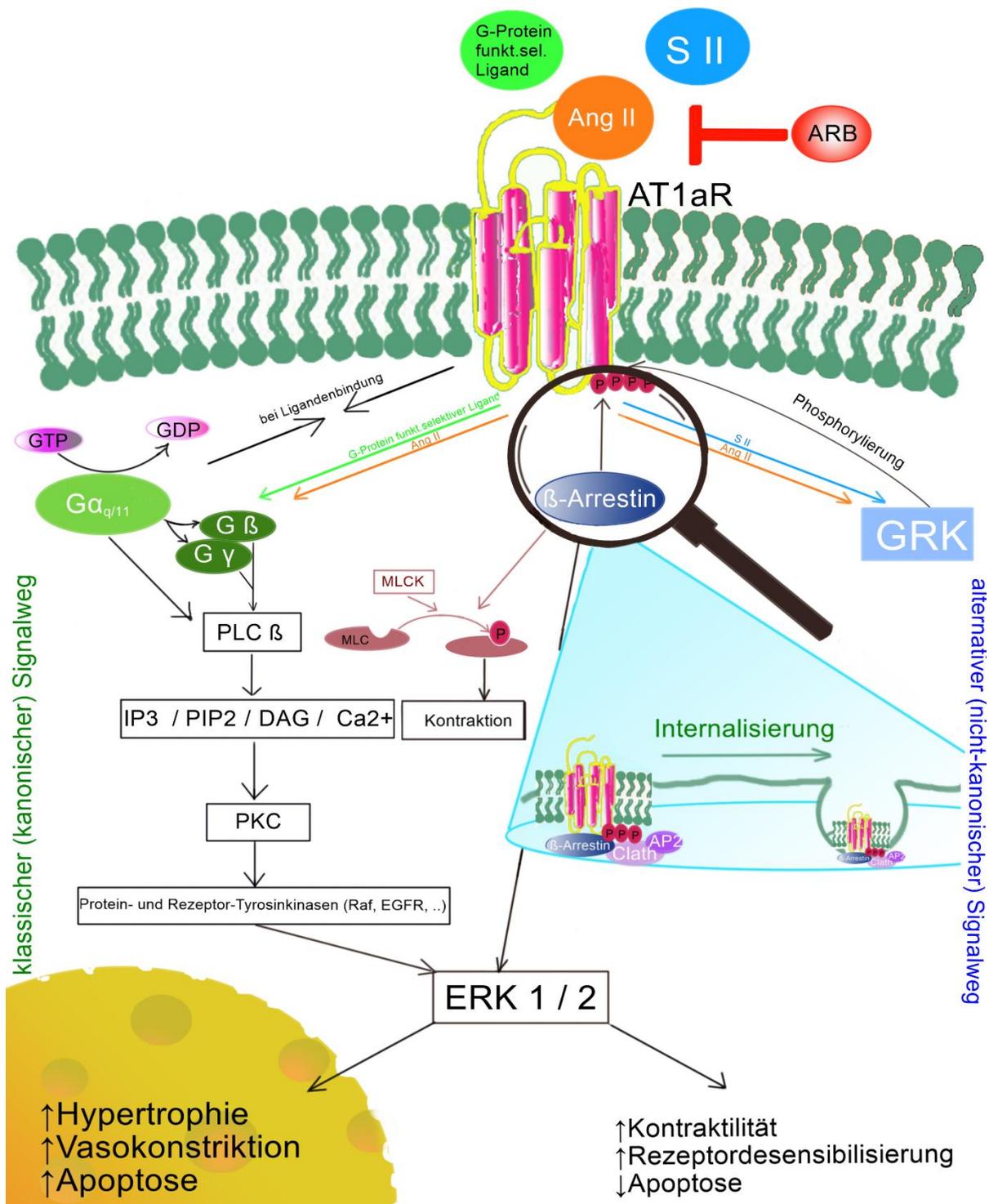
Arterieller Bluthochdruck ist weiterhin weltweit der wichtigste Risikofaktor für den Tod durch eine Herz-Kreislauf-Erkrankung (Ercu et al., 2020). Gemäß aktueller Leitlinien (Williams et al., 2018) werden im klinischen Alltag ACE-Hemmer und/ oder Angiotensin-

Rezeptor-Blocker (ARB) als Therapeutika eingesetzt, die die erwähnten, negativen G-Protein vermittelten Effekte verhindern sollen.

Zur gleichen Zeit jedoch blockieren diese Substanzen die potenziell nützliche  $\beta$ -Arrestin vermittelte Wirkung. Ein neuer Therapieansatz erforscht nun funktionell selektive Agonisten für den AT1R, welche die klassische Signalkaskade der G-Protein-Aktivierung und damit die schädliche  $G_{q/11}$ -vermittelten Effekte umgehen, andererseits  $\beta$ -Arrestin G-Protein-unabhängige Signalwege anstoßen und somit kardioprotektive Mechanismen fördern sollen (Grisanti et al., 2018).

Solche Substanzen sind beispielsweise Trevena 120027 (TRV027), die Sar, Ile - Angiotensin II (S II) als Hauptbestandteil besitzen und als funktionell selektive  $\beta$ -Arrestin Liganden des AT1R fungieren (Holloway et al., 2002). Einige befinden sich bereits in der klinischen Phase der Medikamentenzulassung (Wisler et al., 2018). Bisherige Forschungsergebnisse sind vielversprechend: So konnten Lefkowitz et al. zeigen, dass nach Behandlung mit S II das Fortschreiten eines Herzversagens im Tiermodell verlangsamt und der systemische Blutdruck signifikant verringert werden konnte (Lefkowitz, 2013). Zudem wirkt die Substanz über die Aktivierung von ERK1 / 2 und Proteinkinase B (PKB/ Akt) anti-apoptotisch und schützt somit Kardiomyozyten vor dem Zelluntergang (Grisanti et al., 2018).

S II ermöglicht durch seine Bindung an den AT1-Rezeptor sowohl die Stabilisierung einer aktiven Rezeptorkonformation als auch dessen Phosphorylierung durch GRKs, welche wiederum die Bindung von zytosolischen  $\beta$ -Arrestinen an den Rezeptor fördert (S. Rajagopal et al., 2011). Das  $\beta$ -Arrestin 2 agiert als Gerüstprotein und ermöglicht eine Phosphorylierung des ERK 1 / 2 - Signalwegs (Kobilka, 2007; S. Rajagopal et al., 2011; Wei et al., 2003). Durch diese funktionelle Selektivität wird erreicht, dass klassische G-Protein vermittelte Signalkaskaden über eine bevorzugte Kopplung von  $\beta$ -Arrestinen blockiert werden und folglich negative Effekte wie die Vasokonstriktion zugunsten der Inotropie und Lusotropie von Kardiomyozyten (Boerrigter et al., 2011; Dewire et al., 2008) verhindert werden können. Des Weiteren erhöht S II die Proteintranslation und -phosphorylierung sowie die Synthese und Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere und beeinflusst die auto- und parakrine Prostaglandinsynthese (Kendall et al., 2011). Wie Untersuchungen mit einem AT1-Rezeptorantagonisten zeigten, wurde die Wirkung von S II in Anwesenheit von Losartan aufgehoben (Kendall et al., 2011), welches daraufhindeutet, dass die Wirkung durch Bindung an die allosterische AT1aR-Ligandenbindungsstelle erfolgt.



**Abb. 1:** AT1aR-Signaltransduktion. Agonisten- (Ang II, S II, G-Protein funktionell selektive Liganden) oder Antagonistenbindung (ARB= Angiotensin-Rezeptor-Blocker). *Links:* Der klassische Signalweg: Nach Aktivierung des Rezeptors bindet dieser an den G-Protein-Komplex. GDP wird abgespalten, GTP bindet mit erhöhter Affinität. Das heterotrimere G-Protein dissoziiert in alpha und beta/gamma Untereinheiten und aktiviert die PLC  $\beta$ , diese wiederum spaltet aus PIP<sub>2</sub> IP<sub>3</sub> und DAG. *Rechts:* Der alternative Signalweg: Nach Aktivierung des AT1-Rezeptors phosphorylieren (= P) G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK) diesen und ermöglichen die  $\beta$ -Arrestin Bindung. Dadurch wird der Rezeptor allosterisch gehemmt. Durch weitere Bindung von Clathrin und AP2 wird der Rezeptor internalisiert.  $\beta$ -Arrestine aktivieren zudem die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) sowie ERK 1 und 2. Die G-Protein-vermittelte ERK-Aktivierung führt im Zellkern zu vermehrter Gentranskription, welche Proliferation, Wachstum und Apoptose erwirkt. Im Zytosol hingegen führt die  $\beta$ -Arrestin-vermittelte ERK-Aktivierung zu verminderter Apoptose sowie zur Regulierung der Proteinsynthese mit Auswirkungen auf die Zellmobilität.

## Myogener Tonus

Als myogener Tonus wird die Fähigkeit von kleinen Arterien, besonders der Arteriolen, bezeichnet, sich bei ansteigendem Perfusionsdruck zu kontrahieren, beziehungsweise sich bei abfallendem Perfusionsdruck zu erweitern, um die Organperfusion bei schwankenden Blutdrücken ohne Aktivierung des vegetativen Nervensystems konstant halten zu können (Chennupati et al., 2019; Davis & Hill, 1999). Er wird auch nach dem britischen Physiologen William Bayliss als „Bayliss-Effekt“ bezeichnet, der ihn erstmals beschrieb (Bayliss, 1902).

Dieser Autoregulationsmechanismus ermöglicht es Gewebeschäden durch Hypo- oder Hyperperfusion vorzubeugen und für eine Homöostase zu sorgen, die unter anderem eine normale Hirn- oder Nierenfunktion gewährleistet (Davis, 2012; Pires et al., 2015).

Auf zellulärer Ebene wird heute von folgendem Modell ausgegangen: Der physische Reiz des Perfusionsdrucks löst eine physiologische Antwort, nämlich die Anpassung des Gefäßdurchmessers, aus (Zou et al., 2004). Durch die Druckerhöhung im Blutgefäß depolarisiert die glatte Muskelzelle, was einen Calciumeinstrom durch den spannungsabhängigen Calciumkanal (L-Typ  $Ca_v1.2$ ) in die Zelle zur Folge hat, und letztendlich eine myogene Kontraktion auslöst (Heinze et al., 2014; Moosmang et al., 2003).

Zusätzlich werden durch den Calciumeinstrom calciumsensitive Kaliumkanäle in der Sarkolemma-Membran aktiviert, wodurch die Zellmembran hyperpolarisiert und die myogene Kontraktion verringert wird (Jaggar et al., 1998; Nelson et al., 1990).

Kontrovers diskutiert wird die Wirkung des AT1R auf den myogenen Tonus: So konnte einerseits in Studien gezeigt werden, dass mechanischer Stress zur Hypertrophie von Myozyten Ang II-unabhängig über die Aktivierung des AT1R führen kann (Hong et al., 2016; Tang et al., 2014; Zou et al., 2004).

Andere Studien kamen hingegen zu einem gegensätzlichen Ergebnis: So zeigte der Angiotensin-Rezeptor-Blocker Losartan im Mausmodell keine Wirkung auf den myogenen Tonus; möglicherweise, weil der mechanoaktivierte AT1R in einem Konformationszustand vorliegt, der unzugänglich für die Wirkung von Sartanen ist (Mederos y Schnitzler et al., 2008; Schleifenbaum et al., 2014; Yasuda et al., 2008). Alternativ könnten auch kompensatorisch fehlregulierte Signalwege in den verwendeten Mausmodellen eine Rolle gespielt haben.

Auch in Abwesenheit eines Liganden ist es möglich die  $\beta$ -Arrestin vermittelte Signalkaskade in AT1R durch mechanische Dehnung zu aktivieren (Rakesh et al., 2010). Die Aktivierung und zyklische Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) ist die Basis für die zelluläre Kontraktion und die Muskelbewegung (Simard et al., 2013). Simard et al. fanden heraus, dass die  $\beta$ -Arrestine entscheidend in der Regulierung der Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten (MLC) durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) beteiligt sind (siehe Abb. 1), und sie somit einen wichtigen Bestandteil der AT1aR abhängigen mechanischen Antwort darstellen (Simard et al., 2013).

## **Fragestellung**

In dieser Arbeit sind die Ziele der Untersuchungen:

- 1) Anhand der Verwendung von verschiedenen Tiermodellen darzustellen, welcher der Angiotensin-Rezeptor Subtypen für die Vermittlung und Regulation des myogenen Tonus in der perfundierten Mausniere verantwortlich ist.
- 2) Festzustellen, ob der myogene Tonus über den kanonischen, klassischen  $G_{q/11}$ -Protein- gekoppelten Signalweg und/oder über den nicht-kanonischen, alternativen,  $\beta$ -Arrestin-regulierten Signalweg des AT1R in der perfundierten Niere hervorgerufen wird.

## **2. Material und Methodik**

### **Chemikalien und Lösungen**

Alle Salze und der Großteil der Chemikalien wurden von der Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Merck (Kenilworth, USA) verwendet. Die Medikamentenlösungen wurden täglich vor den Experimenten frisch gelöst und zubereitet. Die Zusammensetzung der verwendeten physiologischen Salzlösung (PSS) ist wie folgt (in mM): NaCl 119, KCl 4.7, and  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.6, Glucose 11.1. Die kaliumhaltige Salzlösung (KCl-PSS-60 mM) wurde durch Austausch des Natriumchlorids (NaCl) mit äquimolarem Kaliumchlorid (KCl) zubereitet. Zur Herstellung der calciumfreien Lösung ( $\text{Ca}^{2+}$ -free-PSS) wurde auf den Zusatz Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) verzichtet (Heinze et al., 2014; Villalta et al., 2019). Der „biased“ Agonist ( $\text{Sar}^1$ , Ile  $^{4,8}$ )-Angiotensin II, auch TRV120027, von der Firma Bachem, Bubendorf, Schweiz wurde in Konzentrationen von 0.1 nM bis 1  $\mu\text{M}$  verwendet. Das humane Angiotensin II von der

Firma Sigma wurde ebenfalls in Konzentrationen von 0.1 nM bis 1  $\mu$ M benutzt (Lian et al., 2018).

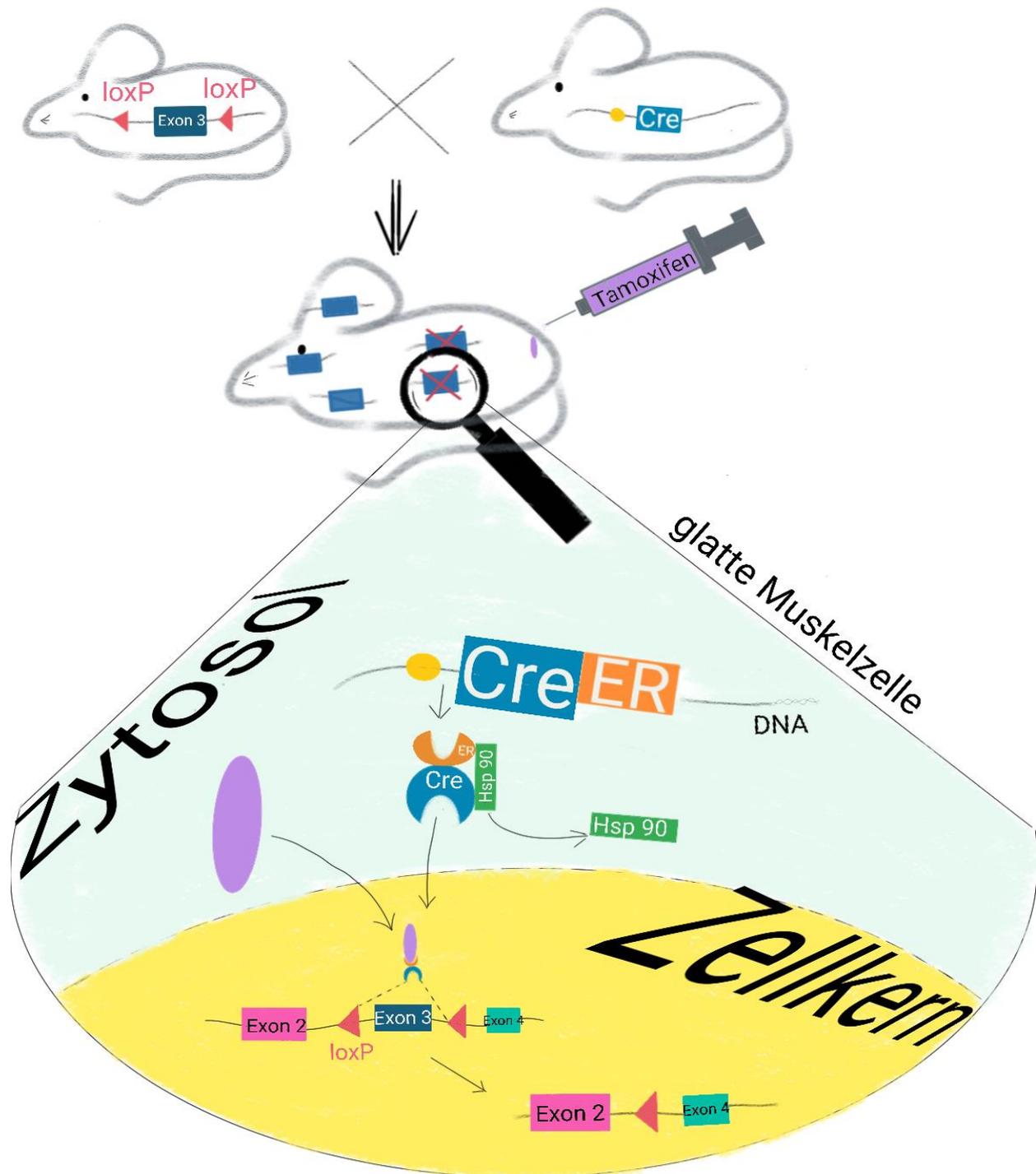
Der selektive  $G\alpha_{q/11}$ -Protein-Inhibitor UBO-QIC, auch FR900359, extrahiert aus der *Ardisia crenata*, einer immergrünen in Japan wachsenden Pflanze, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Gabriele König und Evi Kostenis (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und in einer Dosis von 300 nM eingesetzt (Schrage et al., 2015, Inamdar et al., 2015). Tamoxifen wurde bei Sigma-Aldrich erworben.

## Versuchstiere und Präparierung

Die Versuche wurden an adulten männlichen Mäusen im Alter von acht bis zwölf Wochen durchgeführt, welche unter Standardbedingungen mit freiem Wasser- und Futterzugang gehalten wurden. Die durchgeführten Versuche wurden von der zuständigen Berliner Behörde (LAGESO) genehmigt. Die zugehörige Meldenummer des Instituts lautet: X 9011/16. Die Experimente wurden mit insgesamt drei verschiedenen Mauslinien durchgeführt: Die *Agtr1a*<sup>+/+</sup> x *Agtr1b*<sup>+/+</sup> und *Agtr1a*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe Bader aus dem Max-Delbrück-Centrum Berlin bereitgestellt. Die *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Mäuse stammen aus dem Labor von Matthew Sparks, Durham, USA.

Weiterhin verwendeten wir Mäuse von Matthew Sparks mit induzierbaren Doppel-Knockout. Diese Mäuse besitzen ein Glattmuskelzell-Myosinschwerketten (SMMHC)-Cre-Östrogenrezeptor (ER)<sup>T2</sup>-Transgen, basierend auf einem künstlichen Bakterienchromosom (BAC), eingefügt in das Y-Chromosom, welche die Cre-Rekombinase in glatten Muskelzellen exprimieren und ein gefloxtes Allel, das heißt ein mit loxP markiertes *Agtr1a* Gen (SMMHC-Cre+*Agtr1a*<sup>flox/flox</sup>), tragen. Zudem wird bei diesen Tieren das *Agtr1b* Gen nicht exprimiert (SMMHC-*Agtr1a*<sup>-/-</sup> x *Agtr1b*<sup>-/-</sup>). Diese Mäuse wurden mit frisch zubereitetem, in Maisöl gelöstem Tamoxifen behandelt, das an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Dosis von 30  $\mu$ g/g Körpergewicht/ Tag intraperitoneal appliziert wurde (Moosmang et al., 2003). Die Cre-Rekombinase ist ein Tamoxifen-induzierbares Cre-Östrogen-Rezeptor-Fusionsprotein. Durch die Behandlung mit Tamoxifen sollte die Cre-Rekombinase aktiviert werden und zellspezifisch in glatten Gefäßmuskelzellen das *Agtr1a* Gen eliminieren (siehe Abb. 2) (Groneberg et al., 2010). Die Versuchsdurchführung erfolgte mindestens sieben Tage nach der Behandlung mit Tamoxifen. Die männlichen Versuchstiere wurden nach initialer Isofluran-Narkose mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurde die Bauchdecke mittels eines

Längsschnittes eröffnet und es erfolgte die beidseitige Nephrektomie und anschließende Lagerung der Nieren in einer Petrischale mit physiologischer Salzlösung bei 4° C.



**Abb. 2:** SMMHC-CreER: Transgenes Mausmodell mit induzierbarem *Agtr1a* Knockout. Zwei loxP-Stellen flankieren das *Agtr1a* Gen (Exon 3). Tamoxifen aktiviert den Östrogenrezeptor (ER) und die damit verbundene Cre-Rekombinase, die zellspezifisch das „gefloxte“ Gen dysfunktional macht. HSP90 = Hitzeschockprotein 90.

## Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine Genotypisierung erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion. Die DNA wurde aus Schwanzbiopsien der Mäuse gewonnen. Als Reagenzien und Geräte für die DNA-Amplifikation wurden Produkte der Firmen Sigma, Promega und Applied Biosystems verwendet. Zur Analyse des PCR-Produkts wurde dieses mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Länge der PCR-Produkte wurde durch den Vergleich mit einer 100 Basenpaare (bp)-Leiter bestimmt. Die Amplifizierung des SMMHC-Cre-Gens erfolgte mittels Multiplex-PCR mit folgenden Primern:

SMWT1 5'-TGA CCC CAT CTC TTC ACT CC-3'

SMWT2 5'- AAC TCC ACG ACC ACC TCA TC-3'

phCREAS1 5'-AGT CCC TCA CAT CCT CAG GTT-3' (Cui et al., 2020).

Die erwartete Bande lag bei 225 bp für das Wildtyp-Allel und bei 287 bp für das Transgen.

Die Amplifizierung des AT1a-flox-Gens erfolgte mit den folgenden Primern:

AT1A down 5'-ATC AGC ACA TCC AGG AAT G-3'

LoxPSense 5'-GCT TCC TCT GTT ATG CAG TCT-3'

Es zeigte sich eine Bande bei 1400 bp für *Agtr1a*<sup>+/+</sup> oder bei 1600 bp für *Agtr1a*<sup>flox/flox</sup>.

Für die DNA der *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Tiere wurden folgende Primer genutzt:

AT1 up 5'- GCA TCA TCT TTG TGG TGG G-3'

AT1B down 5'- ATG AGC ACA TCC AGA AAA C-3'.

Sichere PCR-Produkte zeigten sich bei 952 bp für *Agtr1b*<sup>+/+</sup> und 700 bp für *Agtr1b*<sup>-/-</sup>.

Die *Agtr1a*<sup>-/-</sup> Tiere wurden, wie bei Ito et al. (Ito et al., 1995) beschrieben, von der Arbeitsgruppe Bader ebenfalls mittels PCR genotypisiert.

## Perfusion der isolierten Nieren

Zu Beginn erfolgte die Präparation der Nieren aus dem Situs und die Fixierung der Nierenarterien auf jeweils einer luftleeren Glaskanüle mit einer Organkammer (Schleifenbaum et al., 2014), welche über ein Pumpensystem mit Carbogenangereicherter (95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid) physiologischer Salzlösung perfundiert wurde.

Anschließend wurde nach einer einstündigen Perfusion- und Äquilibrationszeit der Perfusionsdruck über den Druckabnehmer und einen Signalwandler gemessen und mittels „Powerlab“ (ADInstruments, Sprechbach)-Interface übertragen (siehe Abb. 3). Zunächst begannen wir eine flusskonstante Messung des Perfusionsdrucks mit einem

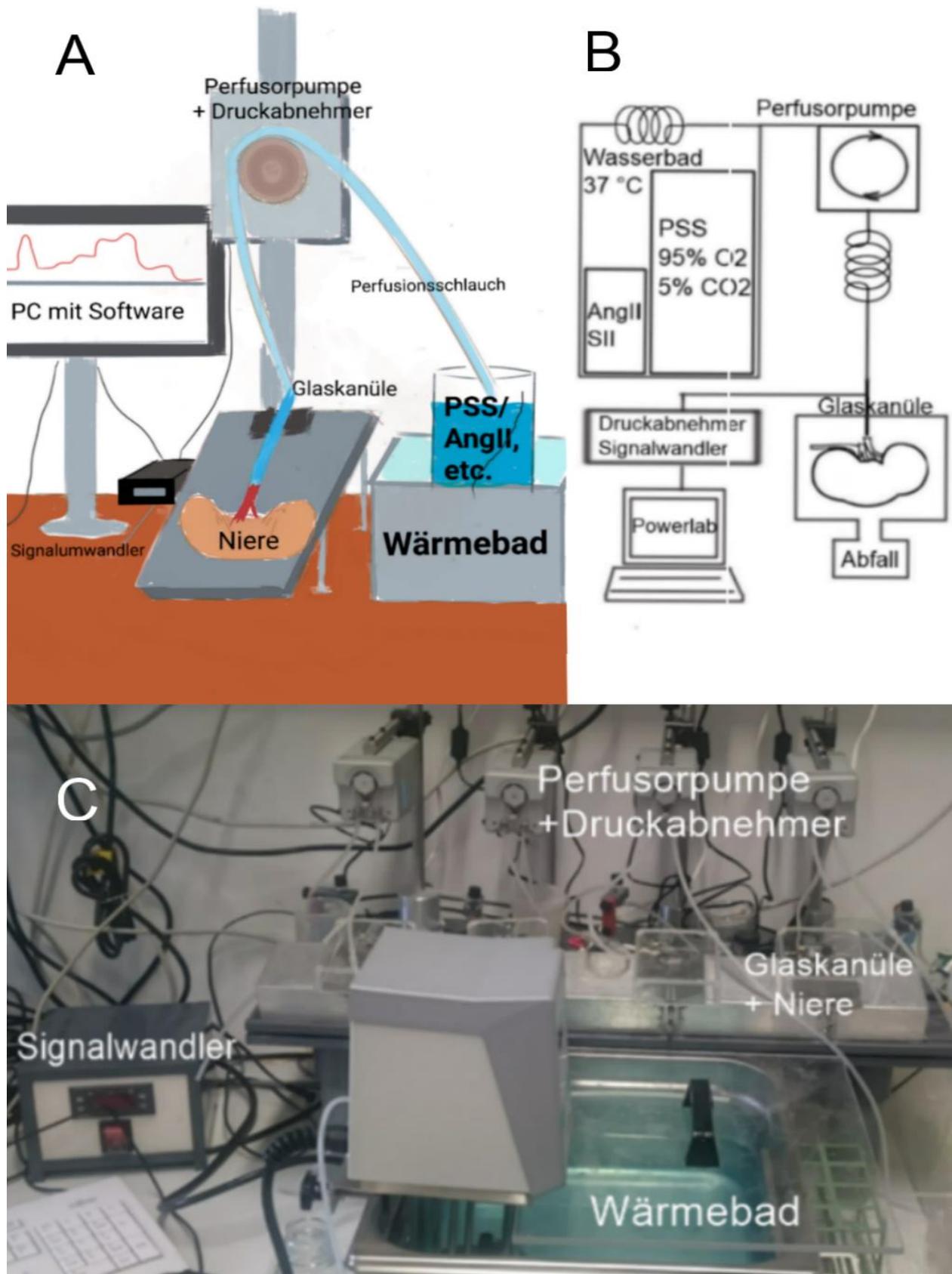
definierten Ausgangsdruck von 80 mm Hg. Dieser sollte dabei dem physiologischen mittleren arteriellen Druck der Maus entsprechen (Janssen und Smits, 2002).

Daraufhin folgte die Applikation der Agenzien Angiotensin II und S II in kumulativen Dosen von 0.1 nM bis 1  $\mu$ M über einen Zeitraum von einer Stunde, sowie die Errechnung und Dokumentation der Druckänderung, die sich aus der Differenz des gemessenen Perfusionsdrucks und dem Ausgangsdruck ergibt. Anschließend wurde die durch das jeweilige Agens vermittelte Kontraktion durch die maximale Kontraktionskraft von KCl bei einer Konzentration von 60 mmol/L standardmäßig normiert (Heinze et al., 2014; Mederos y Schnitzler et al., 2008; Ratz et al., 2005; Zhou et al., 2003).

Zum Abschluss der Versuchsdurchführung erfolgte die Gabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -freier PSS, wobei die Elimination der externen Calciumionen (1.6 mmol/L) - durch fehlenden Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum in die Zelle - zu einer Unterbrechung der Muskelkontraktion und damit Abfall des Perfusionsdrucks führt, der als myogener Tonus definiert wird (Berg et al., 2013; Carlström et al., 2015; Schleifenbaum et al., 2014).

Darüber hinaus wurde das Versuchsprotokoll in zwei Teilerperimenten leicht variiert. Zum eine erfolgte in der Versuchsreihe des konditionellen Cre/lox- und Tamoxifen-induzierten *Agtr1a* Knockouts vor der Kalibrierung zusätzlich eine Druckmessung bei festgelegter Steigerung der Flussgeschwindigkeit (von 0.3 bis 1.9 ml/min), wobei es sich um den physiologischen Bereich des renalen Plasmafluss der Maus handelt (Janssen & Smits, 2002), um bereits vermeintliche Druckunterschiede zwischen der induzierten Knockout- und Wildtyp-Kontrollgruppe vor Zugabe der Agenzien erheben zu können. Diese benannten Gruppen wurden anschließend mit einer Ang II Konzentration von 10 nM behandelt.

Zum anderen nutzen wir in einer Versuchsreihe den selektiven  $\text{G}\alpha_{q/11}$ -Protein-Inhibitor UBO-QIC. Dieser wurde nach der oben beschriebenen Äquilibrierungszeit und nach Einstellen des Perfusionsdrucks von 80 mm Hg, in einer Konzentration von 300 nM in die physiologische Salzlösung appliziert und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Versuchsaufbau, wie oben beschrieben, mit der kumulativen Applikation von Ang II fortgesetzt.



**Abb. 3:** Die Niere wird auf einer Glaskanüle in einer Organkammer fixiert und mit erhitzter carbogen-angereicherter Salzlösung über ein Pumpensystem perfundiert. Der Perfusionsdruck wird gemessen und an eine Computer-Software „Powerlab“ übertragen. **A, B:** Schematischer Versuchsaufbau. **C:** Original-Versuchsaufbau.

## Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch GraphPad PRISM Version 6 (GraphPad Software, CA, USA). In den Einzelgruppen wurde Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet und als Grafik abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA oder „unpaired student's t-test“. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.; n steht für die Zahl der getesteten Nieren. N steht für die Anzahl der Tiere.

## Einhaltung wissenschaftliche Richtlinien

Während der Experimente habe ich sichergestellt, dass die Tierschutzstandards immer eingehalten wurden. Darüber hinaus wurde während der Experimente und bei der Vorbereitung der Arbeit die strikte Einhaltung der Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis gewährt.

## 3. Ergebnisse

### Die Vermittlung des myogenen Gefäßtonus über den klassischen $G_{q/11}$ -Signalweg des AT1aR

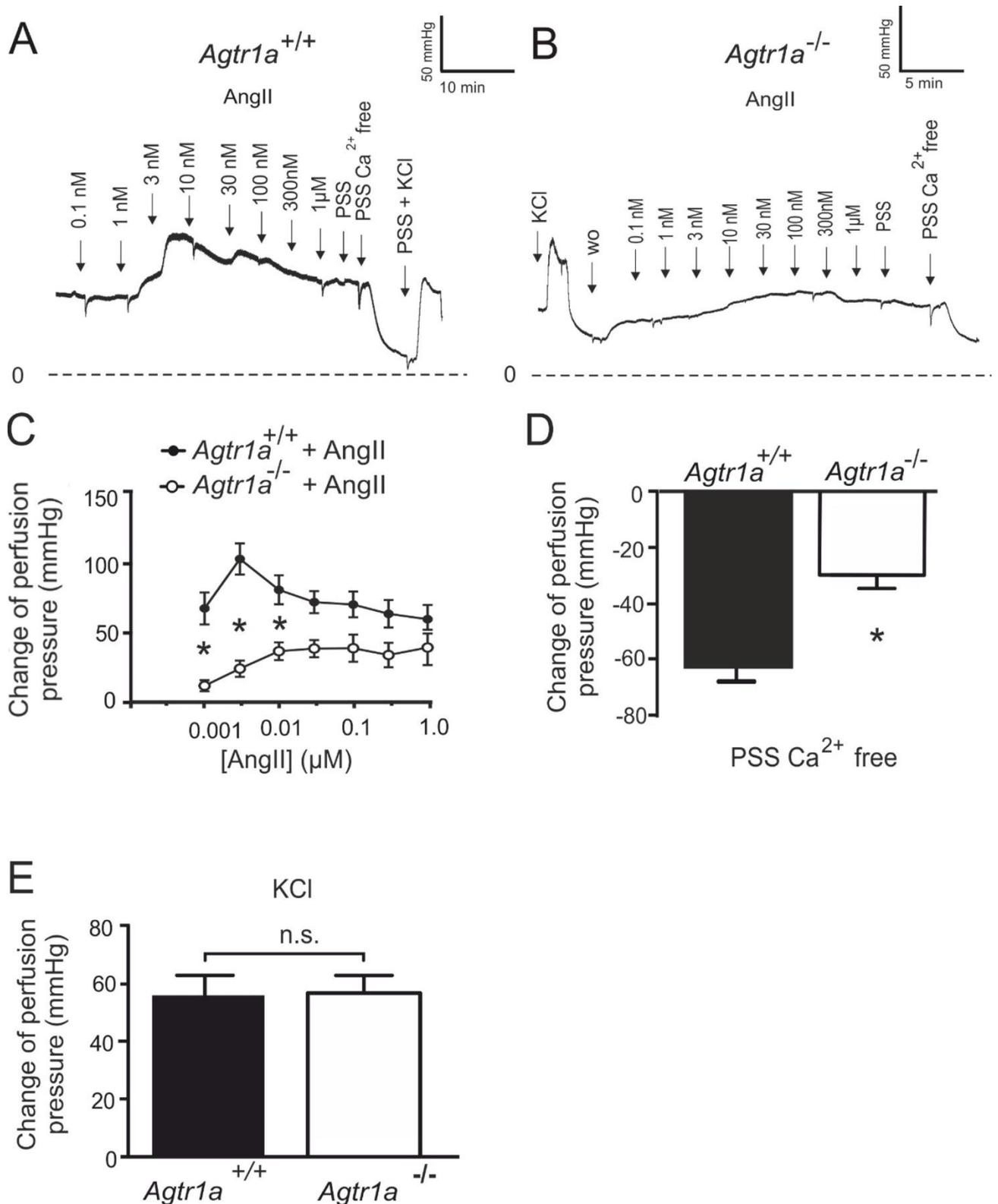
Um die myogene Autoregulation im Nierenkreislauf der Maus näher zu untersuchen, wurde der Perfusionsdruck und somit der Nierengefäßwiderstand isoliert perfundierter Nieren gemessen. Die durch Hinzufügen von 60 mM KCl induzierten Perfusionsdrücke (siehe Abb. 4 E) dienten als Vergleichswerte für den Perfusionsdruckanstieg, der durch das jeweilige Agens (Ang II, SII) herbeigeführt wurde. Der durch KCl vermittelte Anstieg des Perfusionsdrucks ergab jeweils zwischen den untersuchten Vergleichsgruppen keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 4, 5, 6 E). Anschließend erfolgte die kumulative Gabe von Ang II in der Kontrollgruppe der *Agtr1a<sup>+/+</sup>* Nieren (s. Abb. 4 A) und der Testgruppe mit *Agtr1a<sup>-/-</sup>* Nieren (s. Abb. 4 B). Es konnte gezeigt werden, dass Ang II im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 10 nM in *Agtra1<sup>+/+</sup>* im Vergleich zu *Agtr1a<sup>-/-</sup>* Nieren zu einem signifikant höheren Anstieg des Perfusionsdrucks führte.

Das Hinzufügen calciumfreier Lösung und damit die Elimination externer Calciumionen bewirkte in der Testgruppe der *Agtr1a<sup>-/-</sup>* Nieren einen signifikant geringeren Abfall (-29 mm Hg) des Perfusionsdrucks (myogener Tonus) im Vergleich zur *Agtr1a<sup>+/+</sup>*-Kontrollgruppe (auf -63 mm Hg) (s. Abb. 4 D).

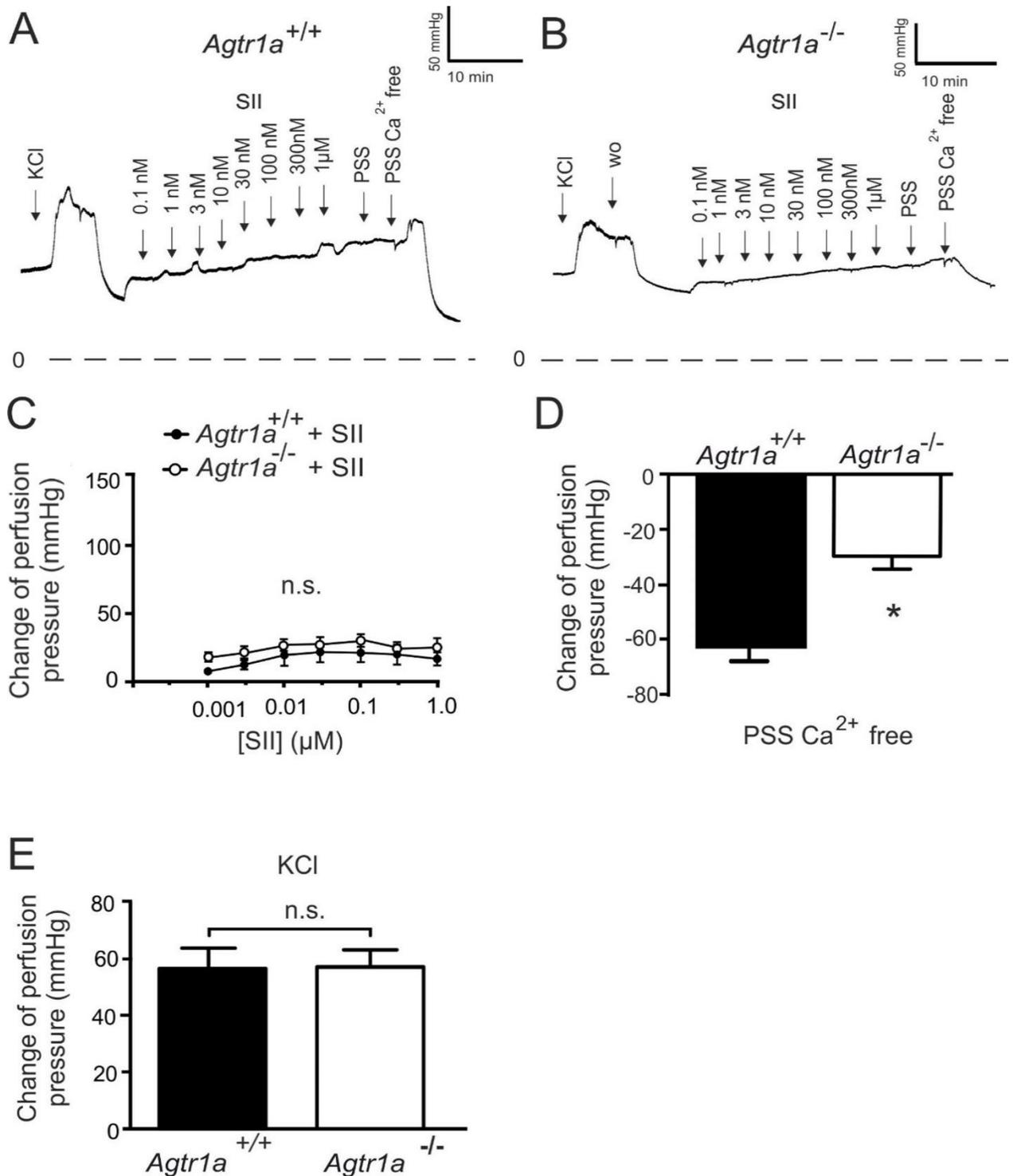
In einem zweiten Schritt erfolgte die Untersuchung des  $\beta$ -Arrestin-Signalwegs durch Hinzugabe des funktionell selektiven Agonisten S II. In beiden Gruppen zeigte sich ein leichter Anstieg des Perfusionsdrucks. In den Nieren der *Agtr1a<sup>+/+</sup>* stieg dieser bis maximal 18 mm Hg bei einer Konzentration von 3 nM, in den Nieren der *Agtr1a<sup>-/-</sup>* erreichte der Anstieg einen maximalen Wert von 26 mm Hg bei einer Ang II Konzentration von 10 nM. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich hinsichtlich des Perfusionsdrucks nach Inkubation mit S II nicht (s. Abb. 5 A-C).

Nach Entfernung der externen Calciumionen konnten ähnliche Werte wie in der Versuchsdurchführung mit Ang II erhoben werden: In der Gruppe der *Agtr1a<sup>+/+</sup>* ergab sich ein signifikant höherer Abfall des Perfusionsdrucks im Vergleich zur Knockout-Kontrollgruppe (s. Abb. 5 D) nach Anwendung von S II.

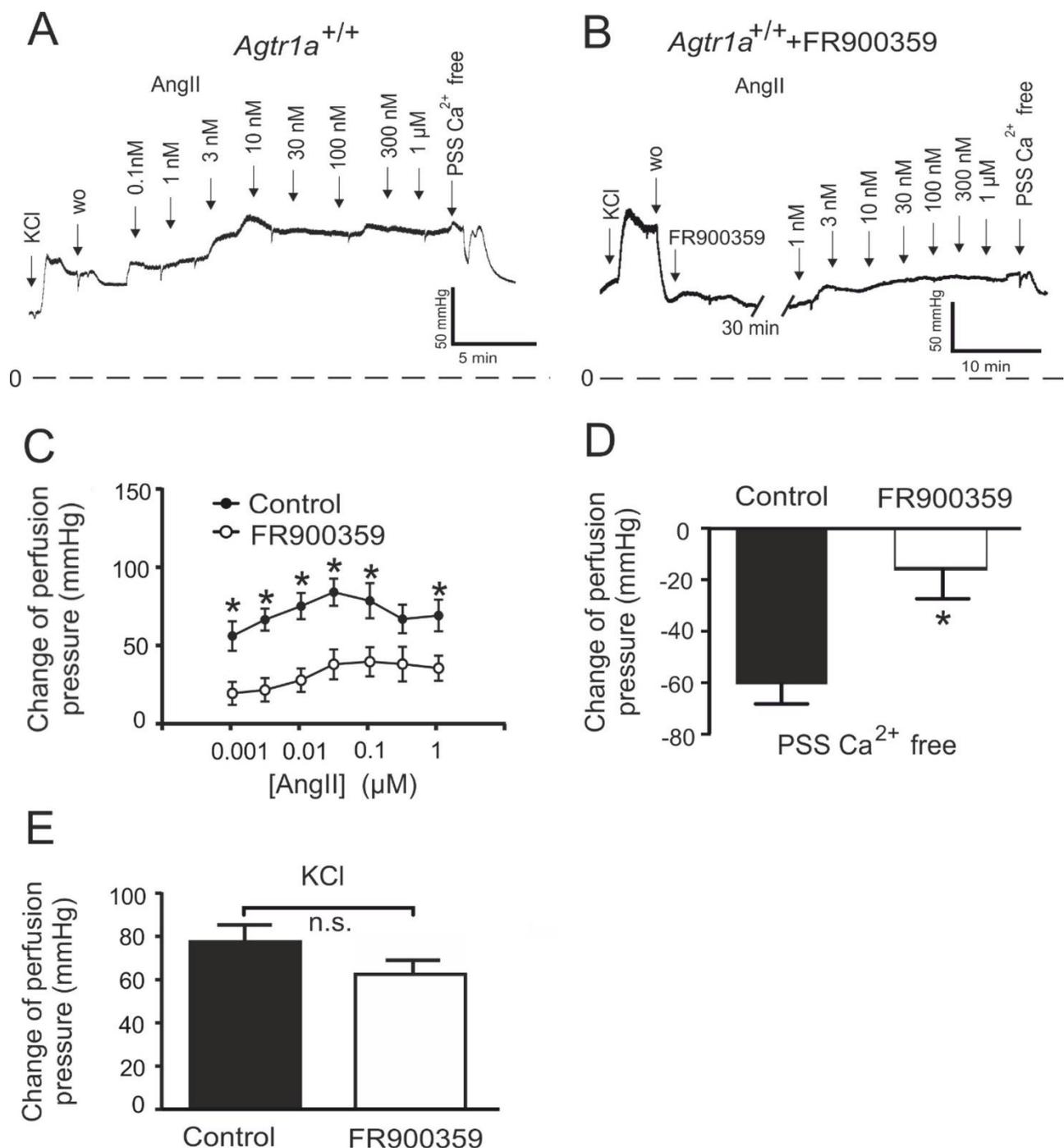
In einem dritten Schritt wurde die  $G\alpha_{q/11}$ -Protein-vermittelte Wirkung von Ang II auf den Perfusionsdruck durch den Einsatz des selektiven  $G\alpha_{q/11}$ -Protein-Inhibitors FR900359 untersucht (s. Abb. 6). Diese Substanz ist inaktiv auf G-Protein-unabhängigen, Arrestin-vermittelten Signalwegen und führt zu einer kompetenten, pseudo-irreversiblen Rezeptorhemmung (Schrage et al., 2015). Nach halbstündiger Inkubation der *Agtr1a<sup>+/+</sup>* Nieren mit FR900359, konnte bei Applikation von Ang II eine Steigerung des Perfusionsdrucks auf maximal ~ 38 mm Hg, bei einer Ang II Konzentration von 100 nM erreicht werden (s. Abb. 6 B). Im Vergleich dazu lässt sich bei den nicht mit FR900359 vorbehandelten Nieren ein maximaler Perfusionsdruck von 84,5 mm Hg bei einer Ang II Konzentration von 10 nM nachweisen (s. Abb. 6 C). Dabei sind die Werte in der behandelten Gruppe während der gesamten Messung signifikant geringer als jene der unbehandelten Kontrollgruppe. Weiterhin zeigte sich in den mit FR900359 inkubierten Nieren durch das Entfernen der Calciumionen ein signifikant höherer Abfall des Perfusionsdrucks als in der unbehandelten Kontrollgruppe.



**Abb. 4:** Gefäßregulation in isoliert-perfundierten Nieren von *Agtr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen. **A, B:** Originalaufnahmen von Perfusionsdrücken in Nieren von *Agtr1a*<sup>+/+</sup> und *Agtr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen. Reaktion auf KCl, Ang II, Ca<sup>2+</sup> freie PSS Lösung. **C:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch Ang II (0.1 nM bis 1 μM) (*Agtr1a*<sup>+/+</sup> (n=15; N=9) und *Agtr1a*<sup>-/-</sup> (n=11; N=9)). **D:** Myogener Tonus durch Exposition der Nieren mit Ca<sup>2+</sup> freier PSS Lösung; (n=8 *Agtr1a*<sup>+/+</sup> und n=5 *Agtr1a*<sup>-/-</sup>). **E:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch 60 mM KCl (n=8 *Agtr1a*<sup>+/+</sup> und n=7 *Agtr1a*<sup>-/-</sup>). Alle Mäuse haben einen FVBN Hintergrund. \*, p<0.05; n.s., nicht signifikant.



**Abb. 5:** Gefäßregulation in isoliert-perfundierten Nieren von *Agtr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen. **A, B:** Originalaufnahmen von Perfusionsdrücken in Nieren von *Agtr1a*<sup>+/+</sup> und *Agtr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen. Reaktion auf KCl, Sar-Ile II (S II, 0.1 nM bis 1 μM), Ca<sup>2+</sup> freie Perfusionslösung (PSS Ca<sup>2+</sup> frei) **C:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch Sar-Ile II (S II, 0.1 nM bis 1 μM) (*Agtr1a*<sup>+/+</sup> (n=10, N=8) und *Agtr1a*<sup>-/-</sup> (n=11; N=9)). **D:** Myogener Tonus durch Exposition der Nieren mit Ca<sup>2+</sup> freier PSS Lösung; je n=6, **E:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch 60 mM KCl (je n=6). Alle Mäuse haben einen FVBN Hintergrund. \*, p<0.05; n.s., nicht signifikant.

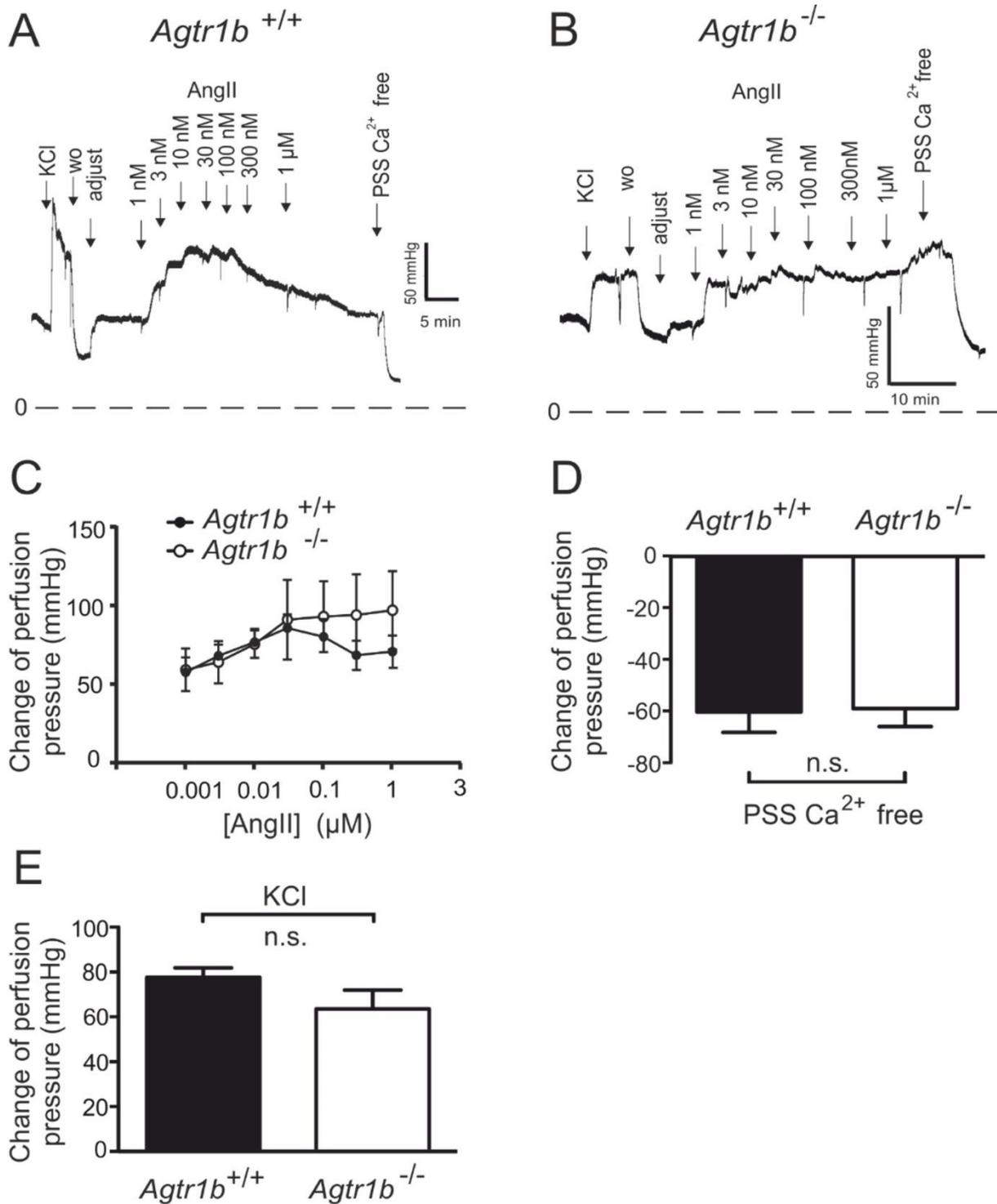


**Abb. 6:** Gefäßregulation in isoliert-perfundierten Nieren von *Agtr*<sup>+/+</sup> Mäusen, vorbehandelt mit  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Inhibitor FR900359 (UBO-QIC). **A, B:** Originalaufnahmen von Perfusionsdrücken in nicht-vorbehandelten Nieren und solchen, die mit 300 nM  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Inhibitor FR900359 für 30 Minuten vorbehandelt/inkubiert wurden. Reaktion auf KCl, Ang II, Ca<sup>2+</sup> freie PSS Lösung. **C:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch Ang II (1 nM bis 1 μM) (n=15; N=12 *Agtr*<sup>+/+</sup> und n=6; N=4 *Agtr*<sup>+/+</sup> vorbehandelt mit FR900359). **D:** Myogener Tonus durch Exposition der Nieren mit Ca<sup>2+</sup> freier PSS Lösung. **E:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch 60 mM KCl. w.o., wash-out. Alle Mäuse haben einen C57BL/6 Hintergrund. \*, p<0.05; n.s., nicht signifikant.

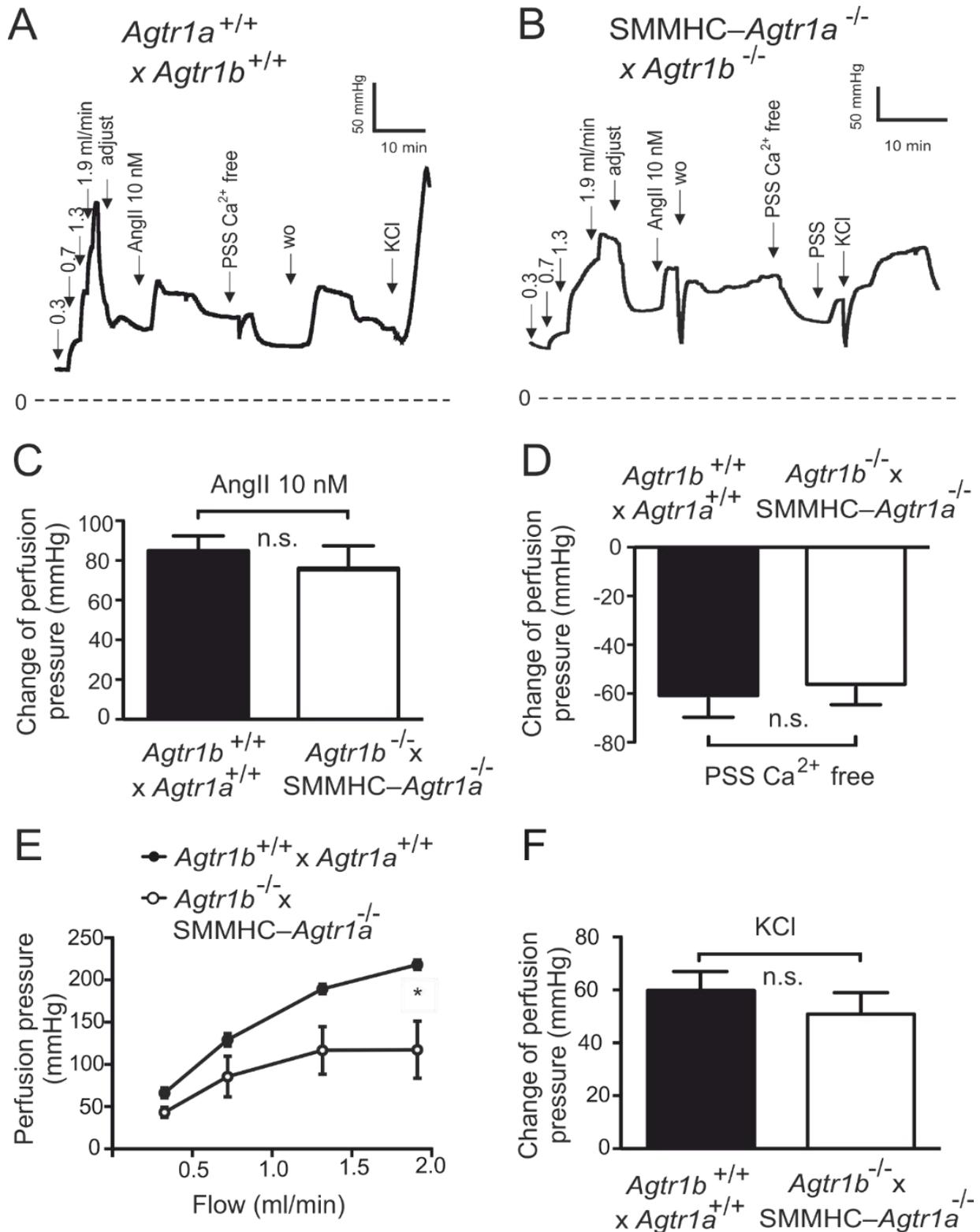
## Die Rolle des AT1bR in der Vermittlung des myogenen Tonus

In Bezug auf die gemessene Ang II- und KCl-induzierte Kontraktion konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Agtr1b<sup>+/+</sup>* und *Agtr1b<sup>-/-</sup>* Nieren gemessen werden (siehe Abb. 7 A-C, E). Durch Eliminierung externer Calciumionen hingegen konnte ein vergleichbarer Abfall des Perfusionsdruck in beiden Gruppen erzielt werden, der zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen keinen signifikanten Unterschied ergab (siehe Abb. 7 D).

Um die oben genannten Ergebnisse zu untermauern und mögliche Kompensationsmechanismen des Organismus bei Mausmodellen mit kompletter Gendeletion auszuschließen (Mederos y Schnitzler et al., 2008), führten wir folglich Untersuchungen am konditionellen Cre/lox- und Tamoxifen-induzierten *Agtr1a* Knockout Modell (*SMMHC–Agtr1a<sup>-/-</sup> x Agtr1b<sup>-/-</sup>*) durch. In Nieren der *SMMHC–Agtr1a<sup>-/-</sup> x Agtr1b<sup>-/-</sup>* Tiere zeigte sich nach Einmalgabe von Ang II ein deutlicher Anstieg des Perfusionsdrucks (Abb. 8 B, C) ohne signifikanten Unterschied zu den *Agtr1a<sup>+/+</sup> x Agtr1b<sup>+/+</sup>* Nieren. Der durch die Erhöhung der Flussrate herbeigeführte Anstieg des Perfusionsdrucks in den *SMMHC–Agtr1a<sup>-/-</sup> x Agtr1b<sup>-/-</sup>* Nieren verblieb tendenziell geringer als in der Vergleichsgruppe. Jedoch zeigte sich lediglich bei einer Flussrate von 1.9 ml/min ein signifikant niedrigerer Perfusionsdruck in den *SMMHC–Agtr1a<sup>-/-</sup> x Agtr1b<sup>-/-</sup>* (~ 111 mm Hg) verglichen mit den *Agtr1a<sup>+/+</sup> x Agtr1b<sup>+/+</sup>* (~ 223 mm Hg) Nieren (Abb. 8 E). Weiterhin kam es in beiden Gruppen nach Entfernung externer Calciumionen zu einem deutlichen (~ -60 mm Hg) Abfall des Perfusionsdrucks, welcher keinen signifikanten Gruppenunterschied ergab (s. Abb. 8 D).



**Abb. 7:** Gefäßregulation in isoliert-perfundierten Nieren von *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Mäusen. **A, B:** Originalaufnahmen von Perfusionsdrücken in von *Agtr1b*<sup>+/+</sup> und *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Mäusen. Reaktion auf KCl, Ang II, Ca<sup>2+</sup> freie PSS Lösung. **C:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch Ang II (1 nM bis 1 μM) (n= 15; N=12 *Agtr1b*<sup>+/+</sup> und n=5; N=3 *Agtr1b*<sup>-/-</sup>). **D:** Myogener Tonus durch Exposition der Nieren mit Ca<sup>2+</sup> freier PSS Lösung; (je n=5). **E:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch 60 mM KCl (n=6 *Agtr1b*<sup>+/+</sup> und n=5 *Agtr1b*<sup>-/-</sup>). w.o., wash-out. Die *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Mäuse haben einen C57BL/6 x 129/Sv Hintergrund. Die *Agtr1b*<sup>+/+</sup> haben einen C57BL/6 Hintergrund. \*, p<0.05; n.s., nicht signifikant.



**Abb. 8:** Gefäßregulation in isoliert-perfundierten Nieren von SMMHC-*Agtr1a*<sup>-/-</sup> x *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Mäusen. **A, B:** Originalaufnahmen von Perfusionsdrücken in Nieren von nicht vorbehandelten *Agtr1a*<sup>+/+</sup> *Agtr1b*<sup>+/+</sup> Mäusen und von mit Tamoxifen-behandelten SMMHC-*Agtr1a*<sup>-/-</sup> x *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Mäusen. Reaktion auf Flussveränderung, Ang II (10 nM), Ca<sup>2+</sup> freie PSS Lösung. **C:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch Ang II (10 nM). **D:** Änderung des Perfusionsdrucks durch Exposition der Nieren mit Ca<sup>2+</sup> freier PSS Lösung **E:** Perfusionsdrücke bedingt durch Änderung der Flussrate (0.3 -1.9 ml/min) **F:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch 60 mM KCl. Für alle Abb., n=6; N=4 *Agtr1a*<sup>+/+</sup> x *Agtr1b*<sup>+/+</sup> und n=6; N=4 mit Tamoxifen-vorbehandelte SMMHC-*Agtr1a*<sup>-/-</sup> x *Agtr1b*<sup>-/-</sup>. w.o., wash-out. Alle Mäuse sind Nachkommen mit C57BL/6 Hintergrund. \*, p<0.05; n.s., nicht signifikant.

## 4. Diskussion

### Zusammenfassung

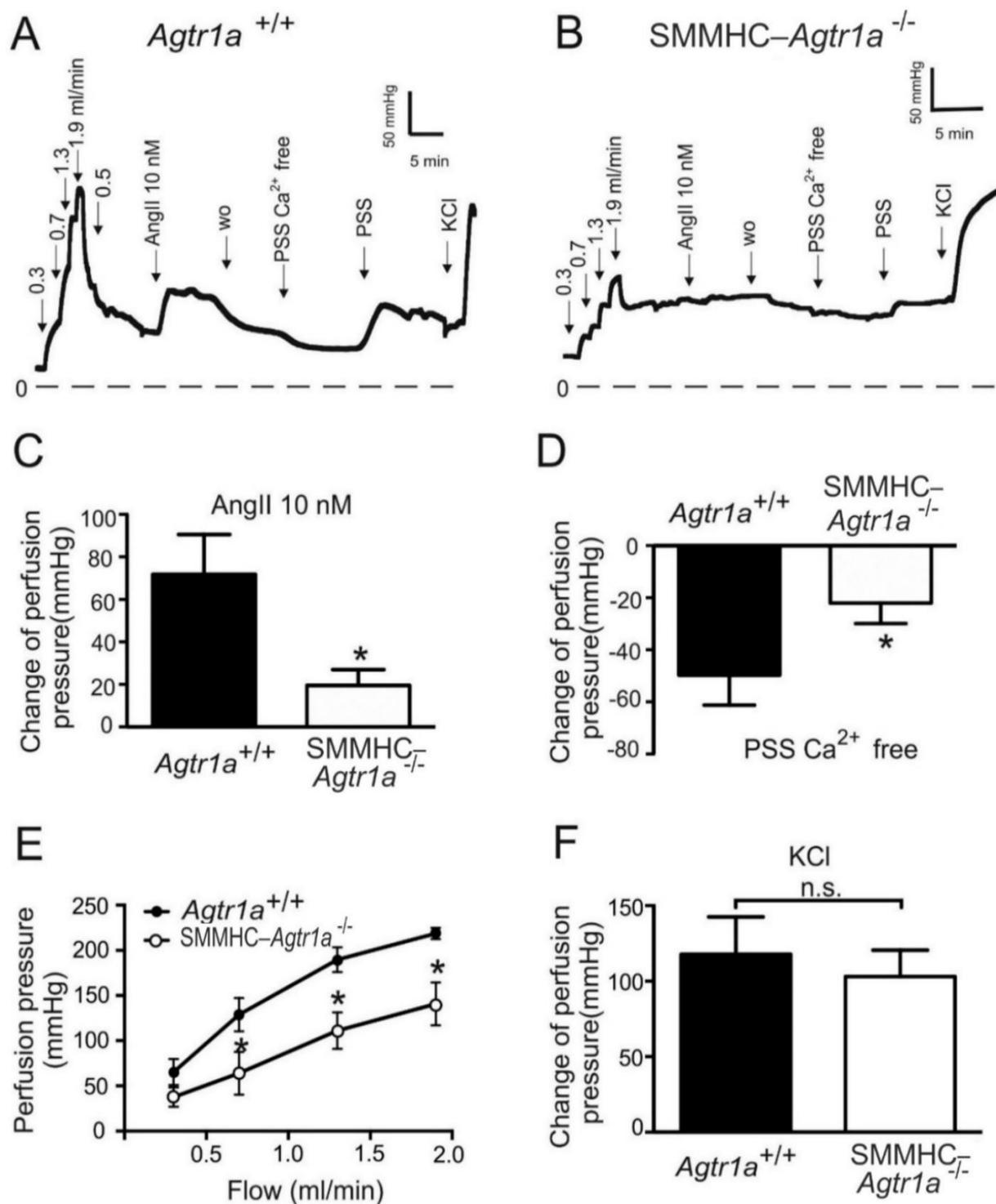
Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der Angiotensin II Typ-1a-Rezeptor der vorherrschende Rezeptorsubtyp bei der Regulation des myogenen Gefäßtonus ist und ob der myogene Tonus über den klassischen  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten oder den alternativen  $\beta$ -Arrestin abhängigen Signalweg vermittelt wird. In den durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Perfusionsdruck in Nieren mit *Agtr1a*<sup>+/+</sup> nach Hinzugabe von Ang II im Vergleich zu *Agtr1a*<sup>-/-</sup> signifikant höher resultierte. Dies spricht dafür, dass die Ang II-abhängige Vasokonstriktion über AT1a-Rezeptoren vermittelt wird.

Weiterhin wurde in den *Agtr1a*<sup>-/-</sup> Nieren ein signifikant geringerer Abfall des Perfusionsdrucks (myogener Tonus) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe beobachtet. Wiederum wurde zwischen den Nieren von *Agtr1b*<sup>+/+</sup> und *Agtr1b*<sup>-/-</sup> ein nicht signifikanter Unterschied des Perfusionsdruck-Abfalls nach Hinzugabe calciumfreier Lösung ermittelt. Dies weist darauf hin, dass die AT1a-Rezeptoren, nicht aber die AT1bR, für die myogene Autoregulation in der perfundierten Niere von Mäusen verantwortlich sind. Das Abschalten des *Agtr1b* erbrachte im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Ang II-vermittelten Kontraktion, somit scheinen die Ergebnisse am ehesten darauf hinzuweisen, dass dieser Mechanismus *Agtr1b*-unabhängig erfolgt.

Darüberhinaus wurde nach Inkubation der *Agtr1a*<sup>+/+</sup> Nieren mit dem selektiven  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Protein-Inhibitor FR900359, bei Hinzugabe von Ang II, eine minimale Erhöhung des Perfusionsdrucks im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eruiert. Nach Entfernen der externen Calciumionen konnte ein signifikant geringerer Abfall des myogenen Tonus in der mit FR900359 vorbehandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gemessen werden. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass der selektive  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Protein-Inhibitor FR900359 sowohl den myogenen Tonus als auch die Ang II-abhängige Konstriktion der Nierenarterien in der perfundierten Niere reduziert. Somit gehen wir am ehesten davon aus, dass die myogene Vasokonstriktion über den AT1aR und den kanonischen  $G_{q/11}$ -Signalweg in der isoliert-perfundierten Niere vermittelt wird. Bei Verwendung des funktionell selektiven Agonisten S II konnten zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede des Perfusionsdrucks in der Niere nachgewiesen werden. Der „biased“ Agonist scheint somit keinen Einfluss auf die Vermittlung des myogenen Tonus in der perfundierten Mausnieren zu haben.

Auf Grundlage der bereits erhobenen Ergebnisse, führten wir Untersuchungen am konditionellen Cre/lox- und Tamoxifen-induzierten *Agtr1a* Knockout Modell (SMMHC–*Agtr1a*<sup>-/-</sup> x *Agtr1b*<sup>-/-</sup>) durch. Ohne Behandlung mit Tamoxifen würde es sich dabei um ein *Agtr1a*<sup>+/+</sup> x *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Modell handeln, bei dem wir nach Gabe von Ang II einen deutlichen Anstieg des Perfusionsdrucks sowie nach Hinzugabe von calciumfreier Lösung einen markanten Abfall eben dieses Druckes erwarten würden. Nach Behandlung mit Tamoxifen, also nach induziertem *Agtr1a* Knockout, mutmaßten wir eine geringe Steigerung des Perfusionsdrucks durch Behandlung mit Ang II und ferner einen reduzierten Abfall des Perfusionsdrucks nach Hinzugabe von calciumfreier Lösung im Vergleich zum *Agtr1a*<sup>+/+</sup> Modell. Dementgegen erhoben wir bei der Behandlung mit Ang II und bei Beurteilung des myogenen Tonus keine signifikanten Unterschiede zwischen der konditionellen Knockout- und der Vergleichsgruppe. Diese Ergebnisse gleichen jenen der Versuchsreihe an den *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Nieren (s. Abb. 7). Sie lassen darauf schließen, dass das *Agtr1a*-Gen in den Nierengefäßen nicht funktionell ausgeschaltet wurde, vermutlich bedingt durch eine spontane Inaktivierung des Cre/loxP-Systems in den primär verwendeten Doppel-Knockout-(SMMHC–*Agtr1a*<sup>-/-</sup> x *Agtr1b*<sup>-/-</sup>) Mäusen, möglicherweise ausgelöst durch eine Punktmutation im Cre-Gen (Heffner et al., 2012). Wie in Heffner et al. veröffentlicht, ist dies eine der beschriebenen Limitationen des verwendeten Mausmodells und mittels Genotypisierung nicht erkennbar gewesen. In der Bewertung der Ergebnisse ist somit **nicht** von einem erfolgreich induzierten Doppel-Knockout auszugehen, sondern von einem *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Tiermodell.

Durch Rückkreuzung der SMMHC-Cre-Mauslinie aus der nachweislich funktionierenden SMMHC–*Ryr2*<sup>-/-</sup> Mauslinie (Kaßmann et al., 2019), gelang es nach Abschluss dieser Dissertation, den AT1aR in den glatten Gefäßmuskelzellen von Nieren-, Mesenterial- und Hirnarterien Tamoxifen-induzierbar auszuschalten. Es konnte gezeigt werden, dass der AT1aR der vorherrschende Rezeptorsubtyp in der Regulation des myogenen Gefäßtonus ist und die fehlende Expression des AT1bR keinen Einfluss auf den myogenen Tonus und die Ang II-vermittelte Kontraktion hat. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 9 sowie in der Veröffentlichung von Cui et al. (2020). Somit bestärken diese Ergebnisse die anfängliche Hypothese, dass der AT1aR die Ang II- abhängige Vasokonstriktion sowie die myogene Verengung in glatten Muskelzellen der Nierenarterien von Mäusen vermittelt.



**Abb. 9:** Gefäßregulation in isoliert-perfundierten Nieren von SMMHC-*Agtr1a*<sup>-/-</sup> (modifiziert aus Cui et al., 2020). **A, B:** Originalaufnahmen von Perfusionsdrücken in Nieren nicht vorbehandelter *Agtr1a*<sup>+/+</sup> Mäuse (**A**) und von mit Tamoxifen-behandelten SMMHC-*Agtr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen (**B**). **C:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch Ang II (10 nM). **D:** Änderung des Perfusionsdrucks durch Exposition der Nieren mit Ca<sup>2+</sup> freier PSS Lösung. **E:** Perfusionsdrücke bedingt durch Änderung der Flussrate (0.3 -1.9 ml/min) **F:** Anstieg des Perfusionsdrucks induziert durch 60 mM KCl. Für alle Abb., n=6; N=6 *Agtr1a*<sup>+/+</sup> und n=6; N=5 mit Tamoxifen- vorbehandelte SMMHC-*Agtr1a*<sup>-/-</sup>. w.o., wash-out. \*, p<0.05; n.s., nicht signifikant.

## Schlüsselrolle des AT1aR als Mechanosensor

Der AT1-Rezeptor wird in Nagetieren in zwei Isoformen exprimiert, AT1a und AT1b, wobei der AT1aR der vorherrschende Subtyp in den meisten Geweben ist, die an der Ang II vermittelten Gefäßkontraktion und der Blutdruckregulation beteiligt sind (Hercule et al., 2007; Iwai & Inagami, 1992; Madhun et al., 1993). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der systemische Blutdruck in *Agtr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu *Agtr1a*<sup>+/+</sup> Mäusen signifikant reduziert ist (Guo et al., 2001; Gurley et al., 2011; Ito et al., 1995). Weiterhin beschrieben Guo et al., dass die fehlende Expression des AT1bR keinen signifikanten Unterschied des Blutdrucks erzeuge (Guo et al., 2001).

Diese Erkenntnisse sind kongruent zu unseren Versuchsergebnissen, in denen eine unauffällige myogene Autoregulation isolierter *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Nieren gemessen werden konnte, wohingegen der myogene Tonus sowie die Reaktion auf Ang II in Nieren ohne Expression des *Agtr1a*-Gens stark reduziert war.

Diesem widersprechen Ergebnisse von Blodow et al. und Pires et al. mit Untersuchungen des Gefäßtonus an Mesenterial- und Zerebralarterien von *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Mäusen. Hierbei konnte ein deutlich reduzierter Gefäßtonus ermittelt werden. Dieses würde eine mögliche Rolle des AT1bR in der Liganden-unabhängigen Signalvermittlung durch mechanischen Druck bedeuten (Blodow et al., 2014; Pires et al., 2017). Dabei hielten Blodow et al. fest, dass AT1bR unabhängig von den Rezeptorexpressionsniveaus mechanosensitiver sind als AT1aR. Pires et al. zeigten, dass der AT1bR der primäre intraluminale Mechanosensor in den Arterien der weichen Hirnhautschicht (Pia Mater) sei (Pires et al., 2017). Bei der Bewertung dieses Ergebnisses ist davon auszugehen, dass in diesem spezifischen Gewebe – im Gegensatz zur Niere – der AT1bR der vorherrschende Rezeptortyp ist und damit für die Vermittlung des myogenen Tonus sorgt (Lenkei et al., 1997; Yamasaki et al., 2020). Weiterhin sind Kompensationsmechanismen des Organismus denkbare Limitationen der bisher beschriebenen Tiermodelle mit einer kompletten Gendelektion, bei denen es möglicherweise zur vermehrten Aktivierung des sympathischen Nervensystems und zu einer Restaktivität von anderen supprimierten mechanoaktivierbaren Rezeptoren, wie den Endothelin- oder den Vasopressinrezeptoren, kommen kann (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Um diesen möglichen Fehler auszuschließen, verwendeten wir ein Mausmodell mit einem kurzfristig (über Tamoxifen) induzierbaren *Agtr1a* Knockout. Es zeigten sich sowohl ein verminderter myogener Tonus als auch eine reduzierte arterielle Gefäßkontraktion in den

Nierenarterien nach Ang II-Gabe (Cui et al., 2020). Diese Erkenntnis stimmte mit den vorher erhobenen Ergebnissen überein, dass der AT1aR eine Schlüsselrolle als Mechanosensor spielt, der den myogenen Tonus in den Nierengefäßen der Maus vermittelt.

Dieses bekräftigt die Ergebnisse von Sparks et al. und Schleifenbaum et al., wonach der AT1aR in glatten Gefäßmuskelzellen für die Regulierung des renalen Blutflusses durch Ang II sowie die Kontrolle der Natriuresis und des Blutdrucks unentbehrlich sei (Schleifenbaum et al., 2014; Sparks et al., 2015).

### **Der kanonische $G_{q/11}$ - Signalweg des AT1aR bewirkt den myogenen Gefäßtonus in der Niere**

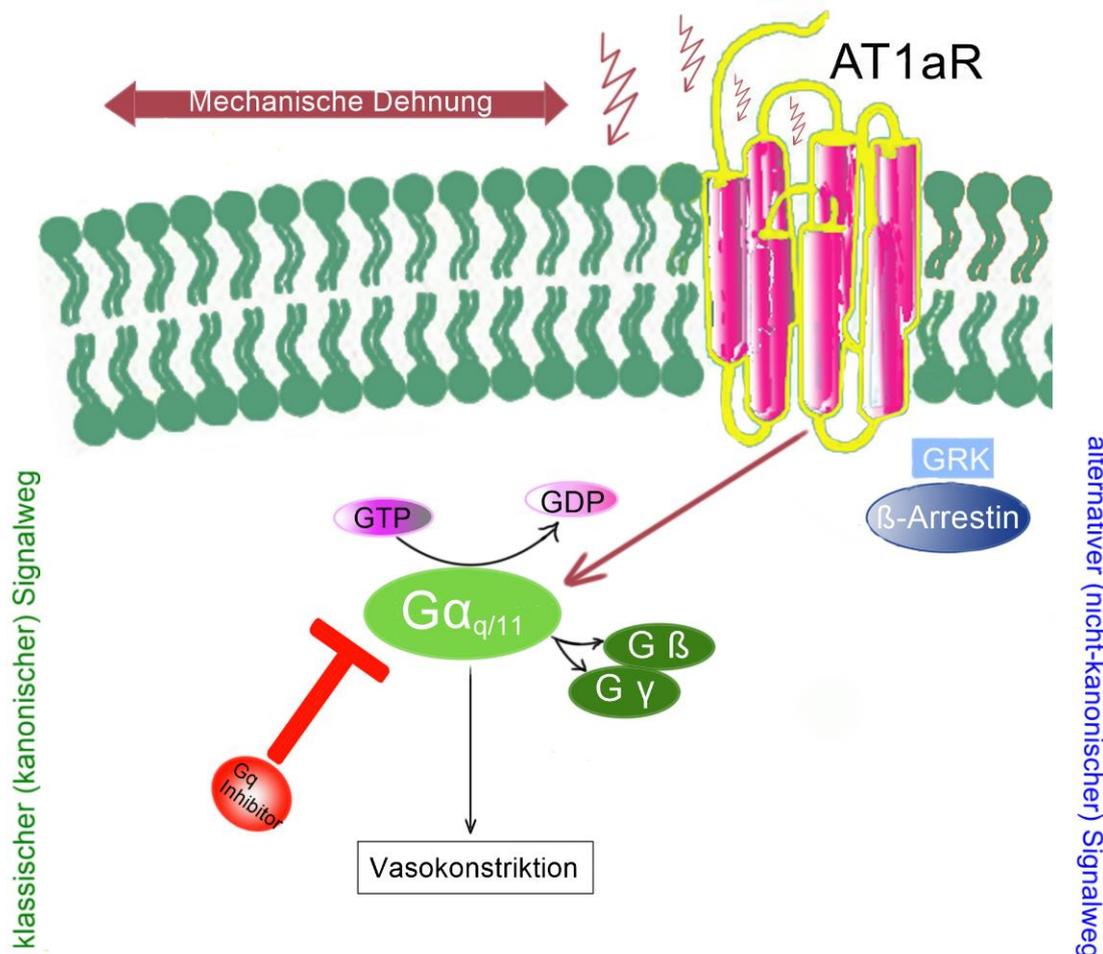
Als myogene Vasokonstriktion wird die Fähigkeit der glatten Muskulatur von Widerstandsgefäßen verstanden, sich als Reaktion auf eine Dehnung zu kontrahieren und damit einen konstanten Blutfluss zu gewährleisten (Kauffenstein et al., 2016).

Wie in Cui et al. abgebildet, ergaben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass der Perfusionsdruck und damit der renale Gefäßwiderstand in isoliert-perfundierten Nieren bei festgelegten Flussraten in der SM-*Agtr1a*<sup>-/-</sup>-Niere signifikant reduziert war (siehe Abb. 9 E). Bereits Schleifenbaum et al. beschrieben die Tatsache, dass der AT1aR eine myogene Konstriktion vermittelt, die Liganden-unabhängig funktioniert (Schleifenbaum et al., 2014). Weiterhin berichteten Tang et al., dass die Membrandehnung eine Konformationsänderung des AT1aR induziert, die derjenigen von funktionell selektiven  $\beta$ -Arrestin Liganden ähnele (Tang et al., 2014).

Nach bislang verbreiteter Lehrmeinung bewirkte die mechanische Dehnung der Gefäßmuskelzelle in Abwesenheit eines Agonisten eine G-Protein-unabhängige AT1R-Signalkaskade und eine  $\beta$ -Arrestin vermittelte Signalweiterleitung (Rakesh et al., 2010), die zu einem Calciumeinstrom über spannungsgesteuerte Calciumkanäle und einer Aktivierung der PLC, DAG und PKC führt (Coats, 2001). Rakesh et al. konnten anhand von Experimenten nachweisen, dass in Mäuseherzen, denen  $\beta$ -Arrestin oder AT1R fehlten, keine Reaktionen auf mechanische Dehnung induziert werden konnte. Des Weiteren kam es bei diesen Mäusen zu einer verminderten ERK und Akt-Aktivierung und führte zu einer abgeschwächten EGFR Stimulation sowie zu einer gesteigerten Apoptose von Myozyten (Rakesh et al., 2010).

Im Gegensatz dazu konnten wir darlegen, dass unter Verwendung des selektiven  $G_{q/11}$ -Protein-Inhibitors FR900359, der inaktiv auf G-Protein-unabhängigen, Arrestin-

vermittelten Signalwegen ist (Schrage et al., 2015), eine Verringerung des myogenen Tonus und der Ang II vermittelten Vasokonstriktion in Nierenarterien bewirkt werden konnte. Wie in Abb. 10 dargestellt, implizieren diese Daten, dass der myogene Tonus also über einen kanonischen  $G_{q/11}$ -Signalweg vom AT1aR zumindest in den Nierenarterien erzeugt wird. Damit einhergehend ist der myogene Tonus in Widerstandsgefäßen erhöht, wenn der Regulator des G-Protein-Signalwegs-2 (RGS2) fehlt. Dieser RGS2 ist verantwortlich für die Beendigung der kanonischen  $G_{q/11}$ -gekoppelten Signalwege (Mederos y Schnitzler et al., 2008).



**Abb. 10:** Die kanonische  $G_{q/11}$ -Signalkaskade vermittelt den myogenen Tonus. Der  $G_{q/11}$ -Inhibitor sorgt für eine Verminderung der myogenen Vasokonstriktion. Die  $\beta$ -Arrestine sind nicht an der Vermittlung des myogenen Tonus beteiligt. GRK= G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase.

Wir folgern daher, dass die AT1aR, die an die  $G_{q/11}$ -Signaltransduktion gekoppelt sind, eine wesentliche Komponente der dynamischen mechano-chemischen Signalgebung in arteriellen Gefäßmuskelzellen darstellen, die den myogenen Tonus in der perfundierten Niere erzeugen.

Dies ist konkordant zu vorangegangenen Arbeiten anderer Gruppen (Chennupati et al., 2019; Kauffenstein et al., 2012; Wirth et al., 2008), nach welchen die G<sub>12</sub>- und G<sub>13</sub>-Protein gekoppelten Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der myogenen Vasokonstriktion einnehmen könnten. Dabei ist anzunehmen, dass diese synergistisch mit den G<sub>q</sub>PCR und über eine Rho-vermittelte Signalkaskade wirken.

Der AT1R kann also Liganden-unabhängig, durch einen klassischen Agonisten über den kanonischen G-Protein-abhängigen Weg oder durch einen funktionell selektiven  $\beta$ -Arrestin-Liganden auf nicht-kanonische Weise aktiviert werden.

### **Funktioneller Agonismus als vielversprechender Therapieansatz**

Da der AT1aR im Besonderen an der Entstehung von arteriellem Hypertonus, Atherosklerose und kardialer Hypertrophie beteiligt ist (Kendall et al., 2011), rücken die Konsequenzen der nicht-klassischen AT1R-Signalwirkung zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Forschung.

Aus diesem Grund wurden in dieser Studie die Signalkaskaden und Gefäßantworten, die durch die sogenannten „biased“ Agonisten an den AT1R ausgelöst werden, untersucht. Vorbekannt war, dass osmotische Zelldehnung in Zellkulturen zu einer Konformationsänderung des AT1R durch  $\beta$ -Arrestin 2 führt, die die Bindungsaffinität ausschließlich für funktionell selektive  $\beta$ -Arrestin Agonisten, nicht aber für klassische Agonisten, erhöht (Tang et al., 2014). Weitere In-vitro-Arbeiten zeigten, dass eine selektive Bindung von  $\beta$ -Arrestin am AT1R die Kontraktilität sowie die zelluläre Motilität fördert und MAPK-Wege in einer G-Protein- und Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen Weise aktiviert (Grisanti et al., 2018; Simard et al., 2013).

Des Weiteren beschrieben Violin et al., dass S II den arteriellen Mitteldruck (MAP) senke; sowie die kardiale Kontraktilität (Violin et al., 2010) und den renalen Blutfluss von Hunden mit einer Herzinsuffizienz (Boerrigter et al., 2011) erhöhe. Aus diesem Grund werden die funktionell selektiven Agonisten als potenziell neue Therapeutika in der Behandlung akuter Herzinsuffizienzen gehandelt. Vorteilhaft hierbei im Vergleich zu herkömmlichen Therapien mit Sartanen ist die möglicherweise verbesserte Wirksamkeit sowie ein kleineres Nebenwirkungsspektrum (Whalen et al., 2011). Funktionell selektive Agonisten vermitteln auf molekularer Ebene über GRKs und  $\beta$ -Arrestine eine Rezeptorendozytose und desensibilisieren den GPCR (Lefkowitz, 2004).

In der vorgelegten Versuchsdurchführung zeigte sich allerdings keine Wirkung von S II auf den Gefäßtonus der isoliert-perfundierten Niere. Das bedeutet, dass der funktionell

selektive Agonist S II zu keiner messbaren Veränderung des Perfusionsdrucks über die nicht-kanonische  $G_{q/11}$ -Protein-vermittelte Signaltransduktion geführt hat.

Ahn et al. beschrieben, dass die von S II ausgelöste ERK 1 / 2 Aktivierung vollständig  $\beta$ -Arrestin-2-abhängig sei (Ahn, Wei, et al., 2004). Der durch  $\beta$ -Arrestin getriggerte ERK 1 / 2-Pool verbleibt im Zytosol und führt zu einer Regulation der Proteinsynthese und vermittelt eine anti-apoptotische Signalgebung. Aplin et al. konnten hingegen im adulten Mausmodell weder inotrope noch chronotrope Effekte durch S II beobachten (Aplin et al., 2007).

Auch wenn es vermutlich aufgrund einer geringen Affinität und Selektivität von S II zum AT1R (Grisanti et al., 2018; K. Rajagopal et al., 2006) in unserer Studie nicht gelang die Eigenschaften des funktionell selektiven  $\beta$ -Arrestin Agonisten zu beschreiben, kommt TRV120027 als neue Therapieoption in der Behandlung kindlicher Herzinsuffizienz infrage (Kashihara et al., 2020).

Antihypertensive Blutdruckeffekte von TRV120027 wurden bislang nicht untersucht. Es wird allerdings beschrieben, dass das Medikament in neonatalen Mäusen zu einer positiven Inotropie ohne Einfluss auf die Chronotropie, den Sauerstoffbedarf oder die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies geführt hat. Es wird weiterhin spezifiziert, dass TRV120027 im Vergleich zu Katecholaminen in der Lage ist, die Nachlast durch allosterische  $G_{q/11}$ -Inhibition in glatten Gefäßmuskelzellen und die Vorlast, durch verstärkte Natriurese, zu senken (Kashihara et al., 2020).

Kürzlich erfolgte klinische Studien, die mit TRV120027 an Erwachsenen mit akuter Herzinsuffizienz durchgeführt wurden, zeigten jedoch keinen Nutzen des Medikaments im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe (Manglik et al., 2020). Aufgrund der hohen Sicherheit und des minimalen Nebenwirkungsspektrums dieses Medikaments ist es dennoch eine vielversprechende Substanz, an der künftig weiterhin verstärkt geforscht werden sollte. Eine aufkommende Hypothese in der SARS-CoV2-n2019-Pandemie ist, dass TRV12027 einen nachweisbaren Nutzen in der Behandlung von Patienten mit akutem Lungenversagen (ARDS) haben könnte (Manglik et al., 2020). Es wird verdeutlicht, dass das Virus über den ACE2-Rezeptor an der Plasmamembran bindet und somit nach Internalisierung zu einem verminderten Aktivitätslevel des Rezeptors führt. Dieser Rezeptor hat die physiologische Aufgabe Ang II zu degradieren und das Hormon in  $\beta$ -Arrestin-selektive Liganden, Ang (1-7), umzuwandeln, die im Vergleich zu Ang II kardioprotektive Effekte vermitteln können. Die Virusbindung an den ACE2-R führt daher zu einem verminderten Abbau von Ang II. Damit überwiegen die destruktiven Wirkungen

des Ang II wie die Verengung und die erhöhte Permeabilität der Gefäße, Fibrosierung und damit akute Organschädigungen (Manglik et al., 2020). TRV120027 wird daher als neues mögliches Medikament in der Therapie des akuten Lungenversagens gehandelt, welches als allosterischer Modulator am AT-Rezeptor kardioprotektive, vasodilatative und anti-inflammatorische Effekte vermitteln könnte.

Unsere Arbeitsgruppe arbeitete nach Abschluss der Experimente dieser Dissertation heraus, dass durch die funktionell selektiven  $G_q$ -Protein-Liganden TRV120055 und TRV120056 eine signifikante Vasokonstriktion in Nierenarterien ausgelöst werden kann (Cui et al., 2020). Des Weiteren zeigte sich ein deutlicher Abfall des Perfusionsdrucks nach externer Calciumionenelimination. Dies zeigt, dass der AT1aR den myogenen Tonus sowie die Vasokonstriktion über kanonische  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte und nicht über  $\beta$ -Arrestin Signalwege vermittelt (Cui et al., 2020). Diese Ergebnisse sind Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente zur Senkung eines erhöhten oder dysregulierten arteriellen Gefäßtonus.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ahn, S., Shenoy, S. K., Wei, H. & Lefkowitz, R. J. (2004). Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *The Journal of biological chemistry*, 279(34), 35518–35525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405878200>
- Ahn, S., Wei, H., Garrison, T. R. & Lefkowitz, R. J. (2004). Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. *The Journal of biological chemistry*, 279(9), 7807–7811. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300443200>
- Aplin, M., Christensen, G. L., Schneider, M., Heydorn, A., Gammeltoft, S., Kjølbye, A. L., Sheikh, S. P. & Hansen, J. L. (2007). The angiotensin type 1 receptor activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by G protein-dependent and -independent pathways in cardiac myocytes and langendorff-perfused hearts. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 100(5), 289–295. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00063.x>
- Balakumar, P. & Jagadeesh, G. (2014). A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular pathophysiology. *Cellular Signalling*, 26(10), 2147–2160. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.06.011>
- Bayliss, W. M. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology*, 28(3), 220–231. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1902.sp000911>
- Benovic, J. L. & Keen, J. H. (2004). Signaling Down the Endocytic Pathway. In R. A. Bradshaw & E. A. Dennis (Hrsg.), *Handbook of cell signaling* (S. 441–448). Acad. Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012124546-7/50695-1>

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2013). *Stryer Biochemie* (A. Held, C. Lange, K. Mahlke, G. Maxam, L. Seidler, N. Zellerhoff, B. Häcker & B. Jarosch, Übers.) (7. Auflage). Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer Spektrum. <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1568235>
- Blodow, S., Schneider, H., Storch, U., Wizemann, R., Forst, A.-L., Gudermann, T. & Mederos y Schnitzler, M. (2014). Novel role of mechanosensitive AT1B receptors in myogenic vasoconstriction. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 466(7), 1343–1353. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1372-3>
- Boerrigter, G., Lark, M. W., Whalen, E. J., Soergel, D. G., Violin, J. D. & Burnett, J. C. (2011). Cardiorenal actions of TRV120027, a novel  $\beta$ -arrestin-biased ligand at the angiotensin II type I receptor, in healthy and heart failure canines: a novel therapeutic strategy for acute heart failure. *Circulation. Heart failure*, 4(6), 770–778. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.962571>
- Carlström, M., Wilcox, C. S. & Arendshorst, W. J. (2015). Renal autoregulation in health and disease. *Physiological Reviews*, 95(2), 405–511. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2012>
- Cervantes, D., Crosby, C. & Xiang, Y. (2010). Arrestin orchestrates crosstalk between G protein-coupled receptors to modulate the spatiotemporal activation of ERK MAPK. *Circulation research*, 106(1), 79–88. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198580>
- Chennupati, R., Wirth, A., Favre, J., Li, R., Bonnavion, R., Jin, Y.-J., Wietelmann, A., Schweda, F., Wettschureck, N., Henrion, D. & Offermanns, S. (2019). Myogenic vasoconstriction requires G12/G13 and LARG to maintain local and systemic vascular resistance. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.49374>
- Coats, P. (2001). Signalling mechanisms underlying the myogenic response in human subcutaneous resistance arteries. *Cardiovascular Research*, 49(4), 828–837. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00314-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00314-X)
- Cui, Y., Kaßmann, M., Nickel, S., Zhang, C., Alenina, N., Anistan, Y.-M., Schleifenbaum, J., Bader, M., Welsh, D. G., Huang, Y. & Gollasch, M. (2020). Myogenic Vasoconstriction Requires Canonical G q/11 Signaling of the Angiotensin II Type 1a Receptor in the Murine Vasculature. *bioRxiv*, 2020.09.09.289280. <https://doi.org/10.1101/2020.09.09.289280>
- Davis, M. J. (2012). Perspective: physiological role(s) of the vascular myogenic response. *Microcirculation*, 19(2), 99–114. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00131.x>
- Davis, M. J. & Hill, M. A. (1999). Signaling Mechanisms Underlying the Vascular Myogenic Response. <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.1999.79.2.387>
- Dewire, S. M., Kim, J., Whalen, E. J., Ahn, S., Chen, M. & Lefkowitz, R. J. (2008). Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 283(16), 10611–10620. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710515200>
- Ercu, M., Markó, L., Schächterle, C., Tsvetkov, D., Cui, Y., Maghsodi, S., Bartolomaeus, T. U. P., Maass, P. G., Zühlke, K., Gregersen, N., Hübner, N., Hodge, R., Mühl, A., Pohl, B., Illas, R. M., Geelhaar, A., Walter, S., Napieczynska, H., Schelenz, S., . . . Klusmann, E. (2020). Phosphodiesterase 3A and Arterial Hypertension. *Circulation*, 142(2), 133–149. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043061>

- Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C. D., Wang, S., Eckhardt, A. E., Cowan, C. L., Spurney, R. F., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *The Journal of biological chemistry*, 281(16), 10856–10864. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513380200>
- Gomes, I., Ayoub, M. A., Fujita, W., Jaeger, W. C., Pflieger, K. D. G. & Devi, L. A. (2016). G Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 56, 403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135952>
- Grisanti, L. A., Schumacher, S. M., Tilley, D. G. & Koch, W. J. (2018). Designer Approaches for G Protein-Coupled Receptor Modulation for Cardiovascular Disease. *JACC. Basic to translational science*, 3(4), 550–562. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.12.002>
- Groneberg, D., König, P., Wirth, A., Offermanns, S., Koesling, D. & Friebe, A. (2010). Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation*, 121(3), 401–409. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.890962>
- Guo, D. F., Sun, Y. L., Hamet, P. & Inagami, T. (2001). The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell research*, 11(3), 165–180. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290083>
- Gurley, S. B., Riquier-Brison, A. D. M., Schnermann, J., Sparks, M. A., Allen, A. M., Haase, V. H., Snouwaert, J. N., Le, T. H., McDonough, A. A., Koller, B. & Coffman, T. M. (2011). AT1A angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure. *Cell Metabolism*, 13(4), 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.001>
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *The Journal of biological chemistry*, 273(2), 669–672. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.669>
- Hanson, C. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. (2004). Cell signalling: IP3 receptors channel calcium into cell death. *Current Biology*, 14(21), R933-5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.019>
- Heffner, C. S., Herbert Pratt, C., Babiuk, R. P., Sharma, Y., Rockwood, S. F., Donahue, L. R., Eppig, J. T. & Murray, S. A. (2012). Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. *Nature communications*, 3, 1218-. <https://doi.org/10.1038/ncomms2186>
- Heinze, C., Seniuk, A., Sokolov, M. V., Huebner, A. K., Klementowicz, A. E., Szijsártó, I. A., Schleifenbaum, J., Vitzthum, H., Gollasch, M., Ehmke, H., Schroeder, B. C. & Hübner, C. A. (2014). Disruption of vascular Ca<sup>2+</sup>-activated chloride currents lowers blood pressure. *The Journal of clinical investigation*, 124(2), 675–686. <https://doi.org/10.1172/JCI70025>
- Hercule, H. C., Tank, J., Plehm, R., Wellner, M., Da Costa Goncalves, A. C., Gollasch, M., Diedrich, A., Jordan, J., Luft, F. C. & Gross, V. (2007). Regulator of G protein signalling 2 ameliorates angiotensin II-induced hypertension in mice. *Experimental Physiology*, 92(6), 1014–1022. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.038240>
- Hodavance, S. Y., Gareri, C., Torok, R. D. & Rockman, H. A. (2016). G Protein-coupled Receptor Biased Agonism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 67(3), 193–202. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000356>

- Hoffmann, C., Ziegler, N., Reiner, S., Krasel, C. & Lohse, M. J. (2008). Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *The Journal of biological chemistry*, 283(45), 30933–30941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801472200>
- Holloway, A. C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S., Southwell, B. R., Lew, M. J. & Thomas, W. G. (2002). Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Molecular Pharmacology*, 61(4), 768–777. <https://doi.org/10.1124/mol.61.4.768>
- Hong, K., Zhao, G., Hong, Z., Sun, Z., Yang, Y., Clifford, P. S., Davis, M. J., Meininger, G. A. & Hill, M. A. (2016). Mechanical activation of angiotensin II type 1 receptors causes actin remodelling and myogenic responsiveness in skeletal muscle arterioles. *The Journal of physiology*, 594(23), 7027–7047. <https://doi.org/10.1113/JP272834>
- Hunyady, L. & Catt, K. J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular Endocrinology*, 20(5), 953–970. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0536>
- Inamdar, V., Patel, A., Manne, B. K., Dangelmaier, C. & Kunapuli, S. P. (2015). Characterization of UBO-QIC as a Gαq inhibitor in platelets. *Platelets*, 26(8), 771–778. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.998993>
- Iriki, M., Murata, S., Nagai, M. & Tsuchiya, K. (1976). Effects of thermal stimulation to the spinal cord on heart rate in cyprinid fishes. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, 53(1), 61–63. [https://doi.org/10.1016/s0300-9629\(76\)80011-4](https://doi.org/10.1016/s0300-9629(76)80011-4)
- Ito, M., Oliverio, M. I., Mannon, P. J., Best, C. F., Maeda, N., Smithies, O. & Coffman, T. M. (1995). Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3521–3525. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3521>
- Iwai, N. & Inagami, T. (1992). Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Letters*, 298(2-3), 257–260. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80071-N](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80071-N)
- Jaggar, J. H., Wellman, G. C., Heppner, T. J., Porter, V. A., Perez, G. J., Gollasch, M., Kleppisch, T., Rubart, M., Stevenson, A. S., Lederer, W. J., Knot, H. J., Bonev, A. D. & Nelson, M. T. P. (1998). Ca<sup>2+</sup> channels, ryanodine receptors and Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta physiologica Scandinavica*, 164(4), 577–587. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.00462.x>
- Janssen, B. J. A. & Smits, J. F. M. (2002). Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetic modification. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 282(6), R1545-64. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00714.2001>
- Kashihara, T., Kawagishi, H., Nakada, T., Numaga-Tomita, T., Kadota, S., Wolf, E. E., Du, C.-K., Shiba, Y., Morimoto, S. & Yamada, M. (2020). β-Arrestin-Biased AT1 Agonist TRV027 Causes a Neonatal-Specific Sustained Positive Inotropic Effect Without Increasing Heart Rate. *JACC. Basic to translational science*, 5(11), 1057–1069. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.08.011>
- Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L. & Loscalzo, J. (2016). *Harrisons Innere Medizin* (N. Suttorp, M. Möckel, B. Siegmund & M. Dietel, Hg.) (19. Auflage, in Zusammenarbeit mit der Charité). ABW Wissenschaftsverlag.

- Kaßmann, M., Szijártó, I. A., García-Prieto, C. F., Fan, G., Schleifenbaum, J., Anistan, Y.-M., Tabeling, C., Shi, Y., Le Noble, F., Witzentrath, M., Huang, Y., Markó, L., Nelson, M. T. P. & Gollasch, M. (2019). Role of Ryanodine Type 2 Receptors in Elementary Ca<sup>2+</sup> Signaling in Arteries and Vascular Adaptive Responses. *Journal of the American Heart Association*, 8(9), e010090. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010090>
- Kauffmanstein, G., Laher, I., Matrougui, K., Guérineau, N. C. & Henrion, D. (2012). Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. *Cardiovascular Research*, 95(2), 223–232. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs152>
- Kauffmanstein, G., Tamarelle, S., Prunier, F., Roy, C., Ayer, A., Toutain, B., Billaud, M., Isakson, B. E., Grimaud, L., Loufrani, L., Rousseau, P., Abraham, P., Procaccio, V., Monyer, H., Wit, C. de, Boeynaems, J.-M., Robaye, B., Kwak, B. R. & Henrion, D. (2016). Central Role of P2Y<sub>6</sub> UDP Receptor in Arteriolar Myogenic Tone. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(8), 1598–1606. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307739>
- Kenakin, T. (2007). Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Molecular pharmacology*, 72(6), 1393–1401. <https://doi.org/10.1124/mol.107.040352>
- Kendall, R. T., Strungs, E. G., Rachidi, S. M., Lee, M.-H., El-Shewy, H. M., Luttrell, D. K., Janech, M. G. & Luttrell, L. M. (2011). The beta-arrestin pathway-selective type 1A angiotensin receptor (AT1A) agonist Sar1,Ile4,Ile8angiotensin II regulates a robust G protein-independent signaling network. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19880–19891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233080>
- Kim, J., Ahn, S., Ren, X.-R., Whalen, E. J., Reiter, E., Wei, H. & Lefkowitz, R. J. (2005). Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1442–1447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409532102>
- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(4), 794–807. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.021>
- Kovacs, J. J., Hara, M. R., Davenport, C. L., Kim, J. & Lefkowitz, R. J. (2009). Arrestin development: emerging roles for beta-arrestins in developmental signaling pathways. *Developmental cell*, 17(4), 443–458. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.011>
- Kule, C. E., Karoor, V., Day, J. N. E., Thomas, W. G., Baker, K. M., Dinh, D., Acker, K. A. & Booz, G. W. (2004). Agonist-dependent internalization of the angiotensin II type one receptor (AT1): role of C-terminus phosphorylation in recruitment of beta-arrestins. *Regulatory Peptides*, 120(1-3), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.03.001>
- Lefkowitz, R. J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 25(8), 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.06.006>
- Lefkowitz, R. J. (2013). A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 52(25), 6366–6378. <https://doi.org/10.1002/anie.201301924>
- Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P. & Llorens-Cortes, C. (1997). Distribution of angiotensin type-1 receptor messenger RNA expression in the adult rat brain. *Neuroscience*, 82(3), 827–841. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00328-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00328-X)

- Li, W., Xu, J., Kou, X., Zhao, R., Zhou, W. & Fang, X. (2018). Single-molecule force spectroscopy study of interactions between angiotensin II type 1 receptor and different biased ligands in living cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(14), 3275–3284. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0956-3>
- Lian, X., Beer-Hammer, S., König, G. M., Kostenis, E., Nürnberg, B. & Gollasch, M. (2018). RXFP1 Receptor Activation by Relaxin-2 Induces Vascular Relaxation in Mice via a Gαi2-Protein/PI3Kβ/γ/Nitric Oxide-Coupled Pathway. *Frontiers in physiology*, 9, 1234. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01234>
- Lin, Y. & Smrcka, A. V. (2011). Understanding molecular recognition by G protein βγ subunits on the path to pharmacological targeting. *Molecular Pharmacology*, 80(4), 551–557. <https://doi.org/10.1124/mol.111.073072>
- Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (2002). (beta)-arrestins in GPCR signaling. *Journal of Cell Science*. <https://jcs.biologists.org/content/joces/115/3/455.full.pdf>
- Ma, L. & Pei, G. (2007). Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 2), 213–218. <https://doi.org/10.1242/jcs.03338>
- Madhun, Z. T., Ernsberger, P., Ke, F.-C., Zhou, J., Hopfer, U. & Douglas, J. G. (1993). Signal transduction mediated by angiotensin II receptor subtypes expressed in rat renal mesangial cells. *Regulatory Peptides*, 44(2), 149–157.
- Manglik, A., Wingler, L. M., Rockman, H. A. & Lefkowitz, R. J. (2020). β-Arrestin-Biased Angiotensin II Receptor Agonists for COVID-19. *Circulation*, 142(4), 318–320. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048723>
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Essin, K., Gollasch, M. & Gudermann, T. (2008). Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *The EMBO Journal*, 27(23), 3092–3103. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.233>
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J. W., Hofmann, F. & Klugbauer, N. (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *The EMBO Journal*, 22(22), 6027–6034. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg583>
- Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J. F. & Standen, N. B. (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *The American journal of physiology*, 259(1 Pt 1), C3-18. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.259.1.C3>
- Nuber, S., Zabel, U., Lorenz, K., Nuber, A., Milligan, G., Andrew B. Tobin, Lohse, M. J. & Hoffmann, C. (2016). β-Arrestin biosensors reveal a rapid, receptor-dependent activation/deactivation cycle. *Nature*.
- Oliverio, M. I., Kim, H.-S., Ito, M., Le, T. H., Audoly, L., Best, C. F., Hiller, S., Kluckman, K., Maeda, N., Smithies, O. & Coffman, T. M. (1998). Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15496–15501. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15496>
- Patel, C. B., Noor, N. & Rockman, H. A. (2010). Functional Selectivity in Adrenergic and Angiotensin Signaling Systems. *Molecular Pharmacology*, 78(6), 983–992. <https://doi.org/10.1124/mol.110.067066>
- Pires, P. W., Jackson, W. F. & Dorrance, A. M. (2015). Regulation of myogenic tone and structure of parenchymal arterioles by hypertension and the mineralocorticoid

- receptor. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 309(1), H127-36. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00168.2015>
- Pires, P. W., Ko, E.-A., Pritchard, H. A., Rudokas, M., Yamasaki, E. & Earley, S. (2017). The angiotensin II receptor type 1b is the primary sensor of intraluminal pressure in cerebral artery smooth muscle cells. *The Journal of physiology*, 595(14), 4735–4753. <https://doi.org/10.1113/JP274310>
- Porrello, E., Delbridge, L. & Thomas, W. G. (2009). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Frontiers in Bioscience*(14), 958–972. <http://pdfs.semanticscholar.org/a8a9/056898581d248c1aed673f408f7cf3a11977.pdf>
- Rajagopal, K., Whalen, E. J., Violin, J. D., Stiber, J. A., Rosenberg, P. B., Premont, R. T., Coffman, T. M., Rockman, H. A. & Lefkowitz, R. J. (2006). Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16284–16289. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607583103>
- Rajagopal, S., Ahn, S., Rominger, D. H., Gowen-MacDonald, W., Lam, C. M., Dewire, S. M., Violin, J. D. & Lefkowitz, R. J. (2011). Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Molecular pharmacology*, 80(3), 367–377. <https://doi.org/10.1124/mol.111.072801>
- Rakesh, K., Yoo, B., Kim, I.-M., Salazar, N., Kim, K.-S. & Rockman, H. A. (2010). beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Science Signaling*, 3(125), ra46. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000769>
- Ratz, P. H., Berg, K. M., Urban, N. H. & Miner, A. S. (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *American journal of physiology. Cell physiology*, 288(4), C769-83. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00529.2004>
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A. K. & Lefkowitz, R. J. (2012). Molecular mechanism of  $\beta$ -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, 179–197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105800>
- Roberts, R. (2012). The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway: a potential therapeutic target in hypertension. *Journal of Experimental Pharmacology*, 77. <https://doi.org/10.2147/JEP.S28907>
- Schleifenbaum, J., Kaßmann, M., Szijártó, I. A., Hercule, H. C., Tano, J.-Y., Weinert, S., Heidenreich, M., Pathan, A. R., Anistan, Y.-M., Alenina, N., Rusch, N. J., Bader, M., Jentsch, T. J. & Gollasch, M. (2014). Stretch-activation of angiotensin II type 1a receptors contributes to the myogenic response of mouse mesenteric and renal arteries. *Circulation research*, 115(2), 263–272. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.302882>
- Schrage, R., Schmitz, A.-L., Gaffal, E., Annala, S., Kehraus, S., Wenzel, D., Büllesbach, K. M., Bald, T., Inoue, A., Shinjo, Y., Galandrin, S., Shridhar, N., Hesse, M., Grundmann, M., Merten, N., Charpentier, T. H., Martz, M., Butcher, A. J., Slodczyk, T., . . . Kostenis, E. (2015). The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nature communications*, 6, 10156. <https://doi.org/10.1038/ncomms10156>
- Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. (2011).  $\beta$ -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in pharmacological sciences*, 32(9), 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.05.002>

- Silbernagl, S., Klinke, R., Pape, H. & Kurtz, A. (2010). *Physiologie* (6., vollständig überarb. Aufl.). Thieme.
- Simard, E., Kovacs, J. J., Miller, W. E., Kim, J., Grandbois, M. & Lefkowitz, R. J. (2013).  $\beta$ -Arrestin regulation of myosin light chain phosphorylation promotes AT1aR-mediated cell contraction and migration. *PLoS one*, 8(11), e80532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080532>
- Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsov, M. & Coffman, T. M. (2014). Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, 4(3), 1201–1228. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130040>
- Sparks, M. A., Parsons, K. K., Stegbauer, J., Gurley, S. B., Vivekanandan-Giri, A., Fortner, C. N., Snouwaert, J., Raasch, E. W., Griffiths, R. C., Haystead, T. A. J., Le, T. H., Pennathur, S., Koller, B. & Coffman, T. M. (2011). Angiotensin II type 1A receptors in vascular smooth muscle cells do not influence aortic remodeling in hypertension. *Hypertension*, 57(3), 577–585. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.165274>
- Sparks, M. A., Stegbauer, J., Chen, D., Gomez, J. A., Griffiths, R. C., Azad, H. A., Herrera, M., Gurley, S. B. & Coffman, T. M. (2015). Vascular Type 1A Angiotensin II Receptors Control BP by Regulating Renal Blood Flow and Urinary Sodium Excretion. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 26(12), 2953–2962. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014080816>
- Svoboda, P., Teisinger, J., Novotný, J., Bourová, L., Drmota, T., Hejnová, L., Moravcová, Z., Lisý, V., Rudajev, V., Stöhr, J., Vokurková, A., Svandová, I. & Durchánková, D. (2004). Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins. *Physiological research*, 53 Suppl 1, S141-52.
- Tang, W., Strachan, R. T., Lefkowitz, R. J. & Rockman, H. A. (2014). Allosteric modulation of  $\beta$ -arrestin-biased angiotensin II type 1 receptor signaling by membrane stretch. *Journal of Biological Chemistry*, 289(41), 28271–28283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.585067>
- Turu, G., Balla, A. & Hunyady, L. (2019). The Role of  $\beta$ -Arrestin Proteins in Organization of Signaling and Regulation of the AT1 Angiotensin Receptor. *Frontiers in endocrinology*, 10, 519. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00519>
- Villalta, M., Sampaio, T. L., Menezes, R. R. P. B. de, Lima, D. B., Jorge, A. R. C., Alves, R. S., Monteiro, H. S. A., Gawarammana, I., Maduwage, K., Malleappah, R., León, G., Martins, A. M. C. & Gutiérrez, J. M. (2019). Nephrotoxicity induced by the venom of *Hypnale hypnale* from Sri Lanka: Studies on isolated perfused rat kidney and renal tubular cell lines. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxicology*, 165, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.04.014>
- Violin, J. D., Dewire, S. M., Yamashita, D., Rominger, D. H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E. J., Gowen, M. & Lark, M. W. (2010). Selectively engaging  $\beta$ -arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 335(3), 572–579. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.173005>
- Violin, J. D. & Lefkowitz, R. J. (2007). Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 28(8), 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.06.006>
- Wang, J., Gareri, C. & Rockman, H. A. (2018). G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. *Circulation research*, 123(6), 716–735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311403>

- Weil, H., Ahn, S., Shenoy, S. K., Karnik, S. S., Hunyady, L., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(19), 10782–10787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834556100>
- Whalen, E. J., Rajagopal, S. & Lefkowitz, R. J. (2011). Therapeutic potential of  $\beta$ -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends in molecular medicine*, *17*(3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.11.004>
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., Simone, G. de, Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., . . . Desormais, I. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European heart journal*, *39*(33), 3021–3104. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
- Wirth, A., Benyó, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horváth, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., Lemmer, B., Schütz, G., Gutkind, J. S. & Offermanns, S. (2008). G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nature Medicine*, *14*(1), 64–68. <https://doi.org/10.1038/nm1666>
- Wisler, J. W., Rockman, H. A. & Lefkowitz, R. J. (2018). Biased G Protein-Coupled Receptor Signaling: Changing the Paradigm of Drug Discovery. *Circulation*, *137*(22), 2315–2317. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028194>
- Yamasaki, E., Thakore, P., Krishnan, V. & Earley, S. (2020). Differential expression of angiotensin II type 1 receptor subtypes within the cerebral microvasculature. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *318*(2), H461–H469. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00582.2019>
- Yasuda, N., Miura, S., Akazawa, H., Tanaka, T., Qin, Y., Kiya, Y., Imaizumi, S., Fujino, M., Ito, K., Zou, Y., Fukuhara, S., Kunitomo, S., Fukuzaki, K., Sato, T., Ge, J., Mochizuki, N., Nakaya, H., Saku, K. & Komuro, I. (2008). Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO reports*, *9*(2), 179–186. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401157>
- Zhou, Y., Chen, Y., Dirksen, W. P., Morris, M. & Periasamy, M. (2003). AT1b receptor predominantly mediates contractions in major mouse blood vessels. *Circulation research*, *93*(11), 1089–1094. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000101912.01071.FF>
- Zidar, D. A., Violin, J. D., Whalen, E. J. & Lefkowitz, R. J. (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(24), 9649–9654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904361106>
- Zimnol, A., Amann, K., Mandel, P., Hartmann, C. & Schupp, N. (2017). Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice develop angiotensin II-induced oxidative stress and DNA damage without blood pressure increase. *American journal of physiology. Renal physiology*, *313*(6), F1264–F1273. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00183.2017>
- Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., Toko, H., Tamura, K., Kihara, M., Nagai, T., Fukamizu, A., Umemura, S., Iiri, T., Fujita, T. & Komuro, I. (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nature Cell Biology*, *6*(6), 499–506. <https://doi.org/10.1038/ncb1137>

## 6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophie Nickel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktionelle Selektivität und Vermittlung des myogenen Tonus am Angiotensin II Typ-1-Rezeptor in der perfundierten Mausniere“, mit dem Englischen Titel: „Biased agonism and mediation of myogenic tone at the Angiotensin II type 1 receptor in the perfused mouse kidney“, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 7. Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Sophie Nickel hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Cui, Y., Kassmann, M., Nickel, S., Zhang, C., Alenina, N., Anistan, Y. M., Schleifenbaum, J., Bader, M., Welsh, D. G., Huang, Y. & Gollasch, M. (2020). Myogenic Vasoconstriction Requires Canonical G<sub>q/11</sub> Signaling of the Angiotensin II Type 1a Receptor in the Murine Vasculature. *bioRxiv*, 2020.09.09.289280.  
<https://doi.org/10.1101/2020.09.09.289280>

Beiträge im Einzelnen:

- Planung von Experimenten mit *Agtr1a*<sup>+/+</sup>, *Agtr1a*<sup>-/-</sup> und *Agtr1b*<sup>-/-</sup>, SMMHC-*Agtr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen zur Behandlung mit Ang II, SII und mit G<sub>q/11</sub> Inhibitor FR900359
- Vollständige Durchführung der Experimente und Erhebung, Auswertung des Datensatzes zur Erstellung der Grafik 9 (100 % Anteil an Durchführung, Erstellung und Auswertung Grafik 9)
- Erhebung Teildatensätze für Grafiken 1 und 2 durch Experimente mit *Agtr1a*<sup>+/+</sup>, *Agtr1a*<sup>-/-</sup> und *Agtr1b*<sup>-/-</sup> Mäusen mit Ang II sowie Teilexperiment mit funktionell selektivem Agonist SII zur Erstellung eines Teildatensatzes für Grafik 8 (~ 25 % Anteil an Datensätzen für Grafiken 1,2,8)

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

## **8. Lebenslauf**

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

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Maik Gollasch für die Einführung in die Forschungsgruppe, das Heranführen an die Forschungsthematik sowie die Planung und Anleitung zur Durchführung der Experimente. Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Kollegin Yingqiu Cui für die kollegiale Zusammenarbeit, die Aufbereitung und Zurverfügungstellung der Daten. Außerdem möchte ich Yoland M. Anistan, Dr. med. Yulia Komleva, Dr. med. Dmitry Tsvetkov, Dr. Mario Kaßmann, Kornelia Buttke und Nadine Wittstruck danken für die wunderbare Zusammenarbeit, für Tipps und praktische Hilfe während der Umsetzung der Experimente.

Zudem danke ich der Arbeitsgruppe um Gabriele M. König und Evi Kostenis für die Kooperation und Zusendung des selektiven  $G\alpha_{q/11}$ -Protein-Inhibitors UBO-QIC.

Des Weiteren möchte ich mich bedanken bei meiner Familie, meinen Freund\*innen, vor allem bei Dr. med. Nina Erdmann und Tom Berenjena Altermann, und meinen einzigartigen Mitbewohner\*innen, die mir in dieser Zeit immer mit Verständnis begegneten und mich auch in schwierigen Zeiten weiter motivierten.