

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Wirkungen von EGF-Rezeptoren an der Mauseorta**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sebastian Florian Rupp

geboren am 04.09.1982 in Saarlouis

Betreuer: Prof. Dr. med. Joachim Neumann  
Direktor Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Gutachter: Prof. Dr. med. Joachim Neumann  
Prof. Dr. med. Stefan Dhein, Altenburg  
Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann, Göttingen

14.07.2020

02.06.2021

## Referat

Der Wachstumsrezeptor EGFR ist ein wichtiger Baustein in der Zellentwicklung und Zelldifferenzierung sowie ein Tumorprotoonkogen. Er wird nicht nur von seinen eigentlichen Substraten aktiviert, sondern es erfolgt ebenfalls eine Transaktivierung durch G-Protein-gekoppelte und weitere Rezeptoren sowie Ionenkanäle. Dabei vermittelt der EGFR in glatten Muskelzellen Langzeiteffekte wie Hypertrophie, Proliferation, Migration und Fibrogenese. Unklar ist bisher, inwiefern der EGFR durch Transaktivierung an kurzfristigen Effekten wie der Blutdruckregulation beteiligt ist. Klinisch von Bedeutung könnte der EGFR als gemeinsamer Angriffspunkt für eine Vielzahl von Substanzen sein; ferner sind EGFR-Antagonisten in der Onkologie bereits im Einsatz.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es nach gefäß- und herzspezifischem Knockout (KO) des EGFR zu einer veränderten Kontraktion auf verschiedene vasoaktive Substanzen kommt. Zu diesem Zweck wurden Kontraktionsmessungen an isolierten Mauseorten in einem Organbad vorgenommen. Dabei wurden herz- und gefäßspezifische EGFR-KO-Tiere mit ihren Wildtyp (WT)-Geschwistern verglichen.

Der EGFR-KO führte zu einer Hypertrophie der Herzen ohne sonstige phänotypische Unterschiede. Die Elastizität der genetisch veränderten Aorten war erhöht. Die KCl-vermittelte Vasokonstriktion war abgeschwächt und die Zeit bis zum Erreichen des maximalen Effekts länger. Die Applikation von EGF löste eine Kontraktion bei den WT-Aorten aus, welche bei den KO-Präparaten nicht nachweisbar war.

Die Kontraktilitätszunahme auf Endothelin-1, Serotonin, Natrium-Nitrit und Carbachol war bei beiden Mauslinien vergleichbar. Ebenfalls unverändert war die Kontraktion nach Noradrenalin-Zugabe. Allerdings kam es bei hohen Noradrenalin-Konzentrationen zu vasodilatierenden Effekten bei WT-Aorten, was am ehesten einem  $\beta$ -Adrenozeptor-Effekt zuzuschreiben ist. Bei den KO-Tieren war dieser Effekt nicht nachweisbar. Dort trat ausschließlich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Gefäßkontraktion auf. Die Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des EGFR an dem  $\beta$ -adrenergen Effekt sowie eine Beeinflussung der Kalium-induzierten Vasokonstriktion.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Hintergrund .....	1
1.2	EGFR im Allgemeinen.....	1
1.3	EGFR in glatten Gefäßmuskelzellen.....	2
1.3.1	Transaktivierung des EGFR.....	3
1.3.2	Signalkaskade nach EGFR-Aktivierung .....	5
1.3.3	Mausmodelle/ Versuchsmodelle .....	7
1.3.4	Transgenes Mausmodell .....	8
1.4	Klinische Relevanz der Studien .....	9
2	Zielstellung der Arbeit .....	11
3	Material und Methodik.....	12
3.1	Versuchstiere und Tierhaltung .....	12
3.2	Generierung der transgenen Mäuse.....	12
3.3	Genotypisierung der Mäuse .....	13
3.3.1	DNA-Extraktion und Isolation.....	13
3.3.2	Konzentrationsmessung der DNA .....	13
3.3.3	PCR-Amplifikation der DNA .....	14
3.3.4	Agarosegelelektrophorese.....	14
3.4	Kontraktionsversuche.....	16
3.4.1	Vorbereitung des Organbads.....	16
3.4.2	Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage .....	16
3.4.3	Organentnahme der Mäuse .....	18
3.4.4	Präparation der Aortenringe.....	18
3.4.5	Messung Herzgewicht und Tibialänge.....	19
3.4.6	Versuchsablauf.....	19
3.5	Statistische Auswertung.....	21
4	Ergebnisse .....	22
4.1	Phänotyp der Versuchsmäuse .....	22
4.1.1	Herzgewicht und Tibialänge .....	22
4.2	Kontraktionsmessungen der Aorten.....	23
4.2.1	Einstellung der Vorspannung.....	23
4.2.2	Serotonin.....	24
4.2.3	Epidermal Growth Factor.....	26

4.2.4	Kaliumchlorid (KCl).....	27
4.2.5	Endothelin-1.....	29
4.2.6	Noradrenalin I.....	31
4.2.7	Noradrenalin II.....	36
4.2.8	Carbachol.....	41
4.2.9	Natrium-Nitrit (NaNO <sub>2</sub> ).....	45
5	Diskussion.....	49
5.1	Diskussion der Methoden.....	49
5.1.1	Knockout-Mausmodell.....	49
5.1.2	Präparation.....	50
5.1.3	Dehnbarkeit.....	51
5.2	Kontraktionsversuche.....	51
5.2.1	Serotonin.....	51
5.2.2	Epidermal Growth Factor.....	52
5.2.3	Kaliumchlorid (KCl).....	53
5.2.4	Endothelin-1.....	54
5.2.5	Noradrenalin.....	55
5.2.6	Carbachol.....	58
5.2.7	Natrium-Nitrit.....	59
5.3	Fazit.....	60
5.4	Klinische Bedeutung der Ergebnisse.....	62
5.5	Ausblick.....	64
6	Zusammenfassung.....	65
	Literaturverzeichnis.....	67
	Thesen.....	77
	Anlage.....	78
	Publikationen von Teilen dieser Arbeit.....	XI
	Eidesstattliche Erklärung.....	XII
	Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	XIII
	Danksagung.....	XIV

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
5-HT	5-Hydroxytryptamin (= Serotonin)
Abb.	Abbildung
AG1478	Selektiver Inhibitor EGFR
Akt	Serin/Threonin-Kinase (= Proteinkinase B)
AP-1	Transkriptionsfaktor
AR	Adrenozeptor
ATF-1	Aktivierender Transkriptionsfaktor 1
ATII	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
ATP <sub>γ</sub> S	Adenosin-5'-O-(3-thio)triphosphat
Bcl-2	B-Zell-Lymphom-2 (= Protein)
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
C57BL/6	Black 6 (= Mausstamm)
CA	Carbachol
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Kationen
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CK	Creatinkinase
CM	Kardiomyozyten
cm	Zentimeter
Con	Kontrolle
COX-2	Cyclooxygenase 2
CREB	Transkriptionsfaktor
c-Src	Tyrosinkinase Src
DAG	Diacylglycerol

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
EC <sub>50</sub>	Halbmaximale effektive Konzentration
EDHF	Endothelialer hyperpolarisierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR-KO	Knockout (= genetische Deletion) des EGFR
EGFR	Rezeptor epidermaler Wachstumsfaktor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB/HER	Rezeptor humaner epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	Extrazellulär-Signal Regulierte Kinase
ET-1	Endothelin-1
ET1 <sub>A/B</sub>	Rezeptor für Endothelin-1 A/B
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
flox	DNA-Segment flankiert von zwei loxP-Stellen
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
GDF-15	Wachstums-Differenzierungs-Faktor 15
ges	gesamt
gg.	gegen
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GPOR	G-Protein-gekoppelter Östrogen-Rezeptor
GPR30	Spezifischer Östrogenrezeptor
GrB2	Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HB-EGF	Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor
HCl	Salzsäure
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IE	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
JAK	Januskinase
kb	Kilobasen

KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton = Einheit für Molekülmasse
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	Knockout = Deletion eines Gens
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
loxP	Spezifische Basensequenz
m	Männlich
M	Mol
mAChR	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren
MAO	Monoaminoxidase(n)
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MEK	Kinase der MAPK
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease
mN	Millinewton
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (mammalian target of Rapamycin)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H Oxidase	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat Oxidase
Na-Ni	Natriumnitrit
NF- κB	Spezifischer Transkriptionsfaktor
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NotI	Endonuklease, welche DNA an bestimmter Stelle schneidet
NOX	NADPH-Oxidase
p38 <sub>MAPK</sub>	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

PCR	Polymerasekettenreaktion
PD153035	Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase
PD98059	Inhibitor der MAPK-Kinase
PE	Phenylephrin
PGF2a	Prostaglandin F2a
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI <sub>3</sub> K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKI-166	Inhibitor EGFR-Tyrosinkinase
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
Pyk2	Proteintyrosinkinase 2 beta
Rac	Hydrolase Enzyme
Raf	Protein Kinasen
Ras	Hydrolase Enzyme
RG50864	Inhibitor EGFR-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
sGC	Lösliche Guanylatcyclase
SM22	Spezifisches Promotergen für glatte Muskelzellen
SMC	Glatte Muskelzelle
SOS	GTP-Austauschfaktor = Protein
Src	Tyrosinkinase Src
STAT	DNA-bindende Proteine (=intrazelluläres Signalprotein)
TG	Transgene Maus
TGF $\alpha$	Transformierender Wachstumsfaktor $\alpha$
TKI	Inhibitor Tyrosinkinase
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
VEGF	Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
vs.	versus (= gegenüber)
VSM	Vaskuläre glatte Muskulatur

VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzellen
w	Weiblich
WT	Wildtyp-Maus

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erste Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Noradrenalin.....	32
Tabelle 2: Zweite Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Noradrenalin.....	37
Tabelle 3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Carbachol. ....	42
Tabelle 4: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Natrium-Nitrit.....	46

## Abbildungszeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Transaktivierung des EGFR durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in einer glatten Muskelzelle. ....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung der Signalkaskade nach Transaktivierung des EGFR in einer glatten Muskelzelle. ....	7
Abb. 3: Exemplarischer Nachweis von Allelen mit LoxP-sites.....	15
Abb. 4: Exemplarischer Nachweis der Cre-Rekombinase.....	15
Abb. 5: Schematischer Aufbau des Myographen.....	17
Abb. 6: Originalabbildung Myograph mit aufgesetztem Deckel .....	17
Abb. 7: Einbringen des Gefäßes in die Versuchskammer.....	19
Abb. 8: Schematische Versuchsabfolge.....	21
Abb. 9: Herzgewicht der Versuchstiere. ....	23
Abb. 10: Darstellung der Dehnbarkeit. ....	24
Abb. 11: Darstellung des Serotonin-Effekts. ....	25
Abb. 12: Darstellung des Serotonineffekts, Geschlechtervergleich.....	25
Abb. 13: Darstellung des EGF-Effekts. ....	26
Abb. 14: Darstellung des EGF-Effekts, Geschlechtervergleich.....	27
Abb. 15: Originalmechanogramme der Kontraktion auf Kaliumchlorid (KCl).....	28
Abb. 16: Darstellung des Kaliumchlorid-Effekts.....	29
Abb. 17: Originalmechanogramme der Kontraktion auf Endothelin-1.....	30
Abb. 18: Darstellung der Kontraktion auf Endothelin-1.....	30
Abb. 19: Originalmechanogramm der Kontraktion auf Noradrenalin. ....	33
Abb. 20: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin.....	34
Abb. 21: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin, Geschlechtervergleich.....	34
Abb. 22: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin.....	35
Abb. 23: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin, Geschlechtervergleich.....	35
Abb. 24: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin.....	38
Abb. 25: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin, Geschlechtervergleich.....	38
Abb. 26: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin.....	39
Abb. 27: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin, Geschlechtervergleich.....	40
Abb. 28: Vergleich der Kontraktion auf Noradrenalin I und II.....	41
Abb. 29: Darstellung der Dilatation auf Carbachol.....	43
Abb. 30: Darstellung der Dilatation auf Carbachol, Geschlechtervergleich.....	43
Abb. 31: Dilatation auf Carbachol.....	44

Abb. 32: Darstellung der Dilatation auf Carbachol, Geschlechtervergleich. ....	45
Abb. 33: Darstellung der Dilatation auf Natrium-Nitrit.....	47
Abb. 34: Darstellung der Dilatation auf Natrium-Nitrit, Geschlechtervergleich.....	47
Abb. 35: Dilatation auf Natrium-Nitrit. ....	48

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Die Erstbeschreibung des epidermalen Wachstumsfaktors (engl. epidermal growth factor, EGF) erfolgte durch Stanley Cohen in den 1960er Jahren nach Gewinnung eines Polypeptids aus den Speicheldrüsen von Mäusen, welches das Augenöffnen und Schneidezahnwachstum bei neugeborenen Mäusen beschleunigte (Cohen 1962). In den folgenden Jahren konnten weitere Beweise für die Funktion als Wachstums- und Entwicklungsfaktor durch das Anregen des Wachstums von Mausepidermis in vivo (Cohen und Elliott 1963) sowie Hühnerhaut in vitro (Angeletti et al. 1964; Cohen 1965) gesammelt werden. Präzisere Beschreibungen mit EGF-induzierter erhöhter RNA-, Ribosomen und Proteinaktivität in Hühnerepidermiszellen folgten (Hoover und Cohen 1967a, 1967b). Die Wirkungen von EGF auf menschliche Fibroblasten unterliegen biochemischen Kriterien, welche für eine rezeptorvermittelte Interaktion mit Stimulation des Zellwachstums auf RNA- und DNA-Ebene sprechen (Hollenberg und Cuatrecasas 1973). EGF bindet an Zellen und wird zellvermittelt durch Proteasen aufgespalten (Carpenter et al. 1975). Später konnte mit Hilfe radioaktiv markierter EGF-Moleküle ein spezifischer EGF-Rezeptor auf 3T3-Tumor-Mauszelllinien nachgewiesen werden (Das et al. 1977). Dieser Rezeptor-Liganden-Komplex wird internalisiert und abgebaut (Gorden et al. 1978) und kann auch unabhängig von proliferativen Zellantworten in Ratten-Hypophysen-Tumorzellen die Expression von Genen und Zellfunktionen verändern (Johnson et al. 1980). Der EGFR und verwandte Rezeptoren spielen nicht nur als Wachstums- und Entwicklungsfaktoren eine wichtige Rolle, sondern sind bei unkontrollierter Aktivierung auch für die Tumorentstehung von Bedeutung (Hynes und Stern 1994). Beim EGFR handelt es sich aber nicht nur um einen Wachstumsrezeptor und wichtigen Baustein in der Zellentwicklung und -differenzierung sowie ein Tumorprotoonkogen, er spielt auch eine wichtige Rolle in der Funktion von glatten Muskelzellen, Aufrechterhaltung des Blutdrucks und in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und damit verbundener Vaskulopathien.

## 1.2 EGFR im Allgemeinen

Beim humanen EGFR (ErbB1/HER1) handelt es sich um eine 170 kD Rezeptor-Tyrosinkinase, welche auf Chromosom 7 p12 des menschlichen Genoms kodiert ist (Shimizu et al. 2015) und mit ErbB2 (HER2/NEU), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) zur ErbB-Rezeptorfamilie gehört (Arteaga und Engelman 2014). Diese Rezeptoren sind in allen mesenchymalen, epithelialen und

neuronalen Zellen sowie ihren Vorläufern nachweisbar (Roskoski 2014) und liegen als Transmembranproteine in Zellmembranen vor. Sie haben eine extrazelluläre Domäne zur Ligandenbindung, eine einzelne Transmembranhelix und eine intrazelluläre Domäne mit Proteinkinasefunktion (Macho et al. 2015). Der EGFR wird durch sieben verschiedene Wachstumsfaktoren aktiviert, welche in Liganden mit hoher Affinität (EGF, HB-EGF, TGF $\alpha$ , Betacellulin) sowie niedriger Affinität (Epiregulin, Epigen, Amphiregulin) eingeteilt werden (Freed et al. 2017) und zum Teil weitere Rezeptoren der ErbB-Familie aktivieren. Betacellulin, HB-EGF und Epiregulin aktivieren auch ErbB4. ErbB3 und ErbB4 binden an EGF, TGF $\alpha$  und Neuroreguline (Yamaoka et al. 2018). Die einzelnen Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie liegen als Monomere in der Zellmembran vor und vermitteln ihre Funktion über eine Homo- oder Heterodimerisierung mit Aktivierung der Rezeptorproteinkinaseaktivität (Kovacs et al. 2015), welche in der Beeinflussung unterschiedlicher Zellprozesse wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben münden und an inflammatorischen Prozessen sowie an der Matrixhomöostase beteiligt sind (Rajaram et al. 2017). Der EGFR im Speziellen (ErbB1/HER1) formt dabei Homodimere sowie drei Heterodimere mit ErbB2, ErbB3 und ErbB4 (Makki et al. 2013). Durch diverse Studien mit genetischer Deletion des EGFR (= Knockout = KO) konnten epitheliale Effekte auf die Entwicklung von Haut, Haaren, Augen und Lungen, Knochen- und Herzanomalien sowie Neurodegenerationen gezeigt werden (Lemmon et al. 2014). Andererseits spielen Mutationen, welche zu einer Aktivierung des EGFR führen, bei diversen Krebsarten eine Rolle (Sigismund et al. 2018). Besonders ausgeprägt ist die EGFR-Überexpression in Tumoren von Kopf, Hals, Brust und Ovar, Prostata-, Blasen-, Pankreas-, kolorektalen, Nicht-kleinzelligen Bronchus- und Nierenzellkarzinomen sowie Glioblastomen (Gomez et al. 2013).

### **1.3 EGFR in glatten Gefäßmuskelzellen**

Der EGFR und die übrigen Rezeptoren der ErbB-Familie sind auf allen glatten Muskelzellen nachweisbar (Makki et al. 2013) und es findet eine Vielzahl von EGFR-vermittelten Prozessen statt, welche bei der arteriellen Hypertonie und ihrer Folgekrankheiten eine Rolle spielen könnten. Durch Thrombin und Angiotensin II kommt es zu einer Migration von glatten Muskelzellen nach Gefäßverletzung (Mugabe et al. 2010; Jagadeesha et al. 2012). Endothelin-1 führt zu einer Zellproliferation (Houde et al. 2016) und einer, ebenfalls bei Angiotensin II nachgewiesenen, Hyperproliferation (Li et al. 2010) sowie Fibrogenese der Gefäßwand (Schreier et al. 2014). Für Urotensin-II konnte diese EGFR-vermittelte Proliferation durch Aktivierung nachgeschalteter Signalwege ebenfalls gezeigt werden (Rodríguez-Moyano et al. 2013). Auch bei AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-Rezeptoren spielt die Hochregulation nachgeschalteter Signalwege in der Zellproliferation eine Rolle (Atef und Anand-Srivastava 2014) und ist EGFR-vermittelt (Atef und Anand-Srivastava

2016). Die Aktivierung EGFR-abhängiger Prozesse führt zu einem erhöhten oxidativen Stress in Zellen, einer Makrophagen-Infiltration und der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in Gefäßen (Wang et al. 2017). Es gibt aber nicht nur langfristige Effekte durch eine EGFR-Aktivierung. Sie spielen auch eine Rolle in der Vasokonstriktion und Aufrechterhaltung des Blutdrucks (Schreier et al. 2014) sowie in der durch chronische Hypoxämie ausgelösten Vasokonstriktion (Norton et al. 2013).

### 1.3.1 Transaktivierung des EGFR

Verantwortlich für die oben genannten Effekte auf unterschiedliche Moleküle ist eine Transaktivierung des EGFR. Darunter versteht man eine Aktivierung des EGFR, welche abhängig von der Ligandenbindung an andere Rezeptoren wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Zytokin-Rezeptoren, Ionenkanäle, Integrine oder Rezeptor-Tyrosinkinasen erfolgt und EGFR-vermittelte Zellprozesse in Gang setzt (Kamoto et al. 2015; Köse 2017; Schafer und Blaxall 2017). Bei GPCR handelt es sich um die größte Gruppe von Rezeptoren auf Zelloberflächen, welche von einer Vielzahl an Liganden aktiviert werden können. Dazu zählen u.a. Hormone, vasoaktive Peptide und Neurotransmitter. Sie bestehen aus einer Sieben-Transmembran-Domäne mit einem extrazellulären Amino-Ende und einem intrazellulären Carboxy-Ende (Latorraca et al. 2017; Wang et al. 2018). Durch die Ligandenbindung kommt es zu einer Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen ( $G_{\alpha\beta\gamma}$ ) und deren Spaltung in Untereinheiten ( $G_{\alpha}$  und  $G_{\beta\gamma}$ ), was zur Aktivierung von weiteren Signalkaskaden in der Zelle führt. Dazu gehört auch die Transaktivierung des EGFR (Liebmann 2011). Gezeigt werden konnte dies für eine Vielzahl an Molekülen, u.a. Thrombin, Angiotensin II, Endothelin-1 und Katecholamine (Sur und Agrawal 2014). Prinzipiell können zwei Signalwege der Transaktivierung unterschieden werden. Einer erfolgt über Rezeptoren, welche intrazellulär verschiedene membran-gebundene Enzyme (ADAM, engl. A Disintegrin And Metalloproteinase) aktivieren. Diese spalten extrazellulär Vorstufen von EGFR-Liganden (TGF $\alpha$ ; Amphiregulin, Epiregulin, HB-EGF, Betacellulin, EGF) zu aktiven Molekülen. Er wird „Dreifache Membranpassage Kaskade“ genannt. Der zweite Weg verläuft ohne Ligandenaktivierung intrazellulär über die Aktivierung von Proteinkinasen (Heppner und van der Vliet 2016). Bei  $\alpha$ -Adrenozeptoren kommt es nach Ligandenbindung zu einer Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP-7), die eine Abspaltung von EGF aus HB-EGF und damit eine Aktivierung des EGFR bewirkt (Wang und Khalil 2018). Für die Aufrechterhaltung der damit verbundenen Vasokonstriktion und die Aktivierung der MMP sind unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) verantwortlich (Martinez-Lemus 2012). Der adrenerge Vasotonus nach Aktivierung von GPCRs durch Phenylephrin oder Angiotensin II ist abhängig von MMP, mitochondrialer ATP-Produktion und dem PI<sub>3</sub>K-Signalweg (Staiculescu

et al. 2014; Schafer und Blaxall 2017). Die Aktivierung von PI<sub>3</sub>K führt zu einer Phosphorylierung von Membranlipiden. Aus PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) wird dabei PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat), welches die Proteinkinase Akt aktivieren kann und damit verschiedene Zellabläufe steuert (Rahmani et al. 2019). Die Transaktivierung von Angiotensin II erfolgt ebenfalls über den c-Src-Signalweg (Sandoval et al. 2011). Ebenso führen vasoaktive Peptide durch erhöhten oxidativen Stress und eine Src-Aktivierung zu einer Transaktivierung des EGFR mit Hyperproliferation von VSMC (Li et al. 2010). Für Endothelin-1 Rezeptoren ist ebenfalls eine Transaktivierung mit Beteiligung der Tyrosinkinase Src beschrieben (Sorokin und Staruschenko 2015). Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) vermitteln ihre Transaktivierung entweder über eine Aktivierung von MMP mit Aktivierung von EGFR-Substraten oder davon unabhängig über die Proteinkinase Fyn mit nachfolgender Aktivierung von ERK1/2 und Akt (Ockenga et al. 2013). Die durch Urokinase ausgelöste Zellmigration benötigt eine NAD(P)H-Oxidase (NOX), welche via G<sub>βγ</sub> die Proteinkinasen Rac und Src und nachfolgend den EGFR aktiviert (Duru et al. 2012). Zudem induziert Urokinase eine Zellproliferation durch eine ADAM-induzierte, HB-EGF-abhängige Signalkaskade, welche intrazellulär durch G<sub>α</sub>, G<sub>βγ</sub>, Src und eine NOX vermittelt wird (Duru et al. 2014). Ein weiterer wichtiger Schritt liegt in der Erhöhung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> mit anschließender Aktivierung des PKC-Signalwegs (Cattaneo et al. 2014). Bei Lysophosphatid-Rezeptoren kommt es durch die Erhöhung von Ca<sup>2+</sup> und Aktivierung von Calmodulin zu einer Aktivierung einer Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMK) und dadurch zu einer MMP-Aktivierung (Sánchez-González et al. 2010). Die Aktivierung von MMP erfolgt unter anderem durch ROS, welche NOX-1 abhängig entstehen (Miller et al. 2010). Des Weiteren führt Thrombin zur Aktivierung von Src mit nachfolgender Aktivierung von MMP und auch einer direkten Phosphorylierung von EGFR sowie einer PKC<sub>γ</sub>-vermittelten Aktivierung von ADAM 12 mit HB-EGF Spaltung. Hierdurch wird die durch Thrombin ausgelöste Zellproliferation erklärt (Smiljanic et al. 2011). Die Kontraktion von Rattenaorten findet bei Aktivierung von α<sub>1</sub>-Adrenozeptoren mit Phenylephrin zum Teil durch Transaktivierung des EGFR statt. Dieser Weg ist ein PI<sub>3</sub>K-abhängiger Signalweg, welcher intrazellulär ohne Beteiligung von MMP abläuft (Ulu et al. 2010). Im Verlauf wurde dieser Signalweg genauer untersucht, dabei konnte eine Signalkaskade beschrieben werden, welche eine Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung mit Aktivierung von Src und nachfolgend PI<sub>3</sub>K und damit verbundener Transaktivierung zeigte (Ulu et al. 2013).

Es werden also je nach Rezeptor, Subklasse und Ligand offensichtlich unterschiedliche Signalwege beschritten, welche eine Transaktivierung des EGFR auslösen können. Eine entsprechende schematische Übersicht gibt Abbildung 1.

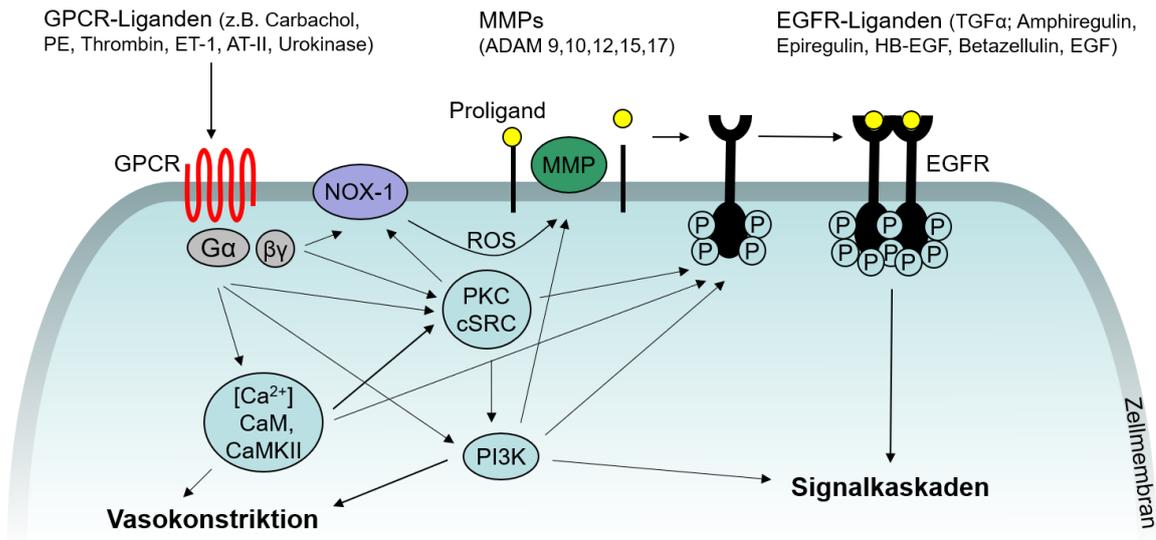


Abb. 1: Schematische Darstellung der Transaktivierung des EGFR durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in einer glatten Muskelzelle. Modifiziert nach (Sánchez-González et al. 2010; Liebmann 2011; Wang 2017).

Bei Bindung eines Liganden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) kommt es zu Abspaltung der Untereinheiten von G-Proteinen (G $\alpha$ +G $\beta\gamma$ ) mit nachfolgender Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden. Die G $\alpha$ -Einheit führt dabei zur Phosphorylierung von Proteinkinase C (PKC) mit nachfolgender Phosphorylierung der Tyrosinkinase Src (cSrc) und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI<sub>3</sub>K). Zudem kommt es zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ins Zytoplasma mit Aktivierung von Calmodulin (CaM) und Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängiger Proteinkinase II (CaMKII). Durch den Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Weg wird unter anderem eine Vasokonstriktion ausgelöst sowie die Aktivierung des PKC/Src Weges und eine direkte Aktivierung des EGFR. Durch die G $\beta\gamma$ -Einheit werden NAD(P)H-Oxidasen (NOX) aktiviert, welche auch zusätzlich durch Src aktiviert werden. Die dadurch gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aktivieren Metalloproteinasen (ADAM, MMP), welche EGFR-Liganden von den Proliganden abspalten. Diese binden an den Rezeptor, wodurch eine Dimerisierung mit Start nachgeschalteter Signalwege stattfindet. Durch PI<sub>3</sub>K kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung von Signalkaskaden, welche zu veränderter Proteinbildung und Vasokonstriktion führen.

### 1.3.2 Signalkaskade nach EGFR-Aktivierung

Nach der Transaktivierung des EGFR kommt es zu einer Vielzahl von zellulären Funktionen wie Migration, Proliferation und Hypertrophie. Dabei spielt der vorgeschaltete transaktivierende Rezeptor, die Liganden, die EGF-ähnlichen Peptide und die sich bildenden Dimere eine Rolle. Es kommt dabei zu unterschiedlichen Konformationen des EGFR mit davon abhängiger Aktivierung von verschiedenen Signalwegen. Zu den hauptsächlich aktivierten Signalwegen zählen der Ras/Raf/MEK/ERK1/2- und STAT5- Signalweg, die Proliferation und Differenzierung steuern und der Phosphatidyl-3-Kinase/Akt/mTOR-Weg, welcher anti-apoptotisch wirkt (Liebmann 2011; Schreier et al. 2014). Bei diabetischen Ratten kommt es nach Transaktivierung zu einer Hochregulation von Proteinen (z.B. PLC) mit nachfolgender Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Spiegels und

einer vaskulären Dysfunktion (Descorbeth und Anand-Srivastava 2010). Durch die Aktivierung von PLC- $\gamma$ 1 werden viele Signalwege reguliert. Eine Rolle spielt die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> und DAG mit anschließender intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung und Aktivierung der PKC. Durch die EGFR-induzierte Aktivierung kommt es zu einer PI<sub>3</sub>K-Phosphorylierung mit Stimulation von Akt, einer Serin/Threonin-Kinase, und der Unterdrückung von Apoptose sowie einer Stimulation des Zellwachstums. Der EGFR aktiviert zudem STAT, die als Transkriptionsfaktoren Gene aktivieren, welche Proliferation, Differenzierung und Überleben anregen (Wang 2017). Auch für Urokinase zeigte sich eine EGFR-vermittelte, ERK1/2- und p38<sub>MAPK</sub>-abhängige Zellproliferation und Zellmigration (Fuhrman 2012). Die Thrombin-vermittelte Transaktivierung des EGFR induzierte eine Aktivierung des EGFR mit in Gang setzen weiterer PI<sub>3</sub>K/Akt abhängiger Prozesse (Makki et al. 2013). Des Weiteren konnte eine ERK-vermittelte und MMP-9 abhängige N-Cadherin Abspaltung mit Migration von SMC nachgewiesen werden (Jagadeesha et al. 2012). In kultivierten VSMC von Affen wurde für EGF-ähnliche Liganden eine Hochregulation von ERK und Akt sowie Expression von NOX1 und damit verbundene ROS-Produktion nachgewiesen (Stanic et al. 2012). Des Weiteren konnte gezeigt, dass oxidativer Stress EGFR durch MMP-abhängige Abspaltung von EGF-ähnlichen Molekülen aktiviert und zu einer ERK-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-1 mit nachfolgender Expression von NOX1 und Zellproliferation führt (Makki et al. 2013). Thrombin löste eine EGFR-vermittelte Phosphorylierung von Pyk2 und Src aus, die zu einer Expression von kontraktilen Proteinen in glatten Gefäßmuskelzellen beitragen (Schauwienold et al. 2008). Die Vasokonstriktion durch Phenylephrin in Mauseaorten wird durch eine MMP-2 abhängige EGFR-Aktivierung mit nachfolgender ROS-Bildung vermittelt (Prado et al. 2018). Die durch ET-1 ausgelöste Vasokonstriktion erfolgt über eine HB-EGF vermittelte Transaktivierung des EGFR mit PI<sub>3</sub>K-Aktivierung und Ca<sup>2+</sup>-Einstrom (Makki et al. 2013). Bei von Ratten stammenden VSMC wird die durch Arginin Vasopressin und den V<sub>1A</sub>-Rezeptor ausgelöste Zellproliferation durch eine PKC-unabhängige GRK2-EGFR-ERK1/2 vermittelt (Zhang et al. 2016). Bei dem ATP-Rezeptor Liganden ATP $\gamma$ S führt die Transaktivierung des EGFR zu einer Aktivierung der PI<sub>3</sub>K/Akt Kaskade mit nachfolgender Expression proinflammatorischer Zytokine und einer Zellmigration (Lin et al. 2012). Auch bei der Entstehung eines allergischen Asthmas erfolgt nach Transaktivierung des EGFR die Hochregulation von verschiedenen Proteinen in glatten Muskelzellen der Bronchien durch die Aktivierung der ERK1/2-, PI<sub>3</sub>K $\delta$ /Akt- und NF- $\kappa$ B-Signalwege (El-Hashim et al. 2017). Eine schematische Übersicht über die dem EGFR nachgeschalteten Signalwege gibt Abbildung 2.

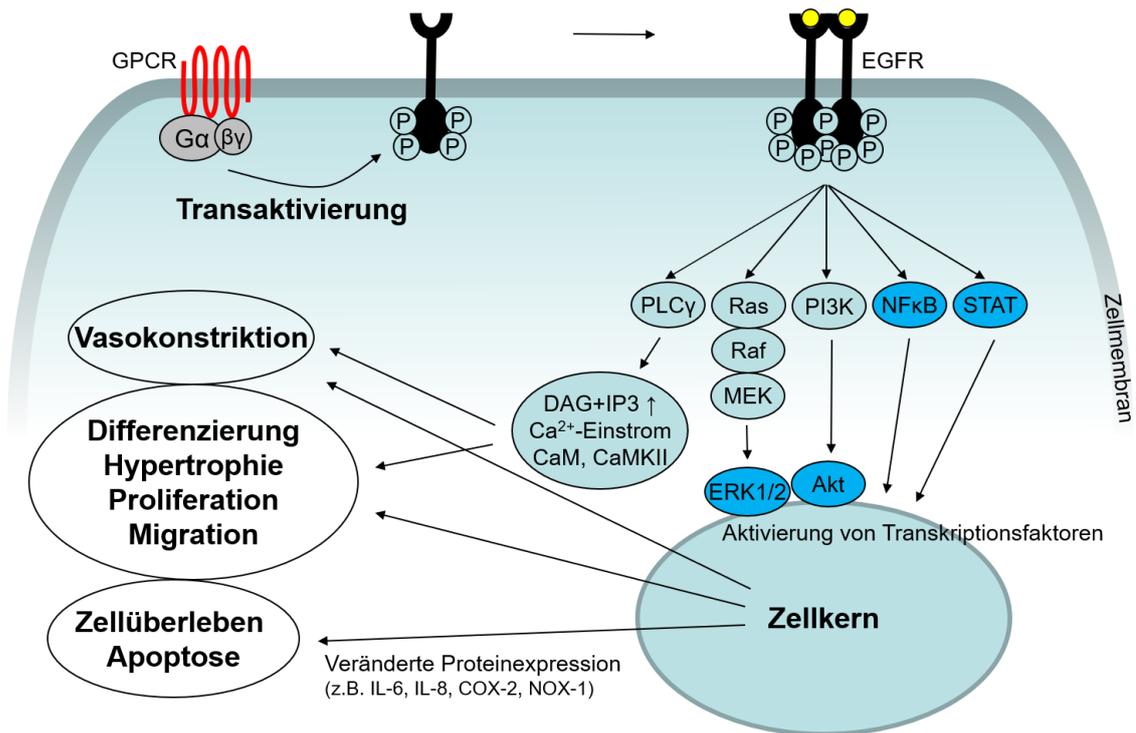


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signalkaskade nach Transaktivierung des EGFR in einer glatten Muskelzelle. Modifiziert nach (Sánchez-González et al. 2010; Liebmann 2011; Wang 2017).

Nach Transaktivierung kommt es zur Dimerisierung von EGFR/ERB-Monomeren mit Auslösung von verschiedenen Signalkaskaden, welche zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit nachfolgend veränderter Proteinexpression führen. Dabei werden pro-inflammatorische und anti-apoptotische Prozesse, Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation sowie migrationsfördernde Prozesse in Gang gesetzt. Unter anderem kommt es zur Hochregulation von kontraktilen Proteinen, ATP-Synthese und einer verstärkten Kontraktion. Welche Signalkaskaden dabei genau aktiviert werden, hängt von vielen Faktoren wie dem transaktivierenden Rezeptor, Liganden, EGF-ähnlichen Peptiden und der bei der Dimerisierung beteiligten Monomere ab.

Akt = Serin/Threoninkinase; CaM = Calmodulin; CaMKII = Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II; COX-2 = Cyclooxygenase-2; DAG = Diacylglycerin; EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor; ERK1/2 (extrazelluläre signal-regulierte Kinase); GPCR = G-Proteingekoppelter Rezeptor; G $\alpha$ +G $\beta\gamma$  = heterotrimeres G-Protein; IL-6 = Interleukin-6; IL-8 = Interleukin-8; IP<sub>3</sub> = Inositoltriphosphat; MEK = Proteinkinase; NF $\kappa$ B = Transkriptionsfaktor; NOX-1 = (NAD(P)H-Oxidase; PLC $\gamma$  = Phospholipase C $\gamma$ ; PI<sub>3</sub>K = Phosphoinositid-3-Kinase; Raf = Serin/Threonin-Proteinkinase; Ras = G-Protein; STAT = Transkriptionsfaktor.

### 1.3.3 Mausmodelle/ Versuchsmodelle

Mäuse mit einem konstitutiv ausgeschalteten EGFR sind bereits eingehend untersucht worden. Aufgrund der vielfältigen Prozesse, in denen der EGFR eine Rolle spielt, traten allerdings schwere Störungen der Entwicklung mit Knochen-, Gehirn-, Herz- und verschiedenen Epithelabnormalitäten auf (Lemmon et al. 2014). Abhängig von dem genetischen Hintergrund verstarben die Tiere während der Entwicklung (129/Sy), bei der Geburt (C57BL/6) oder bis zum

20. postnatalen Tag (MF1, C3H), wofür v.a. Plazentadefekte und Lungenunreife verantwortlich waren (Sibilia et al. 2007). Bei genetischer Deletion oder Überexpression von einzelnen EGFR-Liganden traten hingegen nur sehr milde Ausprägungen von Entwicklungsstörungen auf oder die Tiere waren phänotypisch unauffällig, was für eine funktionelle Redundanz spricht (Citri und Yarden 2006; Sibilia et al. 2007). Des Weiteren wurden verschiedene Mausmodelle eingesetzt, um die Zusammenhänge zwischen Transaktivierung des EGFR und seiner Rolle in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie zu erklären. Dabei wurden z.T. einzelne Komponenten der Transaktivierung ausgeschaltet und z.B. Kulturen glatter Muskelzellen von NOX1-Knockout-Tieren untersucht (Jagadeesha et al. 2012) oder Mausmodelle mit genetisch ausgeschalteten ErbB1/ErbB2 Rezeptoren in Kardiomyozyten verwendet. Hier konnten Zeichen einer Hypertrophie nachgewiesen werden (Makki et al. 2013). In Tieren mit einer Deletion des Heparin-bindenden EGF-artigen Faktors (HB-EGF) ließ sich eine abgeschwächte Vasokonstriktion auf ET-1 in isolierten Gefäßringen aus Mauskarotiden zeigen (Staruschenko et al. 2013). Viele andere Studien verwendeten Antagonisten des EGFR oder seiner Liganden sowie Antagonisten von einzelnen, in die Transaktivierung zwischengeschalteten, Proteinen. Zum Beispiel wurden zum Nachweis der EGFR-Beteiligung an der Aufrechterhaltung der ET-1-vermittelten Vasokonstriktion in Kaninchen-Basilarisarterien der EGFR-Antagonist AG1478 sowie der MAPK-Inhibitor PD98059 verwendet (Kawanabe et al. 2004). Es gab allerdings widersprüchliche Ergebnisse. So konnte für die EGFR-Antagonisten AG1478 und PD153035 eine adrenerge Vasokonstriktion nachgewiesen werden, wohingegen dieser Effekt bei Erlotinib zwar nicht gezeigt werden konnte, allerdings signifikante Effekte in der Verhinderung der Ausbildung von vaskulärer Hypertrophie, perivaskulärer Fibrose und renaler Fibrose in Mausmodellen, welche mittels ATII behandelten wurden, deutlich wurden. In weiteren Studien mit ATII-induzierter Hypertrophie in zerebralen Arteriolen von Mäusen konnte diese durch AG1478 verhindert werden oder war in Mäusen mit einem nicht funktionierenden EGFR nicht vorhanden, wohingegen kein Effekt auf einen erhöhten Blutdruck nachweisbar war (Forrester et al. 2016).

#### **1.3.4 Transgenes Mausmodell**

Arbeiten mit dem Ziel, die genaue Rolle des EGFR in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und in der Aufrechterhaltung des Blutdrucks zu erklären, wurden oft mit Rezeptor-Antagonisten durchgeführt oder schalteten einzelne Signalwege im Rahmen der Transaktivierung oder nachgeschalteter Prozesse aus. Ein anderer Ansatz war die Generierung eines transgenen Mausmodells, in welchem der EGFR lediglich in dem zu untersuchenden Gewebe ausgeschaltet ist, um gezielt den Phänotyp und die Effekte auf Blutdruckverhalten und morphologische Veränderungen der Herzen und Gefäße darzustellen. Aufgrund der schweren

Entwicklungsstörungen bei einem kompletten EGFR-KO mit Versterben der Tiere im Gestationsalter oder postnatal (Komposch und Sabilia 2015) wurde hier gezielt ein gewebsspezifischer Knockout erstellt, um Untersuchungen zur vaskulären Biologie und Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie und Folgeerkrankungen durchführen zu können. In glatten Gefäß- und in Herzmuskelzellen wurde gezielt das Gen *ErbB1*, welches für den EGFR kodiert, ausgeschaltet und die Tiere gegen ihre genetische Verwandtschaft ohne EGFR-KO untersucht (Schreier et al. 2011). Dies erlaubte Versuche *in vivo* und *ex vivo* am genetisch veränderten Tiermodell durchzuführen. Eine Vorbehandlung mit Medikamenten oder anderen Substanzen ist nicht erforderlich. Zudem wurde ein vergleichbares Mausmodell unseres Wissens nach bisher noch nicht beschrieben.

#### **1.4 Klinische Relevanz der Studien**

Arterielle Hypertonie ist eine weit verbreitete Erkrankung und betrifft 30-45% der Bevölkerung mit zunehmender Prävalenz im Alter. Sie ist ein wichtiger Faktor des kardiovaskulären Risikoprofils und der wichtigste Risikofaktor für das Erleiden eines Schlaganfalls und frühzeitigen Tod. Bei einem Großteil der Erkrankten liegt eine essentielle oder primäre Hypertonie vor, ca. 5-10% der Ursachen sind sekundär, also Folge einer anderen Erkrankung wie z.B. eines primären Hyperaldosteronismus (Mancia et al. 2013, Van Kleef und Spiering 2017). Ca. 9-18% der Hypertoniker haben eine therapierefraktäre Hypertonie, welche definiert ist als persistierend hypertensive Blutdruckwerte trotz einer ausdosierten medikamentösen Dreifachkombination, wovon ein Präparat ein Diuretikum sein muss (Doroszko et al. 2016). Die Rolle des EGFR und seine Mitbeteiligung an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks und in der Entstehung der arteriellen Hypertonie wurden dabei in diversen Studien gezeigt, welche mit unterschiedlichen Schwerpunkten wie z.B. endothelialer Dysfunktion, kardialer Hypertrophie, Diabetes mellitus oder Nierenbeteiligung durchgeführt wurden (Forrester et al. 2016). Auch in anderen Erkrankungen von glatten Muskelzellen spielt die Transaktivierung des EGFR eine wichtige Rolle. Bei der systemischen Sklerose kommt es IgG-vermittelt zu fibrotischen und wachstumsfördernden Effekten in glatten Gefäßmuskelzellen (Arts et al. 2014). In der Lunge von Mäusen konnten inflammatorische Effekte im Rahmen der Asthma-Entstehung nachgewiesen werden (El-Hashim et al. 2017) und auch an den Effekten von Insulin auf glatte Gefäßmuskelzellen ist eine Transaktivierung des EGFR beteiligt (Siddiqui et al. 2012). Für die Transaktivierung des EGFR in pathologischen Prozessen spielen diverse Agonisten und Rezeptoren eine Rolle. Die Beteiligung des EGFR an der Entstehung des Vasotonus konnte in verschiedenen Studien z.B. für EGF, ET-1, Aldosteron, ATII und Phenylephrin nachgewiesen werden, proliferative und hypertrophe Effekte z.B. für ATII, ET-1, Thrombin und  $\alpha_1$ -

Adrenozeptoren. Ihnen allen ist die Transaktivierung des EGFR gemein (Makki et al. 2013; Schreier et al. 2014). Ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt wäre dabei die Hemmung des EGFR und seiner Signalkaskaden statt der Hemmung einzelner vorgeschalteter Wege, da er als gemeinsamer Effektor vieler Moleküle eine Rolle spielt (Mindur und Swirski 2019). In der gezielten Behandlung von Krebserkrankungen sind eine Reihe von Substanzen bereits im klinischen Einsatz. Unterschieden werden dabei zwei Klassen von Medikamenten: Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Gefitinib, Erlotinib, Afatinib) und monoklonale Antikörper gegen den EGFR (Cetuximab, Panitumumab) (Yamaoka et al. 2017). Durch die Transaktivierung des EGFR konnten auch gewünschte Effekte nachgewiesen werden, wie die durch Bradykinin, endogene Opioide und Adenosin ausgelösten, EGFR-vermittelten, protektiven Wirkungen auf Kardiomyozyten im Rahmen einer ischämischen Präkonditionierung (Cohen und Downey 2015). Eine koronare Herzkrankheit könnte damit auch eine potentielle Kontraindikation für eine gezielte Therapie gegen den EGFR darstellen. Ein Verständnis der Beteiligung des EGFR an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks und an der Entstehung von Vaskulopathien könnte helfen, Ansatzpunkte und Wirkungen von zukünftigen Medikamenten zu erforschen und neue Ansätze zur Behandlung der arteriellen Hypertonie zu finden sowie mögliche Nebenwirkungen der, in der Onkologie bereits verwendeten, Präparate besser zu verstehen.

## **2 Zielstellung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es zum Verständnis der Rolle des EGFR an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Blutdrucks und seiner Folgeerkrankungen an transgenen Tieren beizutragen. Dabei sollten folgende Punkte detailliert betrachtet werden:

- Vergleich des Phänotyps der Versuchstiere
- Compliance der Gefäße
- Kontraktion in Gegenwart von nicht-rezeptorvermittelten Vasokonstriktoren
- Kontraktion in Gegenwart von rezeptorvermittelten Vasokonstriktoren
- Vasodilatation in Gegenwart von endothel-abhängigen Substanzen
- Vasodilatation in Gegenwart von endothel-unabhängigen Substanzen

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Es wurden Tiere mit einer genetischen Deletion des epidermalen Wachstumsfaktor-rezeptors (EGFR) in glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten verwendet. Diese Tiere wurden in den Hintergrundstamm C57BL/6 über mindestens zehn Generationen zurückgekreuzt. Die Rückkreuzung fand in den Laboratorien von Prof. Dr. M. Sibia an der Medizinischen Universität Wien (Natarajan et al. 2007) bzw. Prof. M. Gotthardt am Max-Dellbrück-Zentrum in Berlin statt (Holtwick et al. 2002). Die Wildtyp-Tiere waren im Durchschnitt  $252,76 \pm 30,45$  Tage alt und  $27,96 \pm 1,09$  Gramm schwer, die Knockout-Mäuse  $219,92 \pm 21,37$  Tage und  $27,40 \pm 0,90$  Gramm schwer. Die Geschlechtsverteilung war ungefähr gleich (männlich: weiblich: WT 10/7 KO 7/6). Die Tiere wurden entsprechend der Richtlinien der GV-SOLAS bei  $22 \pm 2$  °C mit einem 12 h Hell/Dunkel-Zyklus gehalten. Den Tieren stand handelsübliches Nagerfutter (Altromin) und Leitungswasser ad libitum zur Verfügung. Die Haltung entsprach den Tierschutzbestimmungen.

#### 3.2 Generierung der transgenen Mäuse

Zur Generierung der transgenen Mäuse wurden EGFR<sup>flox/flox</sup> Mäuse verwendet, welche von Prof. M. Sibia, Wien, zur Verfügung gestellt wurden (Natarajan et al. 2007). Dort wurden Mäuse mit einem Zielvektor generiert, in dem der Promoter und das erste Exon des EGFR-Gens von loxP sites flankiert werden (Natarajan et al. 2007). Zur weiteren Selektion der transgenen Stammzellen wurde eine Neomycin-Kassette eingefügt, welche eine Resistenz erzeugte. Zwei der embryonalen Stammzellen, welche eine Neomycin-Behandlung überlebten, wurden in Blastozysten von Spendertieren injiziert, die daraus resultierenden Tiere weiterverwendet. Männliche Chimären wurden mit C57BL/6 Weibchen verpaart, um EGFR<sup>flox/+</sup> Mäuse zu erhalten, die zur weiteren Zucht verwendet wurden. Die Entfernung der neo-Kassette des EGFR<sup>flox</sup> wurde durch Verpaarung mit  $\beta$ -actin-flip Mäusen (Bernet et al. 1995) erreicht. Die zuvor erwähnten Experimente wurden in Übereinstimmung mit den staatlichen Richtlinien in den Instituten der Medizinischen Universität Wien durchgeführt. Phänotypisch bestand kein Unterschied zu den Wildtyptieren. Die SM22-Cre Mäuse wurden bereitgestellt von Prof. M. Gotthardt, Berlin. Für die Generierung dieses Mausmodells war der glatte-Muskel-spezifische SM22 Promoter aus dem Plasmid SM2736 als 2.8 kb Fragment herausgeschnitten und in das Plasmid NukCre integriert worden, welches das modifizierte

Bakteriophagen P1 Cre Rekombinase Gen enthält, das in der Translation übereinstimmt und nukleäre Lokalisationssignale enthält (Holtwick et al. 2002). Das resultierende Konstrukt wurde mit NotI geschnitten, um das Vektorrückgrat zu entfernen und benutzt, um die nukleär lokalisierte Cre Rekombinase unter Kontrolle des SM22 Promoters in vaskulären glatten Muskelzellen zu exprimieren. Die transgenen Mäuse wurden mit Hilfe von C57BL/6xSJLF2 Oozyten generiert (Hofmann et al. 1988). Die  $EGFR^{\Delta/\Delta^{VSMC\&CM}}$  Mäuse wurden durch Verpaarung von C57BL/6-Mäusen, welche die geflox-ten EGFR-Allele enthielten ( $EGFR^{flox/flox}$ ) und SM22-Cre-Mäusen generiert. Die Genotypisierung erfolgte anhand von Schwanzbiopsien durch PCR. Die Tiere, welche homozygot für die EGFR-flox-Allele ( $EGFR^{flox/flox}$ ) und heterozygot für die SM22-Cre Allele ( $SM22-CRE^{+/-}$ ) waren, wurden behalten.  $SM22-CRE^{+/-}$  und ihre Wurfgeschwister zeigten weder im kardiovaskulären Phänotyp noch in ihrer Lebenserwartung Unterschiede. Deshalb wurden im Folgenden  $EGFR^{flox/flox}$  Wurfgeschwister als Kontrollen verwendet (Schreier et al. 2013).

### 3.3 Genotypisierung der Mäuse

#### 3.3.1 DNA-Extraktion und Isolation

Die DNA-Extraktion erfolgte aus einer 0,5 cm langen Schwanzbiopsie. Das Gewebe wurde mit 50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS und 0,35 mg Proteinase K versetzt und über Nacht (min. 12 h) bei 56 °C unter ständiger Bewegung inkubiert (Thermomixer Comfort, Eppendorf GmbH, Hamburg). Anschließend erfolgte die Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung (~6 M), es wurde 5 min gevortext (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) und 10 min bei 14000 U zentrifugiert (Heraeus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Der Überstand wurde abgenommen und zur Inaktivierung der Proteinase im Thermomixer bei 70 °C für 10 min inkubiert. Zur Ausfällung der DNA wurde Isopropanolol zugegeben, 2 min geschüttelt und wieder 10 min bei 14000 U zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70%igem Ethanol zweimal gewaschen und anschließend wieder 5 min zentrifugiert. Zum Abschluss wurde die DNA bei 37 °C getrocknet und mit Aqua dest. zum Lösen inkubiert.

#### 3.3.2 Konzentrationsmessung der DNA

Die Konzentrationsmessung erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nanovue™ Plus, Biochrom, Cambridge, UK). Hierzu wurde eine Referenzlösung (Wasser) zwei Mal gemessen.

Anschließend wurde die extrahierte DNA auf den Objektträger aufgetragen und photospektrometrisch bestimmt.

### 3.3.3 PCR-Amplifikation der DNA

Die Vervielfältigung der DNA erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Hierzu wurde das gesuchte DNA-Fragment mit Reaktionspuffer, thermostabiler Taq-Polymerase, 20 mM dNTP-Mix, 50 mM MgCl<sub>2</sub> und abhängig von dem nachzuweisenden Fragment, entsprechende Primer, versetzt. Aufgefüllt wurde mit Aqua dest. Zum Nachweis des EGFR<sub>flox</sub>-Allels wurden die Primer R4, R6 und LacZ verwendet, zum Nachweis des SM22-Cre-Allels die Primer Cre 800 und Cre 1200. Folgendes Programm wurde für die PCR gewählt: 1. Denaturierung bei 94 °C für 2 min, 2. Amplifikation: 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, Primerhybridisierung bei 63 °C für 30 sec und Elongation bei 72 °C für 1 min und 3. Elongation bei 72 °C für eine weitere Minute (TProfessional Basic Thermocycler, Biometra, Göttingen). Die erwartete Fragmentgröße der PCR des EGFR<sub>flox</sub>-Allels war: 1041 bp bei WT, 1245 bp bei flox, bei der PCR des SM22-Cre-Allels: 400 bp bei Cre<sup>+</sup> entsprechend der Größe des Enzyms und kein Fragment bei Cre<sup>-</sup>, da das Protein hier nicht vorhanden war. Die Zusammensetzung der Lösungen und Primer befindet sich in der Anlage.

### 3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Zur optischen Darstellung der vervielfältigten DNA wurde eine Gelelektrophorese eingesetzt. Hierzu wurde ein 2%iges Agarosegel mit TAE-Puffer (2 M Tris/Acetat, 5 M Na-Acetat, 0,5 M EDTA, pH 7,8) hergestellt, auf welches die Proben zusammen mit Ladepuffer im Verhältnis 1:0,15 aufgetragen wurden (handelsübliche Gelkammer, Electrophoresis Power Supply, E835, E231, Consort, Turnhout, Belgien). Zur Beurteilung der Länge der DNA-Fragmente wurden Positiv- und Negativkontrollen aufgetragen. Die Elektrophorese lief für 1 h 20 min bei 80 Volt. Nach Beendigung wurden die Gele 30 min. mit Ethidiumbromid (0,009 % im Gel) gefärbt und anschließend das überschüssige Ethidiumbromid durch 30 min waschen mit Aqua bidest entfärbt. Die Darstellung der Gelbanden erfolgte unter UV-Licht (BioDoc-It Imaging System, UVP, Cambridge, UK). Es wurden für jedes Tier zwei Elektrophoresen durchgeführt. Zum einen für den Nachweis der LoxP-sites und zum anderen für den Nachweis der Cre-Rekombinase. Bei Nachweis beider genetischer Veränderungen handelt es sich um ein Knockout-Tier.

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte nach der Geburt, um eine Zuordnung zu den entsprechenden Kohorten durchzuführen sowie erneut am Versuchstag selbst, um möglicherweise aufgetretene Verwechslungen auszuschließen und den genauen genetischen Hintergrund des Versuchstieres zu bestimmen.

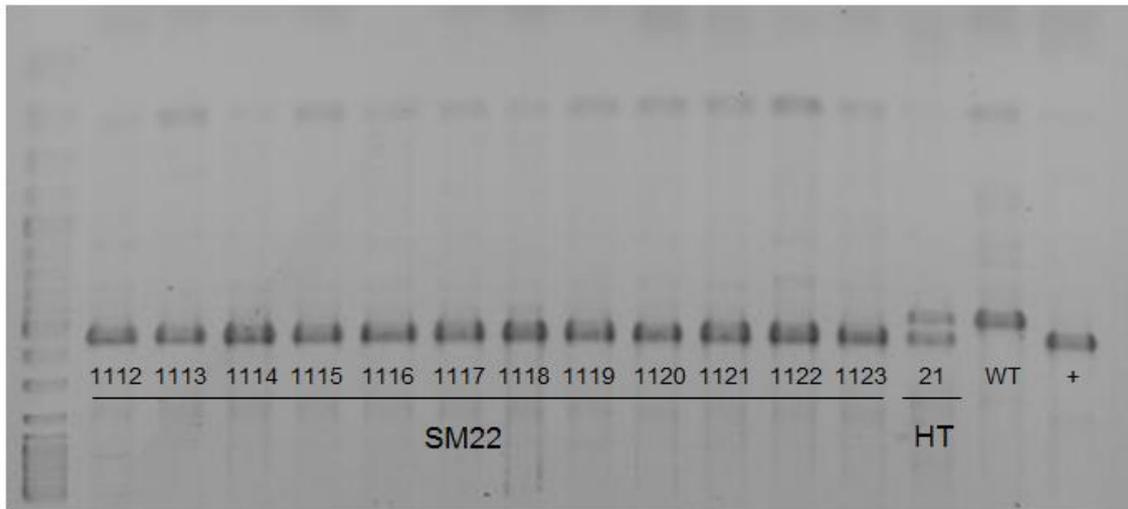


Abb. 3: Exemplarischer Nachweis von Allelen mit LoxP-sites.

Aufgetragen sind die PCR-Produkte der Mäuse 1112-1123 sowie Kontrollen. WT = Wildtyp, HT = heterozygot, + Positivkontrolle

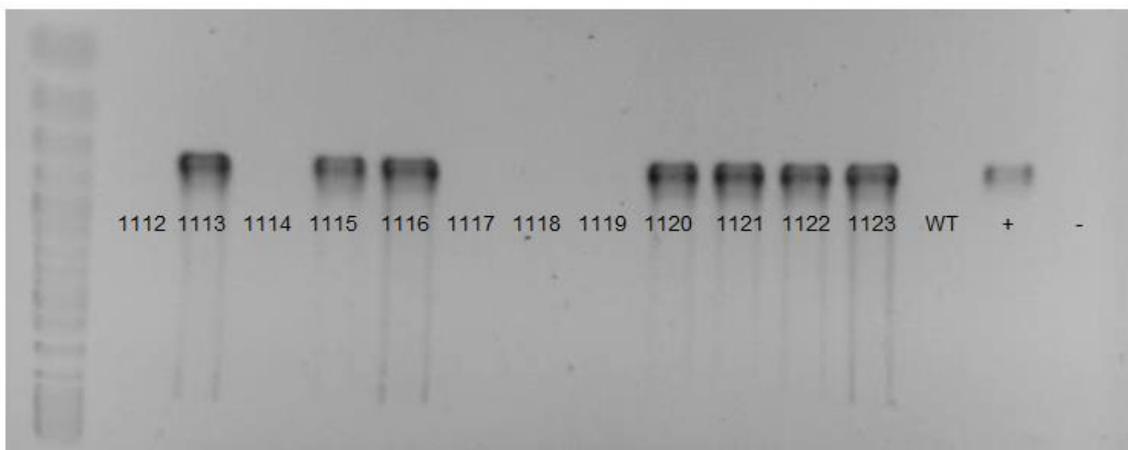


Abb. 4: Exemplarischer Nachweis der Cre-Rekombinase.

Aufgetragen sind die PCR-Produkte der Mäuse 1112-1123 sowie Kontrollen. Die Mäuse 1113, 1115, 1116, 1120-1123 sind Träger des Cre-Allels, zusammen mit Abbildung 3 resultiert daraus, dass bei den Mäusen 1113, 1115, 1116, 1120-1123 der EGFR in VSMC deletiert ist, während er bei den Mäusen 1112, 1114, 1117-1119 vorhanden ist. WT = Wildtyp, + = Positivkontrolle, - = Negativkontrolle.

### **3.4 Kontraktionsversuche**

#### **3.4.1 Vorbereitung des Organbads**

Zu Versuchsbeginn wurde an jedem Versuchstag Tyrode-Lösung neu angesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Nährlösung in annähernd physiologischer Zusammensetzung von Elektrolyten und Glukose. Nach einem festgelegten Protokoll wurde eine Stammlösung I, II und III zu 900 ml Wasser hinzugegeben und mindestens 10 min im, auf 37 °C vorgeheizten, Wasserbad (Exatherm U3 Electronic, Julabo, Seelbach) mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Anschließend erfolgte die Zugabe von Ascorbinsäure, Na<sub>2</sub>-EDTA, Glukose und einer 2,25 molaren CaCl<sub>2</sub> Lösung und das Auffüllen auf 1000 ml. Es erfolgten pH-Wertkontrollen mit einem pH-Meter (inolab pH 7110, Xylem Analytics, Weilheim). Die Zusammensetzung der Stammlösungen und genauen Endkonzentrationen der einzelnen Substanzen finden sich in der Anlage.

#### **3.4.2 Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage**

Als Versuchsanlage diente ein Dual Wire-Myograph (Modell A 410, Danish Myo Technology, A/S, Aarhus, Dänemark, Abb. 6) entsprechend der Versuchsanordnung von Mulvany und Halpern (Mulvany und Halpern 1977). Zur Aufzeichnung der Mechanogramme diente ein Multirecorder (MC 6715, Watanabe, Japan). Vor Versuchsbeginn wurde die Anlage eingeschaltet, auf 37 °C vorgewärmt und die 10 ml fassende Versuchskammer mit Aqua dest. befüllt. Dann wurden unter Zuhilfenahme eines binokularen Mikroskops (Stereomikroskop SM33, Hund, Wetzlar) zwei ca. 2,5 cm lange Drähte (Durchmesser 20 µm) auf den beiden Messplätzen eingespannt und ca. eine halbe Stunde gewartet, bis das Gerät stabile Werte anzeigte. Es wurde ein Nullpunkt festgelegt, anschließend wurde die Anlage mit Hilfe eines 2g Gewichts auf eine Kraft von 10 Millinewton (mN) kalibriert. Der Schreiber wurde so eingestellt, dass ein Abstand von einem Zentimeter einer Kraft von einem Millinewton entsprach. Danach wurden die Drähte verworfen und pro Messeinheit ein neuer Draht mit einer freien Seite in die Kammer ragend einseitig eingespannt, um das Gefäß darüber später aufzufädeln. Über eine im Deckel befindliche Absaugvorrichtung erfolgte das Absaugen des Wassers. Anschließend wurde die Kammer vier Mal mit der vorbereiteten Tyrode-Lösung gespült und die Begasung mit Carbogen eingeleitet (Abb. 7).

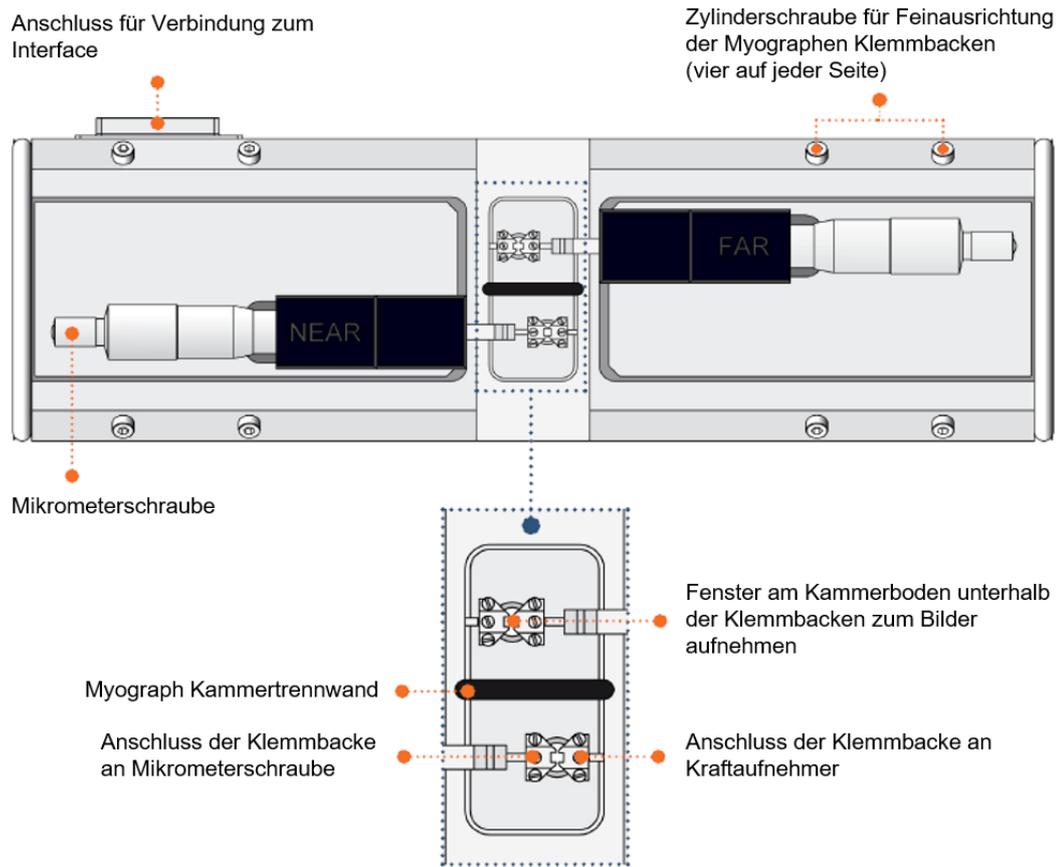


Abb. 5: Schematischer Aufbau des Myographen (modifiziert nach Dual Wire Myograph System 420A user guide, (Danish Myo Technology), A/S, Aarhus, Dänemark)

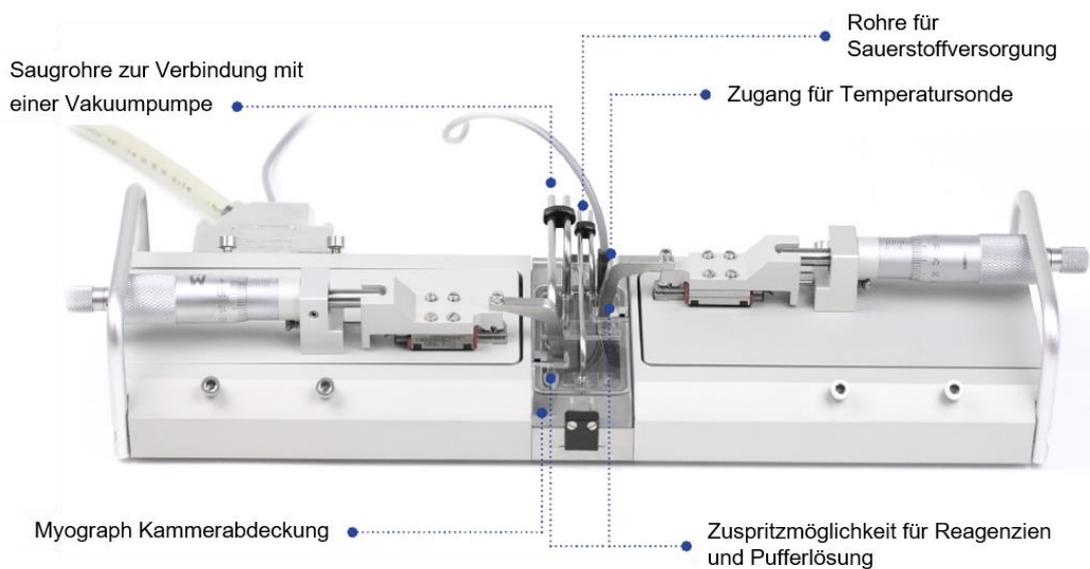


Abb. 6: Originalabbildung Myograph mit aufgesetztem Deckel (modifiziert nach Dual Wire Myograph System 410A user guide, (Danish Myo Technology), A/S, Aarhus, Dänemark)

### 3.4.3 Organentnahme der Mäuse

Die Mäuse wurden zu Beginn des Versuchs gewogen, mit 500 IE Heparin antikoaguliert sowie mit 50-75 mg/kg KG Pentobarbital betäubt. Die Applikation der beiden Substanzen erfolgte intraperitoneal. War eine Narkosetiefe erreicht, bei der die Maus auf einen Schmerzreiz mit einer Pinzette an ihrer Pfote keine Reaktion mehr zeigte, wurde sie an den Extremitäten befestigt und die Präparation begonnen. Es erfolgte von ventral die Eröffnung des Peritoneums mit einem longitudinalen Schnitt und die Durchtrennung des Diaphragmas. Anschließend wurden zwei Schnitte entlang des Rippenbogens und das Umklappen des Sternums nach kranial durchgeführt. Nun wurden Ösophagus und Vena cava durchtrennt und gemeinsam nach kaudal fixiert, das Lungengewebe wurde entfernt. Es erfolgte die Präparation des Herzens mit Durchtrennung des Gefäßes am Aortenbogen. Anschließend wurde der Thorax mit Tyrode-Lösung gespült, um die Sichtverhältnisse zu verbessern und die Versorgung der Aorta zu gewährleisten. Nachfolgend wurde vorsichtig von kranial beginnend das Gefäß von der Wirbelsäule mitsamt Fett- und Bindegewebe entfernt und in eine mit Tyrode-Lösung gefüllte Präparierschale überführt. Während der gesamten Präparation wurde, um das Endothel nicht zu verletzen, darauf geachtet, das Gefäß keinen Scher- oder Zugkräften auszusetzen. Das Greifen der Aorta erfolgte entweder an den äußeren Rändern oder am umgebenden Fett- und Bindegewebe.

### 3.4.4 Präparation der Aortenringe

Durch vorsichtige Auf- und Abwärtsbewegungen in der Tyrode konnten verbliebene Blutreste aus dem Gefäß gespült werden. Unter Zuhilfenahme des binokularen Mikroskops wurde das Gefäß von Fett- und Bindegewebe mit Hilfe von Pinzetten (Uhrmacher Pinzette BD 331R, Aesculap, Tuttlingen; neoLab 7, Dumont, Montignez, Schweiz) und einer Augenschere (Aesculap, Tuttlingen) vorsichtig befreit. Dazu wurde das Gefäß in einer Präparierschale mit Silikon (Tacosil®, Thauer & Co. KG, Dresden) an den Enden mit zwei feinen Nadeln fixiert. Nach Abschluss der Präparation wurde das Gefäß medial der fixierten Enden mittels Federschere (Aesculap, Tuttlingen) abgetrennt. Gefäße, die bei der Präparation angeschnitten wurden, wurden verworfen. Das Gefäß wurde in die Arbeitskammer überführt und in ca. 2 mm lange Ringe zurechtgeschnitten und auf den bereits vorbereiteten eingespannten Draht aufgefädelt. Das Gefäß wurde mit Hilfe der Pinzetten auf den vorbereiteten Draht aufgefädelt und das freie Drahtende anschließend mit der Befestigungsschraube fixiert. Anschließend wurde ein zweiter Draht durch das Gefäß geführt und an zwei weiteren Schrauben befestigt. Durch ein zwischenzeitliches

Zusammenführen der Backen konnten die Drähte fixiert und ein Verrutschen verhindert werden. Anschließend wurden mit Hilfe der Mikrometerschraube die Backen langsam so weit auseinandergeschoben, bis der Myograph eine geringe Kraftmessung anzeigte. Von dort aus wurde zurück auf den Nullpunkt eingestellt. Nun wurde gespült und die Gefäße für ca. 30 min in dieser Position belassen. Die Vorbereitungen für den Versuch waren damit abgeschlossen. Eine schematische Übersicht gibt Abbildung 7.

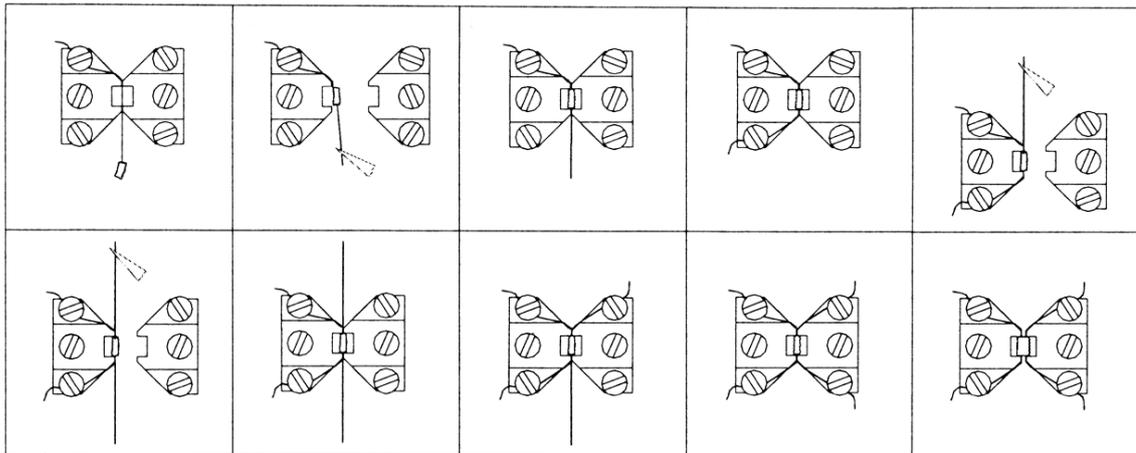


Abb. 7: Einbringen des Gefäßes in die Versuchskammer (modifiziert nach Procedures for Investigation, (M. J. Mulvany; Danish Myo Technology), A/S, Aarhus, Dänemark)

### 3.4.5 Messung Herzgewicht und Tibialänge

Am Versuchstag erfolgte die Messung von Körpergewicht und Herzgewicht des verwendeten Tieres. Zudem wurde die Tibia freipräpariert und mit einer Schieblehre vermessen.

### 3.4.6 Versuchsablauf

Zu Beginn wurde mit Hilfe der Mikrometerschraube in 50  $\mu\text{m}$ -Schritten eine Vorspannung von ca. 12,5 mN eingestellt. Anschließend wurden einige Minuten abgewartet, bis eine einigermaßen stabile Spannung zu sehen war. Nun erfolgte nacheinander die Zugabe der einzelnen Substanzen (siehe Abb. 8). Die genannten Konzentrationen entsprachen den Endkonzentrationen in der Versuchskammer. Nach Applikation einer Lösung wurde gewartet bis sich der Maximaleffekt einstellte, anschließend erfolgte das Auswaschen der Substanzen. Dieser standardisierte Vorgang beinhaltete das Absaugen der Nährlösung aus

der Versuchskammer über die in den Deckel integrierte Absaugvorrichtung und eine zügige Applikation von 10 ml frischer vorgewärmter Tyrode-Lösung. Dieser Schritt wurde in Abständen von mehreren Minuten mindestens dreimal wiederholt, einer Verdünnung von 1 zu 1000 entsprechend, ggf. auch öfter, bis zum Erreichen der Ausgangsspannung. Ausgenommen hiervon waren die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) von Noradrenalin, die unter anderem zum Erstellen einer erhöhten Vorspannung dienten, um die vasodilatierenden Effekte von Carbachol und Natrium-Nitrit darzustellen. Hier wurde erst ausgewaschen, nachdem auch die KWK der Vasodilatoren durchgeführt worden war.

Begonnen wurde mit Zugabe einer Kaliumchloridlösung in einer Konzentration von 25 mM. Es folgte die Applikation von EGF in den Konzentrationen 10 µg/l und 100 µg/l. Nach der ersten Konzentration wurde abgewartet, bis der Maximalwert der Kraftzunahme erreicht war und die Spannung sich wieder stabilisierte, dann die zweite Konzentration appliziert.

Danach wurde Endothelin in der Konzentration 10 µM hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Applikation von Noradrenalin in einer kumulativen Konzentrations-Wirkungskurve (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM). Es wurde zwischen den einzelnen Schritten jeweils einige Minuten gewartet, bis sich eine stabile Spannung einstellte. War dies der Fall, wurde die Konzentration erhöht. Nach Erreichen des Maximums erfolgte die Applikation der kumulativen Konzentrations-Wirkungskurve von Carbachol in den fünf Konzentrationen 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM und 10 µM. Nach Erreichen des maximalen dilatierenden Effekts erfolgte das Auswaschen der beiden Substanzen. Die zweite kumulative Noradrenalin Konzentrations-Wirkungskurve wurde nach dem gleichen Schema durchgeführt. Nach Erreichen des Maximaleffektes und einer stabilen Spannung wurde Natrium-Nitrit in der kumulativen Konzentrations-Wirkungskurve 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM und 100 µM appliziert. Als letzter Schritt erfolgte die Zugabe von 10 µM Serotonin. Die applizierten Volumina betragen für die Einzelsubstanzen 10 µl bzw. 100 µl, bei den Noradrenalin-KWKs 270 µl, bei Carbachol und Natrium-Nitrit je 190 µl.

Die oben genannten Substanzen wurden als Stammlösung vor Start der Versuchsreihe hergestellt, portioniert, bei -18 °C eingefroren und zum Versuchstag aufgetaut. Die Verdünnungsreihen von Noradrenalin, Carbachol und Natrium-Nitrit wurden am Versuchstag unmittelbar vor Einsatz der Substanzen erzeugt.

Vor Zugabe der einzelnen Pharmaka wurde die bestehende Vorspannung registriert. Die Begasung mit Carbogen erfolgte kontinuierlich. Ein Pipettierschema findet sich in Abbildung 8.

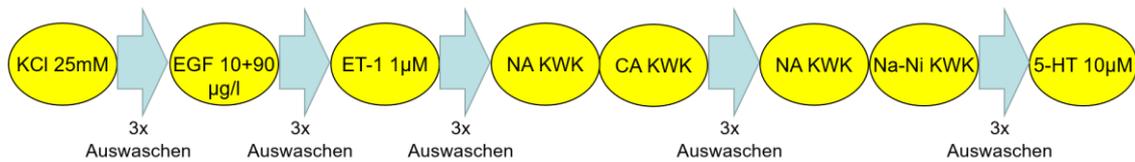


Abb. 8: Schematische Versuchsabfolge.

In den gelben Ovalen finden sich die zugegebenen Substanzen, Auswaschschritte sind hellblau markiert. KCl = Kaliumchlorid, EGF = Endothelium-Groth-Factor, ET-1 = Endothelin-1, NA = Noradrenalin, CA = Carbachol, Na-Ni = Natrium-Nitrit, 5-HT = Serotonin. KWK = Konzentrations-Wirkungs-Kurve.

### 3.5 Statistische Auswertung

Im Folgenden werden die Anzahl der Versuche als  $n$  bezeichnet. Die Daten werden als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler angegeben (SEM). Tabellen und Auflistungen (Maus-Kennnummer, Versuchsdatum, Alter, Geschlecht, Gewicht, Herzgewicht, Tibialänge, Elastizität sowie die Messwerte der einzelnen Substanzen) wurden mit Microsoft Excel 2010 erstellt. Mit Excel wurden auch die Berechnungen und die Analyse mittels Student's T-Test durchgeführt. Als signifikant wurden Werte  $p < 0,05$  angegeben. Bildbearbeitungen erfolgten mit gimp 2. Schemata wurden mit Hilfe von Microsoft PowerPoint, grafische Darstellungen mit Hilfe von Graphpad Prism 5 erstellt. Hier erfolgte zudem die Berechnung der  $EC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte nach Glättung der Konzentrations-Wirkungskurven und eine weitere statistische Analyse mittels ANOVA.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Phänotyp der Versuchsmäuse

Äußerlich waren die Versuchstiere nicht voneinander zu unterscheiden. Die Messungen des Gewichts, systolischen Blutdrucks, Blutglukose und Hämatokrit zeigten vergleichbare Werte. Allerdings waren bei den genetisch veränderten Tieren dilatative Veränderungen der Aorten und Koronargefäße mit reduzierter Wandstärke im Verhältnis zum Durchmesser und leichte Fibrosierungen nachzuweisen. Die Expression der EGFR-mRNA war in KO-Aorten auf unter 10 % der Expression in WT reduziert, in KO-Kardiomyozyten auf 40%. In der Leber war diese Reduktion nicht nachweisbar. Auf Proteinebene war der EGFR in KO-Aorten nicht mehr nachweisbar (Schreier et al. 2013).

#### 4.1.1 Herzgewicht und Tibialänge

Es erfolgten Messungen des Herz- und Körpergewichts vor Versuchsbeginn sowie die Messung der Tibialänge nach Entnahme der Aorten. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ , Abb. 9). Die Herzen der KO waren im Gegensatz zu den WT deutlich hypertrophiert ( $407,54 \pm 53,55$  mg vs.  $138,8 \pm 5,38$  mg;  $p < 0,05$ ;  $n=7$ ). Das durchschnittliche Gewicht der Tiere war ebenso wie die Tibialänge vergleichbar, (WT  $27,10 \pm 1,18$  g; KO  $26,36 \pm 1,12$  g;  $n=7$ ; WT  $18,2 \pm 0,13$  mm; KO  $18,08 \pm 0,13$  mm,  $n=5$ ). Das relative Herzgewicht, bezogen auf das Körpergewicht, betrug bei den WT  $5,04 \pm 0,14$  mg/g, bei den KO  $15,43 \pm 1,93$  mg/g ( $p < 0,05$ ). Das relative Herzgewicht, bezogen auf die Tibialänge, war  $7,4 \pm 0,31$  mg/mm bei den WT und  $19,44 \pm 1,71$  mg/mm bei den KO ( $p < 0,05$ ). Innerhalb der Gruppen bestanden keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei Herzgewicht sowie bezogen auf Tibialänge und Körpergewicht.

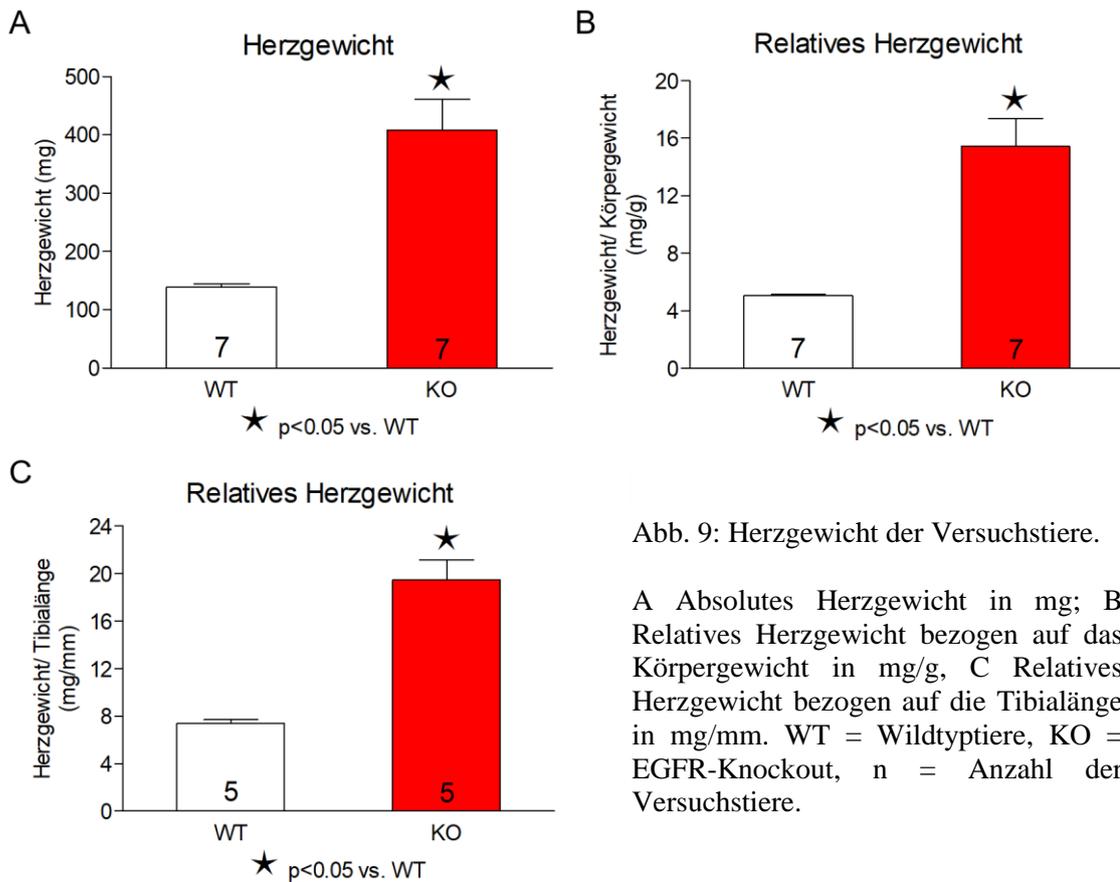


Abb. 9: Herzgewicht der Versuchstiere.

A Absolutes Herzgewicht in mg; B Relatives Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht in mg/g, C Relatives Herzgewicht bezogen auf die Tibialänge in mg/mm. WT = Wildtypiere, KO = EGFR-Knockout, n = Anzahl der Versuchstiere.

## 4.2 Kontraktionsmessungen der Aorten

### 4.2.1 Einstellung der Vorspannung

Die Aortenringe wurden wie oben beschrieben präpariert und in die Messanlage eingebracht. Dann erfolgte die Einstellung der Vorspannung auf durchschnittlich  $12,71 \pm 0,03$  mN bei den WT und  $12,63 \pm 0,03$  mN bei den KO. Hierzu waren im Schnitt  $349,12 \pm 7,16$   $\mu\text{m}$  bei den WT und  $409,17 \pm 16,31$   $\mu\text{m}$  bei den KO erforderlich. Es zeigte sich bei den KO also eine geringere Compliance ( $p < 0,05$ , Abb. 10).

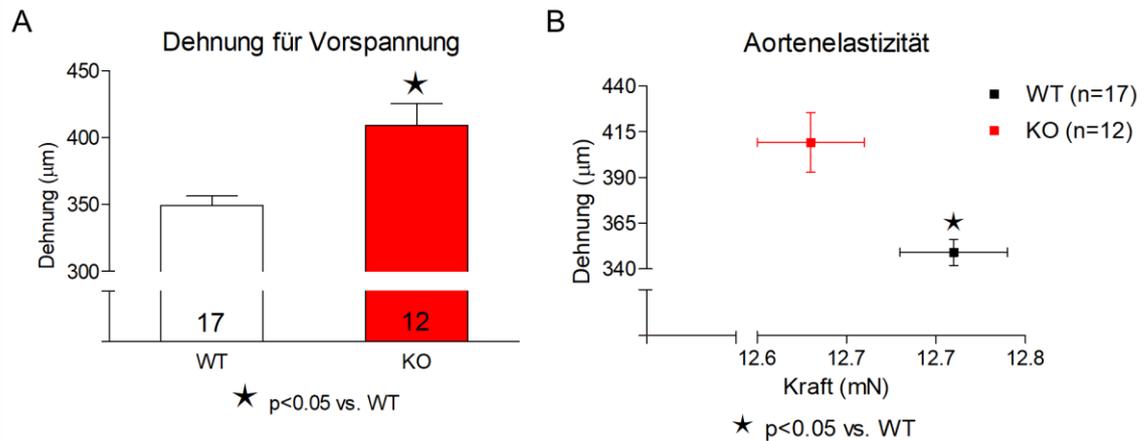


Abb. 10: Darstellung der Dehnbarkeit.

A, Benötigte Dehnung (Mikrometer) bis zum Erreichen einer Kraft von ca. 12,5 mN; B, Darstellung des Verhältnisses von Dehnung zu Kraftentwicklung. WT = Wildtypiere, KO = EGF-Knockout, n = Anzahl der Versuchstiere.

#### 4.2.2 Serotonin

Die Zugabe von Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) erfolgte als Kontrolle am Ende des Versuchs. Hierbei zeigte sich eine gute Kontraktionsfähigkeit sowohl bei WT als auch bei KO mit einer transienten starken Kontraktion (Abb. 11A). Die Ergebnisse zeigten hierbei keine Unterschiede, weder bei der Gesamtpopulation mit  $10,86 \pm 0,79$  mN vs.  $10,78 \pm 0,45$  mN (WT vs. KO) noch bei Auftrennung nach Geschlecht (Weibchen  $9,5 \pm 1,3$  mN vs.  $10,38 \pm 0,22$  mN, Männchen  $11,81 \pm 0,88$  mN vs.  $11,11 \pm 0,88$  mN, WT vs. KO, Abb. 11B, Abb. 12). Auch die Mittelwerte zwischen den Geschlechtern innerhalb der Kohorten waren nicht verschieden (Abb. 11B).

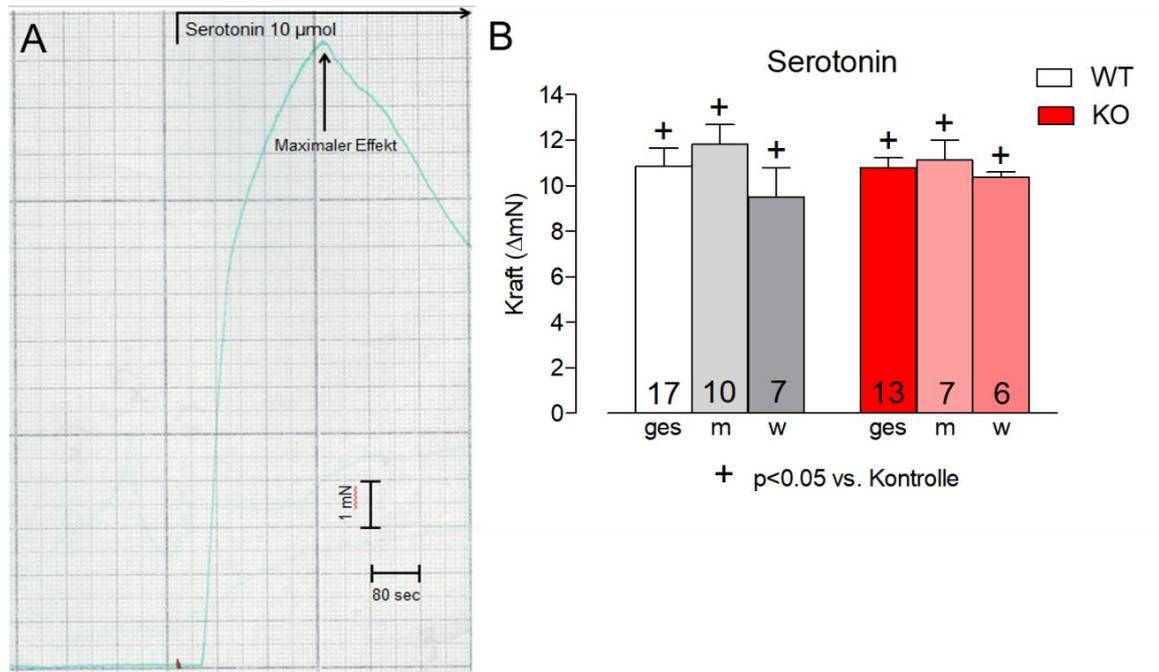


Abb. 11: Darstellung des Serotonin-Effekts.

A, Repräsentatives Originalmechanogramm mit Beschriftung; B, Kontraktion auf Serotonin, Gesamtzahl und Auftrennung nach Geschlecht in delta-mN. Auf Serotonin erfolgt eine Vasokonstriktion, welche sich weder zwischen den WT und KO, noch zwischen den Geschlechtern unterscheidet. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, ges = gesamte Kohorte, m = männliche Tiere, w = weibliche Tiere.

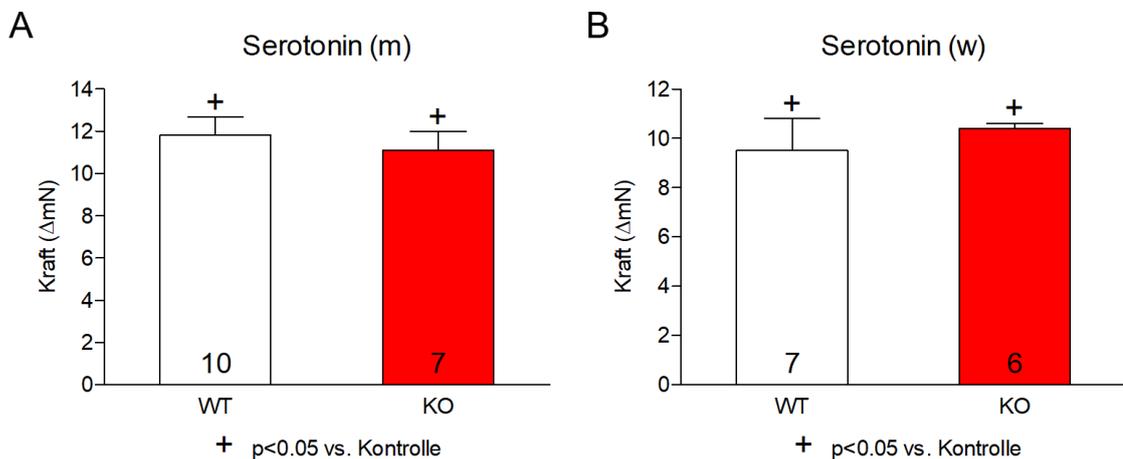


Abb. 12: Darstellung des Serotonineffekts, Geschlechtervergleich.

A, Männchen, m = männliche Tiere; B, Weibchen, w = weibliche Tiere; im Vergleich mit Abb. 11 ist zu sehen, dass auf Serotonin eine Vasokonstriktion erfolgt, allerdings kein Unterschied zwischen WT und KO besteht. WT = Wildtyp, KO= EGFR-Knockout.

### 4.2.3 Epidermal Growth Factor

Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor; EGF) wurde in zwei Konzentrationen hinzugegeben, wobei nach der ersten Konzentration bereits eine transiente Kontraktion bei den WT auftrat (Abb. 13A). Die Zugabe der zweiten Konzentration löste hingegen keinen Effekt mehr aus. Bei den KO konnte durch EGF, wie erwartet, kein Effekt erzielt werden. Der Mittelwert der Kontraktionskraft von EGF betrug für alle WT-Tiere  $0,82 \pm 0,26$  mN ( $p < 0,05$ ; Abb. 13B). Bei der Auftrennung nach Geschlecht erhielt man für die Männchen eine Kontraktionskraft von  $0,89 \pm 0,32$  mN ( $p < 0,05$ ; Abb. 14A), bei den Weibchen  $0,72 \pm 0,42$  mN, welche nicht signifikant verschieden gegenüber der Ausgangsspannung und dementsprechend den KO-Tieren war ( $p > 0,05$ ; Abb. 14B). Auch bei Anwendung eines einseitigen T-Tests ergibt sich keine Signifikanz. Zwischen den Geschlechtern bestand ebenfalls kein Unterschied (Abb. 13B).

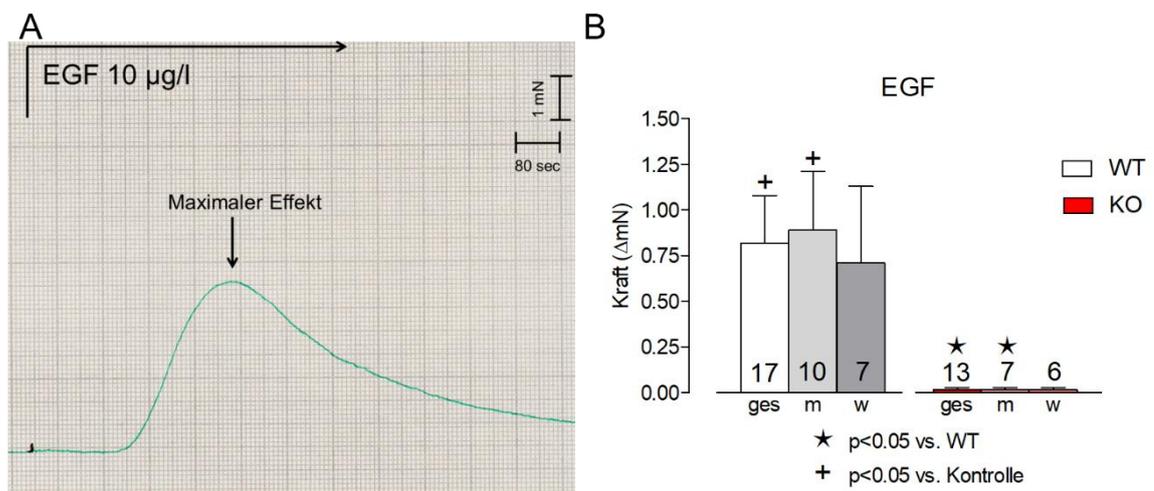


Abb. 13: Darstellung des EGF-Effekts.

A, Originalmechanogramm; B, Kontraktionskraft in delta-mN mit Aufteilung nach Geschlecht. Der Effekt bei den WT-Weibchen ist nicht verändert gegenüber den KO; WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, ges = gesamte Kohorte, m = männliche Tiere, w = weibliche Tiere.

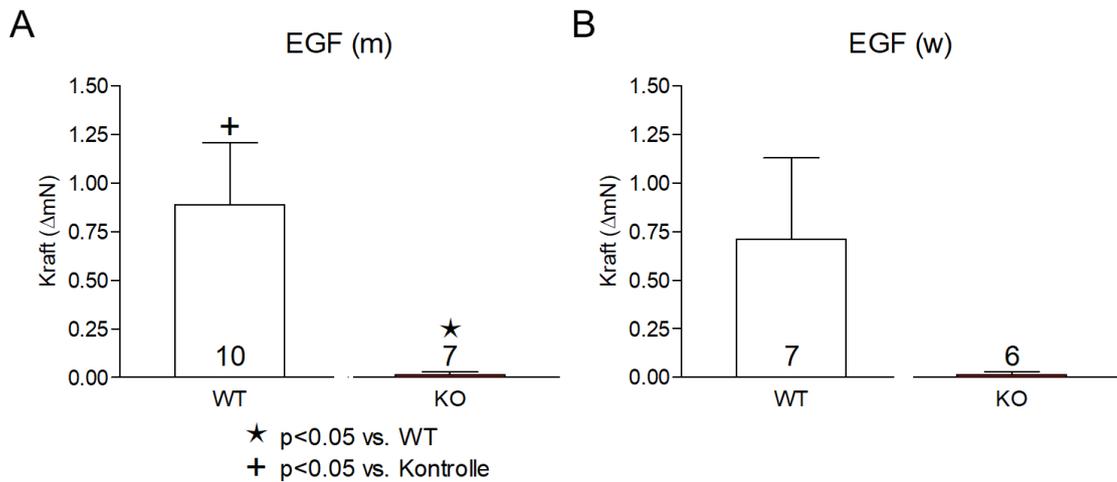


Abb. 14: Darstellung des EGF-Effekts, Geschlechtervergleich.

A, Kontraktionskraft in delta-mN bei Männchen mit Unterschied zwischen WT und KO; B, Kontraktionskraft in delta-mN bei Weibchen ohne Unterschied zwischen WT und KO; WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, m = männliche Tiere, w = weibliche Tiere.

#### 4.2.4 Kaliumchlorid (KCl)

Bei der nicht-rezeptorvermittelten Kontraktion der Gefäße durch 25 mM Kaliumchlorid (KCl) zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den WT und KO (Abb. 15). Die Kontraktion, welche durch Kaliumchlorid ausgelöst wurde, betrug geschlechtsunabhängig  $13,61 \pm 0,84$  mN bei den WT, bei den Männchen  $13,55 \pm 0,98$  mN, bei den Weibchen  $13,68 \pm 1,48$  mN. Die Ergebnisse waren gegenüber der Vorspannung signifikant ( $p < 0,05$ ), aber nicht verschieden zwischen den Geschlechtern. Für die KO ergab sich eine Gesamtkontraktionskraft von  $8,4 \pm 0,69$  mN, bei den Männchen  $9,83 \pm 0,7$  mN und  $6,73 \pm 0,85$  mN bei den Weibchen. Die KCl-abhängigen Kontraktionen waren verschieden gegenüber der Vorspannung, den WT (Abb. 16B) und das Ergebnis für Männchen und Weibchen auch untereinander ( $p < 0,05$ ; Abb. 16B-D). Zudem erreichten die WT-Tiere den Maximaleffekt von Kaliumchlorid schneller als die KO-Gefäße ( $23,58 \pm 2,11$  min vs.  $35,41 \pm 3,12$  min, Steigung  $0,64 \pm 0,06$  mN/min vs.  $0,26 \pm 0,03$  mN/min; Abb. 16A).

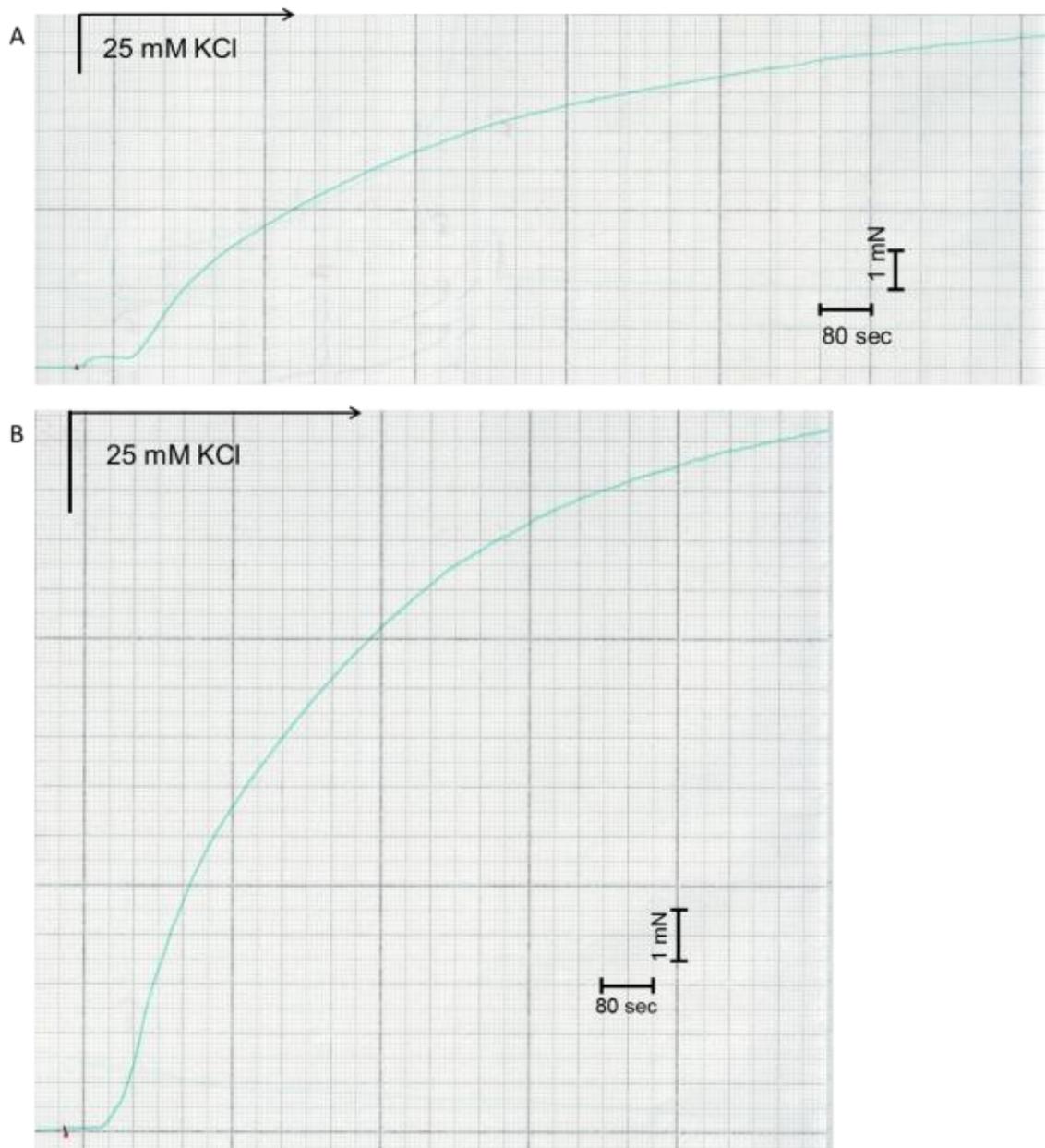


Abb. 15: Originalmechanogramme der Kontraktion auf Kaliumchlorid (KCl).

A, Kontraktion auf KCl bei KO, die Kraftentwicklung dauert länger und ist nicht so stark; B, Kontraktion auf KCl bei WT, deutlich schnellere Kraftentwicklung, insgesamt stärkere Kontraktion.

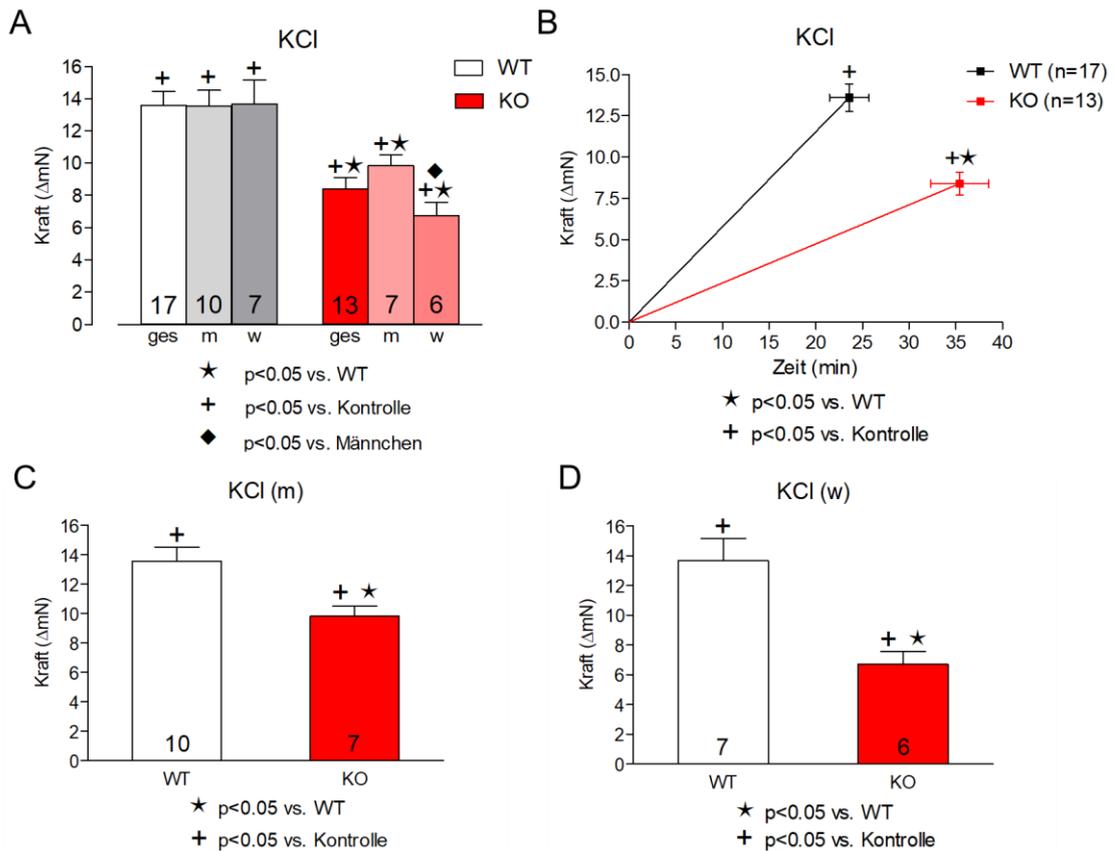


Abb. 16: Darstellung des Kaliumchlorid-Effekts.

A, Kontraktion als delta-mN Werte der Gesamtpopulation und Auftrennung nach Geschlecht. B, Darstellung der Kontraktionssteigerung und -zeit nach Zugabe von Kaliumchlorid (KCl) bis zum Erreichen des Maximums. C, Kontraktion bei Männchen; D, Kontraktion bei Weibchen. Die Kontraktion auf KCl ist bei den KO geringer als bei WT und für Männchen und Weibchen verschieden. WT = Wildtyp-Maus, KO = EGFR-Knockout. m = Männchen, w = Weibchen, n = Anzahl der Versuchstiere.

#### 4.2.5 Endothelin-1

Endothelin-1 (ET-1) löste sowohl bei WT als auch bei KO eine transiente Kontraktion aus, die erhöht gegenüber der Vorspannung war ( $p < 0,05$ , Abb. 17). Die Gesamtkontraktion betrug  $2,72 \pm 0,36$  mN bei den WT, aufgetrennt nach Geschlecht ergaben sich  $2,90 \pm 0,55$  mN für die Männchen und  $2,46 \pm 0,38$  mN für die Weibchen. Bei den KO löste Endothelin-1 eine Kontraktion von  $4,16 \pm 0,39$  mN aus, bei den Weibchen  $3,80 \pm 0,51$  mN, bei den Männchen  $4,47 \pm 0,54$  mN. Für die Gesamtpopulation zeigte sich eine stärkere Kontraktion der KO gegenüber den WT ( $p < 0,05$ , Abb. 18). Für die Weibchen gegeneinander ergab sich im angegebenen Intervall kein Unterschied ( $p > 0,05$ ), für die Männchen ebenfalls nicht ( $p > 0,05$ ). Die Ergebnisse bei der Auftrennung nach Geschlecht sind in den jeweiligen Kohorten nicht unterschiedlich.

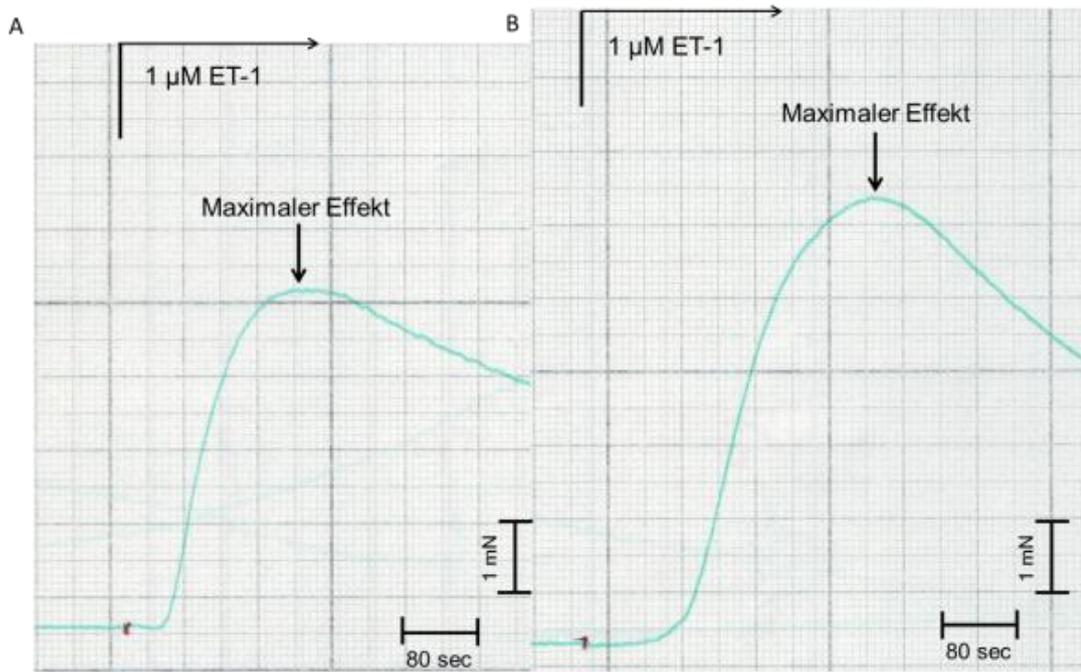


Abb. 17: Originalmechanogramme der Kontraktion auf Endothelin-1.

A, Repräsentatives Beispiel einer Kontraktion bei WT; B, Repräsentatives Beispiel einer Kontraktion bei KO; ET-1 = Endothelin-1.

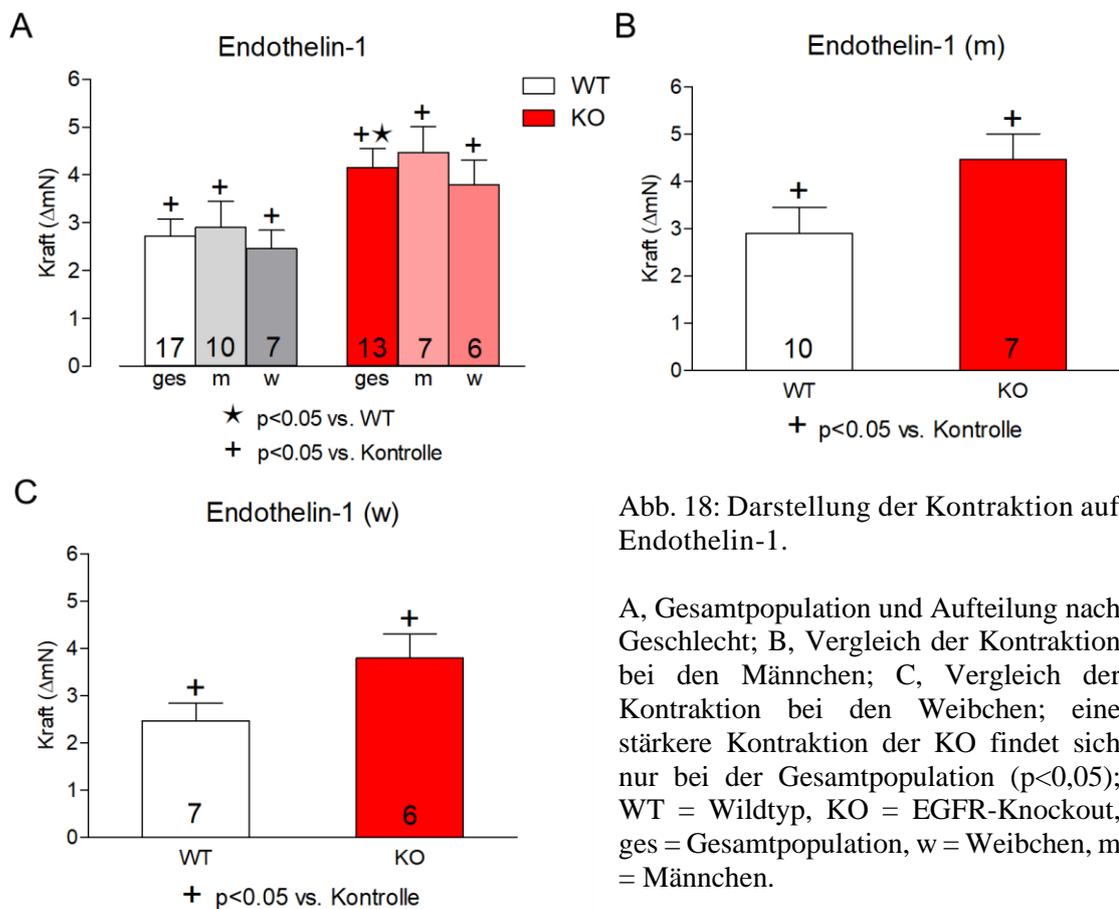


Abb. 18: Darstellung der Kontraktion auf Endothelin-1.

A, Gesamtpopulation und Aufteilung nach Geschlecht; B, Vergleich der Kontraktion bei den Männchen; C, Vergleich der Kontraktion bei den Weibchen; eine stärkere Kontraktion der KO findet sich nur bei der Gesamtpopulation ( $p < 0,05$ ); WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, ges = Gesamtpopulation, w = Weibchen, m = Männchen.

#### 4.2.6 Noradrenalin I

Anfangs wurde Noradrenalin in Form einer kumulativen Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100, 300 und 1000 nM appliziert. Die Gefäße reagierten mit einer, von der Konzentration abhängigen, zunehmenden Kontraktion (van Rossum und Burgers 1984). In höheren Konzentrationen zeigte sich zudem bei den WT ein dilatierender Effekt. Beispielhaft wird dieses unterschiedliche Verhalten in Abb. 19 als Originalmechanogramm dargestellt. Da Noradrenalin zur Einstellung einer Vorspannung benötigt wurde, verzichtete man bei den letzten Versuchen auf die beiden höchsten Konzentrationen, um eine ausreichende Vorspannung vor Applikation von vasodilatierenden Substanzen zu gewährleisten. Die Noradrenalin-abhängigen Kontraktionsdaten sind in Tabelle 1 dargestellt. Bei beiden Mausreihen trat ab der ersten Konzentration eine Vasokonstriktion gegenüber der Vorspannung auf ( $p < 0,05$ ; Abb. 20A). Aufgegliedert nach Geschlecht zeigte sich bei den WT eine Vasokonstriktion ab der zweiten Konzentration ( $p < 0,05$ , Abb. 20A). Bei den KO-Männchen trat bei allen Konzentrationen eine Kontraktion auf, bei den Weibchen ab der dritten Konzentration ( $p < 0,05$ , Abb. 20B, C). Beim Vergleich der Geschlechter innerhalb einer Mauslinie zeigte sich, dass die männlichen WT bei einer Konzentration von 10 nM stärker kontrahierten als die weiblichen, bei den männlichen KO war die Vasokonstriktion ab einer Konzentration von 3 nM stärker ausgeprägt ( $p < 0,05$ , Abb. 21). Beim Vergleich der Kontraktion auf Noradrenalin fand bei den letzten vier Konzentrationen eine stärkere Vasokonstriktion bei den KO statt ( $p < 0,05$ ). Bei der Aufteilung nach Geschlecht war der Effekt auch bei den Männchen ab einer Konzentration von 30 nM nachweisbar ( $p < 0,05$ ), welcher bei den Weibchen nicht zu sehen war ( $p > 0,05$ ). In den hohen Konzentrationen fehlte zudem der vasodilatierende Effekt bei den KO (Abb. 20). Die  $EC_{50}$ -Werte waren für WT und KO sehr ähnlich, zur Berechnung wurden bei den WT aufgrund der Vasodilatation die letzten beiden Werte nicht herangezogen (Abb. 20, 21). Sie entsprachen ungefähr den Ergebnissen aus anderen Versuchsreihen (Russell und Watts 2000). Es erfolgte eine Normierung der Noradrenalin-Kurven auf den maximalen Kontraktionseffekt in Prozent. Dieser betrug für WT  $6,91 \pm 0,7$  mN bei 100 nM und für KO  $10,88 \pm 1,19$  mN bei 1000 nM (Abb. 22A). Nach Geschlecht aufgetrennt für die WT-Männchen  $7,26 \pm 0,85$  mN und KO-Männchen  $13,56 \pm 0,94$  mN (Abb. 22B). Die Vasokonstriktion als Prozent des Maximums war bei den KO ab einer Konzentration von 30 nM stärker als bei den WT ( $p < 0,05$ ; Abb. 22A). Für die Weibchen ergab sich mit  $6,40 \pm 1,18$  mN für die WT und  $8,20 \pm 1,39$  mN für die KO (Abb. 22B) kein Unterschied. Bei den Präparaten von männlichen Tieren traten unterschiedliche Kontraktionen für die Konzentrationen 100 und 1000 nM auf (Abb. 22C). Bei einem Vergleich zwischen Männchen und Weibchen innerhalb der Mauslinien zeigte sich kein Unterschied in der

Kontraktionskraft der KO (Abb. 23B). Bei den WT-Weibchen war die Kontraktion schwächer ausgeprägt, allerdings nur bis zu einer Konzentration von 100 nmol ( $p < 0,05$ ). Bei einer Konzentration von 300 nM dilatierten die Aortenringe von Männchen stärker ( $p < 0,05$ ; Abb. 23A).

Tabelle 1: Erste Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Noradrenalin

Dargestellt ist die Kraftentwicklung der Aortenringe nach Applikation der verschiedenen Noradrenalin-Konzentrationen in mN. Es zeigte sich eine allmähliche Zunahme der Kontraktion. MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung, WT = Wildtyp, KO = EGR-Knockout. 1. T-Test, +  $p < 0,05$  gegen Vorspannung; 2. T-Test, ★  $p < 0,05$  gegen Wildtyp

Konzentration (nM)		Gesamt		Männchen		Weibchen	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO
1	MW	0,18	0,28	0,26	0,41	0,06	0,12
	SEM	0,06	0,08	0,10	0,08	0,03	0,11
	1. T-TEST	$p < 0,05+$	$p < 0,05+$	0,051	$p < 0,05+$	0,079	0,341
	2. T-TEST		0,330		0,300		0,610
3	MW	1,03	1,57	1,48	2,21	0,39	0,82
	SEM	0,29	0,35	0,42	0,37	0,16	0,45
	1. T-TEST	$p < 0,05+$	0,127				
	2. T-TEST		0,250		0,260		0,400
10	MW	3,25	4,42	4,23	5,97	1,84	2,62
	SEM	0,58	0,68	0,75	0,66	0,63	0,75
	1. T-TEST	$p < 0,05+$					
	2. T-TEST		0,210		$p < 0,05★$		0,480
30	MW	5,30	7,81	6,09	10,00	4,17	5,25
	SEM	0,68	0,85	0,79	0,69	1,06	0,85
	1. T-TEST	$p < 0,05+$					
	2. T-TEST		$p < 0,05★$		$p < 0,05★$		0,490
100	MW	6,91	9,68	7,26	11,87	6,40	7,13
	SEM	0,70	0,84	0,85	0,68	1,18	0,81
	1. T-TEST	$p < 0,05+$					
	2. T-TEST		$p < 0,05★$		$p < 0,05★$		0,660
300	MW	5,97	10,68	6,18	13,18	5,76	8,18
	SEM	1,05	1,08	1,78	0,87	1,09	1,18
	1. T-TEST	$p < 0,05+$					
	2. T-TEST		$p < 0,05★$		$p < 0,05★$		0,220
1000	MW	4,41	10,88	4,24	13,56	4,58	8,20
	SEM	1,10	1,19	2,03	0,94	0,87	1,39
	1. T-TEST	$p < 0,05+$	0,080				
	2. T-TEST		$p < 0,05★$		$p < 0,05★$		$p < 0,05★$

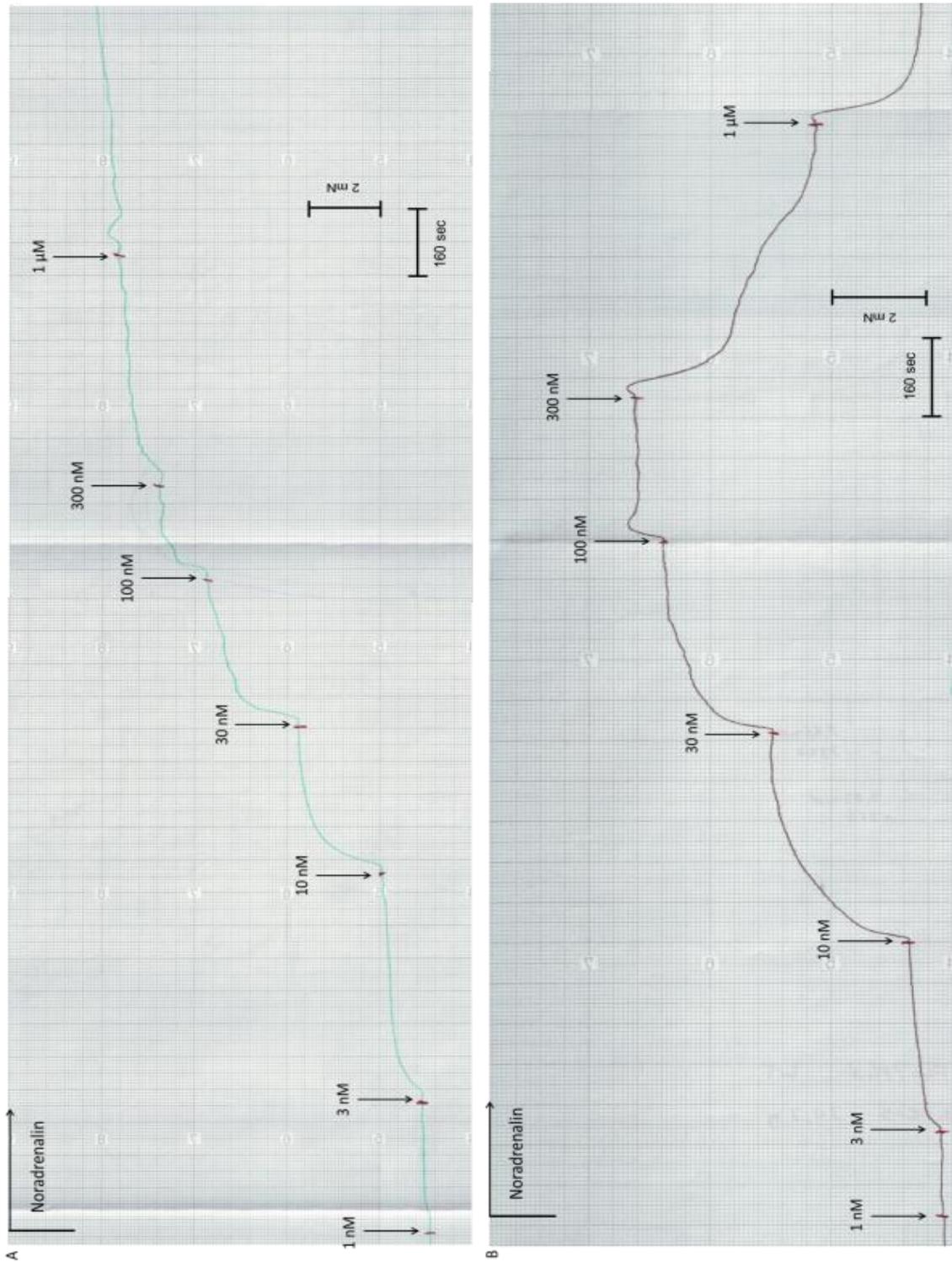


Abb. 19: Originalmechanogramm der Kontraktion auf Noradrenalin.

A, EGFR-Knockout; B, Wildtyp.

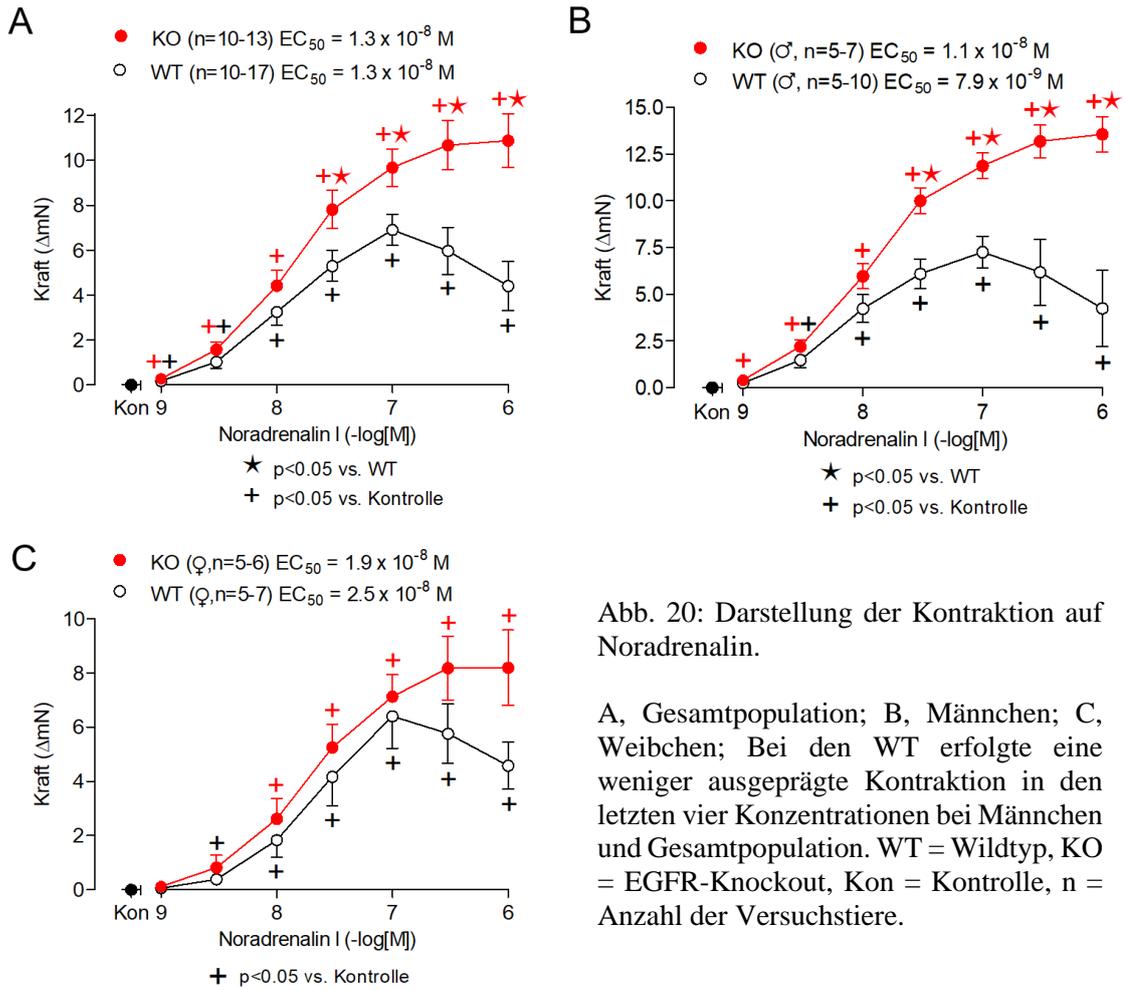


Abb. 20: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin.

A, Gesamtpopulation; B, Männchen; C, Weibchen; Bei den WT erfolgte eine weniger ausgeprägte Kontraktion in den letzten vier Konzentrationen bei Männchen und Gesamtpopulation. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

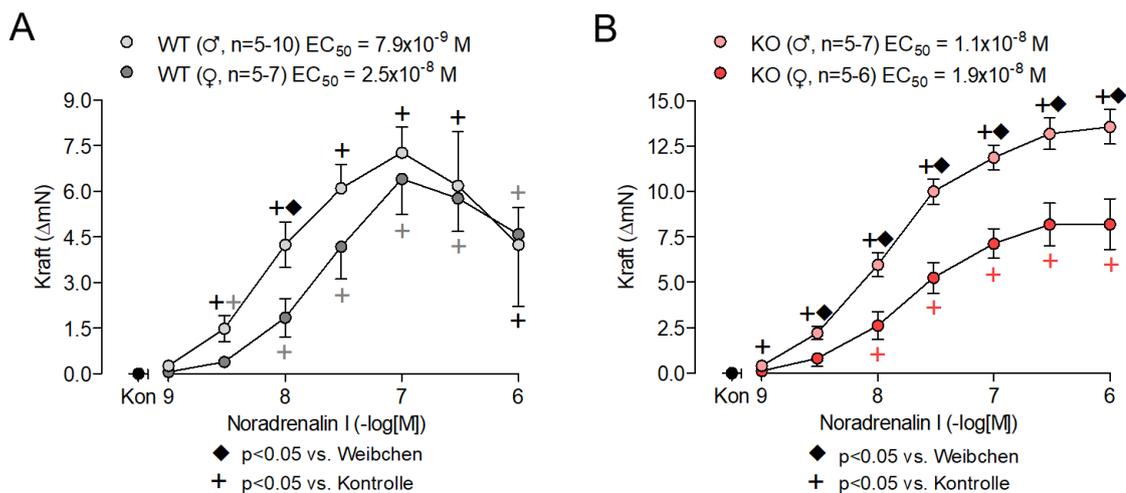


Abb. 21: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin, Geschlechtervergleich.

A, WT, Darstellung in delta-mN; B, KO, Darstellung in delta-mN; Bei den KO kontrahierten die Männchen ab der zweiten Konzentration deutlich stärker. Bei den WT-Weibchen ist die

Kontraktion für die Konzentration 100 nmol schwächer. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

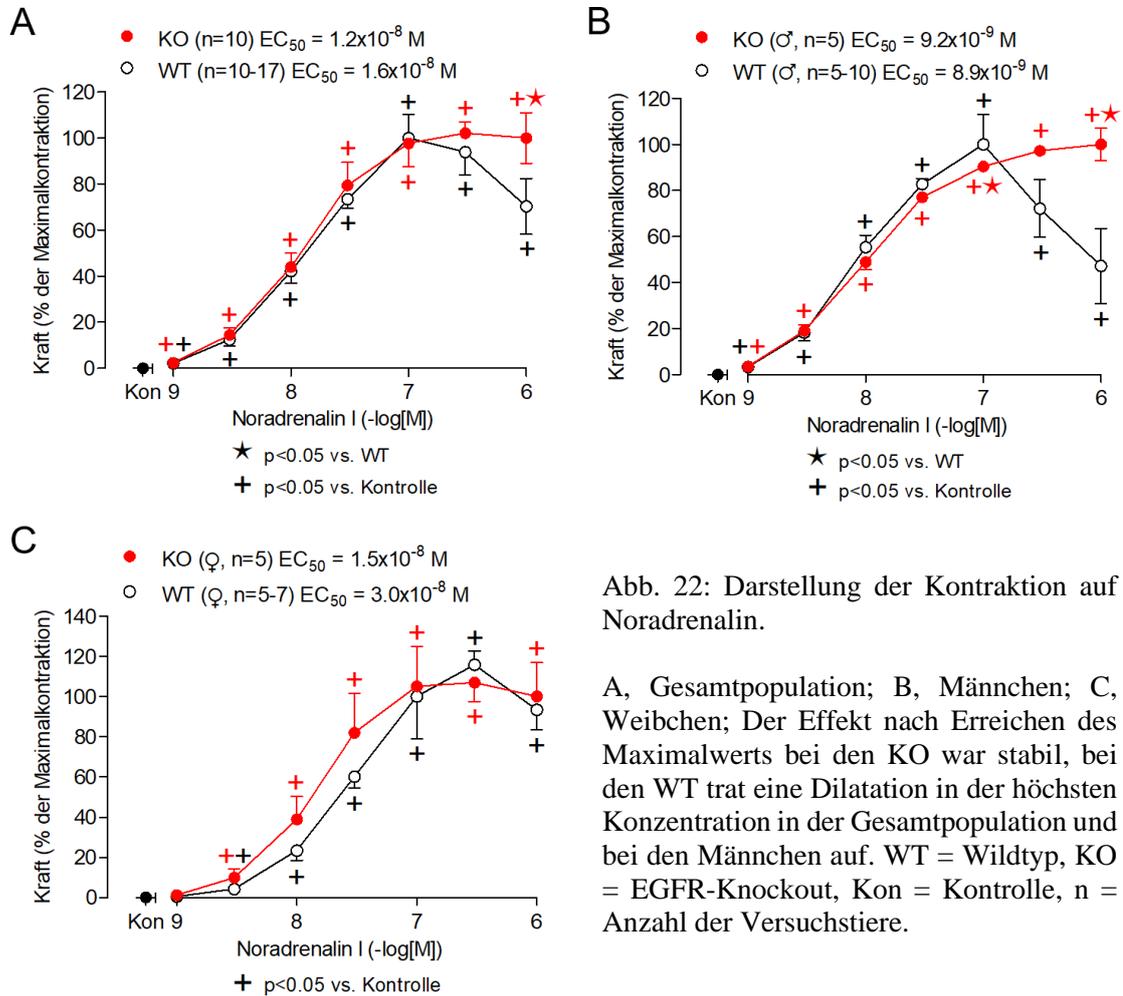


Abb. 22: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin.

A, Gesamtpopulation; B, Männchen; C, Weibchen; Der Effekt nach Erreichen des Maximalwerts bei den KO war stabil, bei den WT trat eine Dilatation in der höchsten Konzentration in der Gesamtpopulation und bei den Männchen auf. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

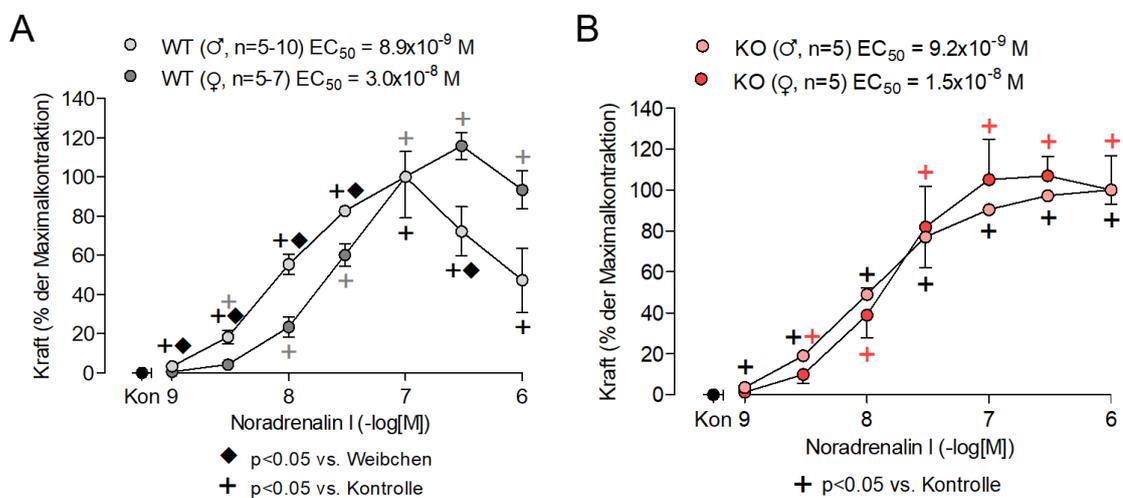


Abb. 23: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin, Geschlechtervergleich.

A, WT; B, KO. Bei der prozentualen Darstellung zeigte sich bei den KO kein Unterschied in der Kontraktion. Bei den WT-Männchen trat eine stärkere Kontraktion und Dilatation bezogen auf den Maximaleffekt auf. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

#### 4.2.7 Noradrenalin II

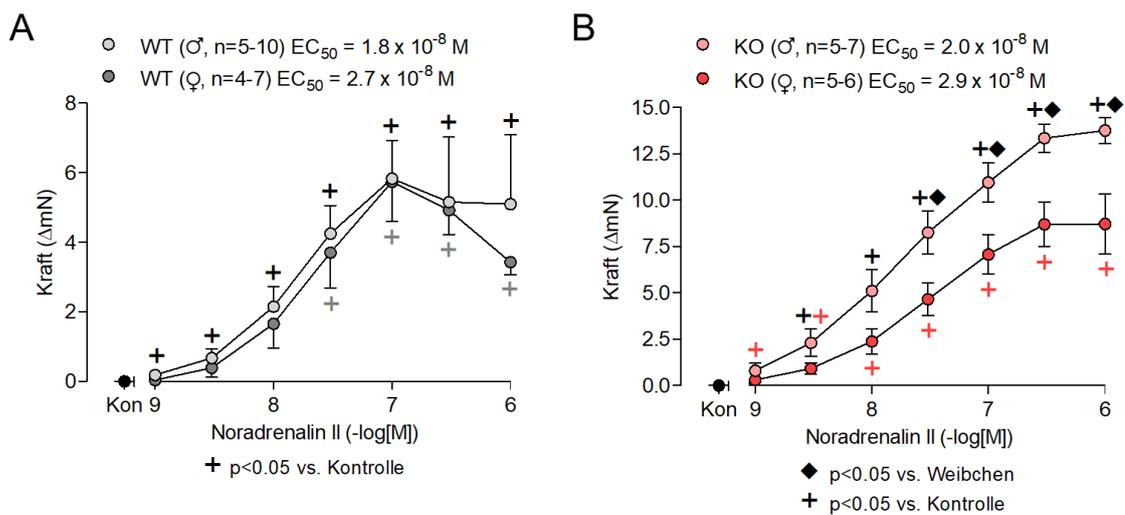
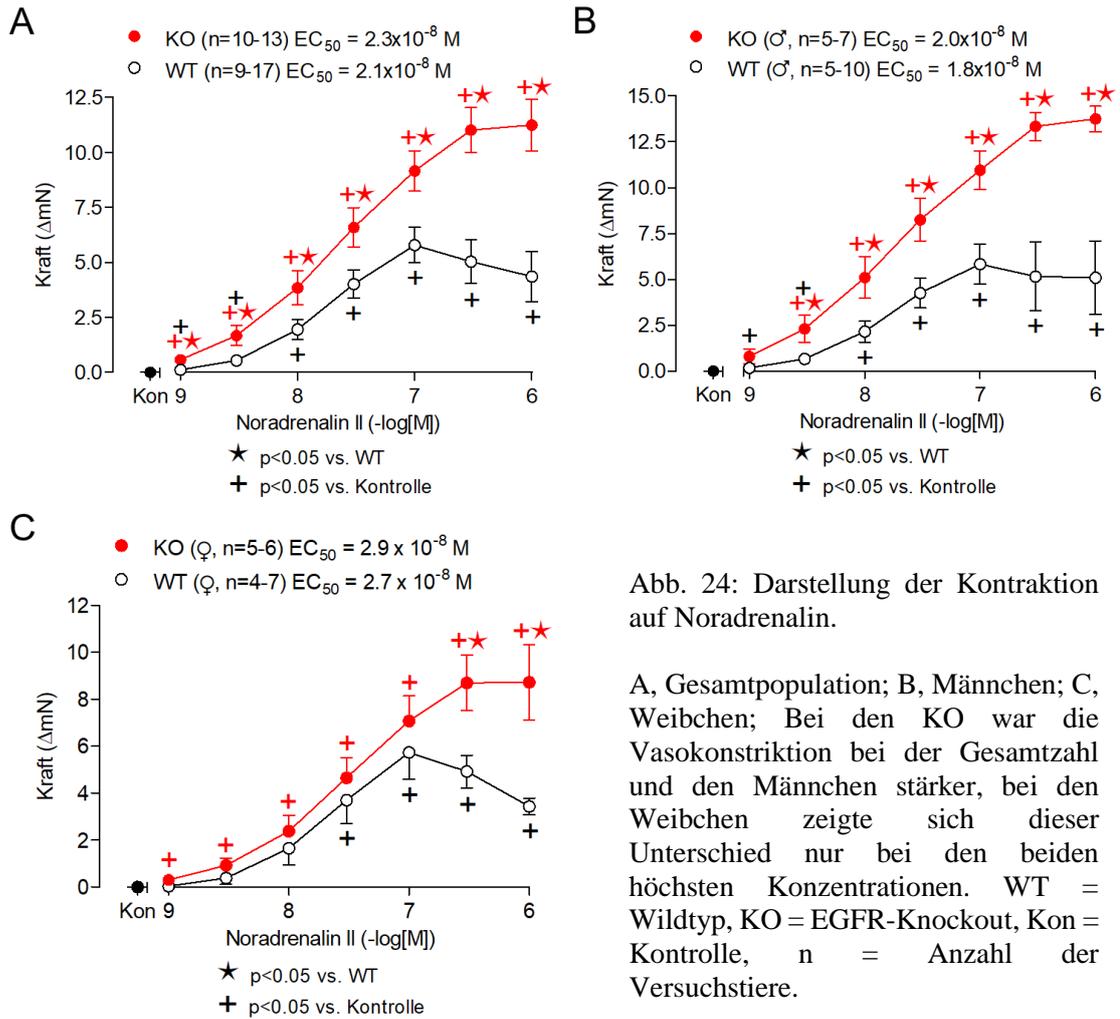
Auf die zweite Noradrenalin-KWK erfolgte ebenfalls eine konzentrationsabhängige, zunehmende Kontraktion bei WT und KO sowie eine bei den beiden höchsten Konzentrationen auftretende Dilatation nur bei den WT, welche bereits bei der ersten KWK beobachtet worden war. Die Noradrenalin-abhängigen Kontraktionsdaten sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei beiden Mausreihen trat ab der ersten Konzentration eine Vasokonstriktion auf ( $p < 0,05$ ; Abb. 24A). Bei der Auftrennung nach Geschlecht sah man bei den Aortenringen der WT-Weibchen eine Kontraktion ab einer Konzentration von 30 nM, bei den Männchen ab 10 nM. Bei den KO setzte bei den Weibchen eine sofortige Vasokonstriktion ein, bei den Männchen ab der zweiten Konzentration ( $p < 0,05$ , Abb. 24B, C). Beim Vergleich der Geschlechter innerhalb einer Mauslinie ergab sich für die WT kein Unterschied. Bei den KO-Männchen war die Vasokonstriktion, wie bereits bei der ersten KWK, stärker ab einer Konzentration von 30 nM ( $p < 0,05$ , Abb. 25). Beim Vergleich der Kontraktion auf Noradrenalin in beiden Mauslinien fand sich ab der ersten Konzentration ein ausgeprägterer Effekt bei den KO ( $p < 0,05$ , Abb. 24A). Aufgetrennt nach Geschlecht trat ein Unterschied bei den Weibchen erst dann auf, als der vasodilatierende Effekt der hohen Noradrenalin-Konzentrationen bei den WT einsetzte ( $p < 0,05$ , Abb. 24B). Bei den Männchen hingegen war der Unterschied ab der zweiten Konzentration zu sehen ( $p < 0,05$ , Abb. 24C). Wie bei der ersten Noradrenalin-KWK wurden zur Berechnung der  $EC_{50}$ -Werte die letzten beiden Konzentrationen bei den WT nicht hinzugezogen. Auch hier entsprechen die Ergebnisse den bereits oben erwähnten Werten. Bei Normierung der Kontraktionsdaten auf die Maximalkontraktion (Abb. 26) war bei der Gesamtpopulation, den Männchen und KO-Weibchen eine Vasokonstriktion ab der ersten Konzentration zu sehen ( $p < 0,05$ , Abb. 26A-C), bei den WT-Weibchen ab der dritten Konzentration ( $p < 0,05$ , Abb. 26B). Auch in dieser Darstellung war die Kontraktion der Aortenringe für alle Konzentrationen bei den KO stärker als bei den WT ( $p < 0,05$ , Abb. 26A). Bei den WT-Weibchen kam es bei den Konzentrationen 300 nmol und 1000 nmol zu einer Vasodilatation ( $p < 0,05$ , Abb. 26C), die Kontraktion der Aortenringe von WT-Männchen war bei Konzentrationen von 1 nmol und 100 nmol schwächer ( $p < 0,05$ , Abb. 26B). Bei dem Vergleich der Geschlechter ergab sich bei WT und KO ein ähnlicher Kurvenverlauf (Abb. 27). Die Kontraktion der Aortenringe gegenüber der Vorspannung trat bei den WT-Männchen ab der ersten Konzentration auf, bei

den Weibchen ab der dritten (Abb. 27A). Bei den KO kontrahierten beide ab der ersten Noradrenalin-Konzentration (Abb. 27B). Bei einem Vergleich innerhalb einer Mauslinie sahen die graphischen Darstellungen der Noradrenalin-KWKs sehr ähnlich aus. Es zeigten sich weder in der Darstellung als delta-mN, noch in der Darstellung als Prozentangabe bezogen auf die jeweilige maximale Kontraktion Unterschiede (Abb. 28).

Tabelle 2: Zweite Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Noradrenalin.

Dargestellt ist die Kraftentwicklung der Aortenringe nach Applikation der verschiedenen Noradrenalin-Konzentrationen in mN. Es zeigte sich eine allmähliche Zunahme der Kontraktion. MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung, WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout. 1. T-Test, + p<0,05 gegen Vorspannung; 2. T-Test, ★ p<0,05 gegen Wildtyp

Konzentration (nM)		Gesamt		Männchen		Weibchen	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO
1	MW	0,12	0,58	0,18	0,81	0,04	0,30
	SEM	0,05	0,23	0,08	0,39	0,04	0,11
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	0,074	0,337	p<0.05+
	2. T-TEST		p<0.05★		0,100		0,060
3	MW	0,55	1,67	0,67	2,31	0,39	0,92
	SEM	0,19	0,46	0,27	0,73	0,27	0,31
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	0,207	p<0.05+
	2. T-TEST		p<0.05★		p<0.05★		0,250
10	MW	1,95	3,85	2,15	5,11	1,66	2,38
	SEM	0,45	0,78	0,58	1,14	0,71	0,67
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	0,052	p<0.05+
	2. T-TEST		p<0.05★		p<0.05★		0,510
30	MW	4,02	6,59	4,25	8,26	3,70	4,65
	SEM	0,64	0,89	0,81	1,16	1,01	0,87
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+
	2. T-TEST		p<0.05★		p<0.05★		0,530
100	MW	5,79	9,16	5,83	10,96	5,74	7,07
	SEM	0,80	0,92	1,09	1,05	1,15	1,06
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+
	2. T-TEST		p<0.05★		p<0.05★		0,460
300	MW	5,04	11,02	5,16	13,34	4,92	8,70
	SEM	1,00	1,02	1,87	0,76	0,70	1,19
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+
	2. T-TEST		p<0.05★		p<0.05★		p<0.05★
1000	MW	4,36	11,24	5,10	13,75	3,43	8,72
	SEM	1,15	1,18	1,99	0,69	0,36	1,61
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+
	2. T-TEST		p<0.05★		p<0.05★		p<0.05★



A, WT; Es bestand kein Unterschied in der Vasokonstriktion auf die zweite Noradrenalin-Applikation zwischen Männchen und Weibchen; B, KO; Die Männchen reagierten mit einer stärkeren Vasokonstriktion ab einer Noradrenalin-Konzentration von 30 nM. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

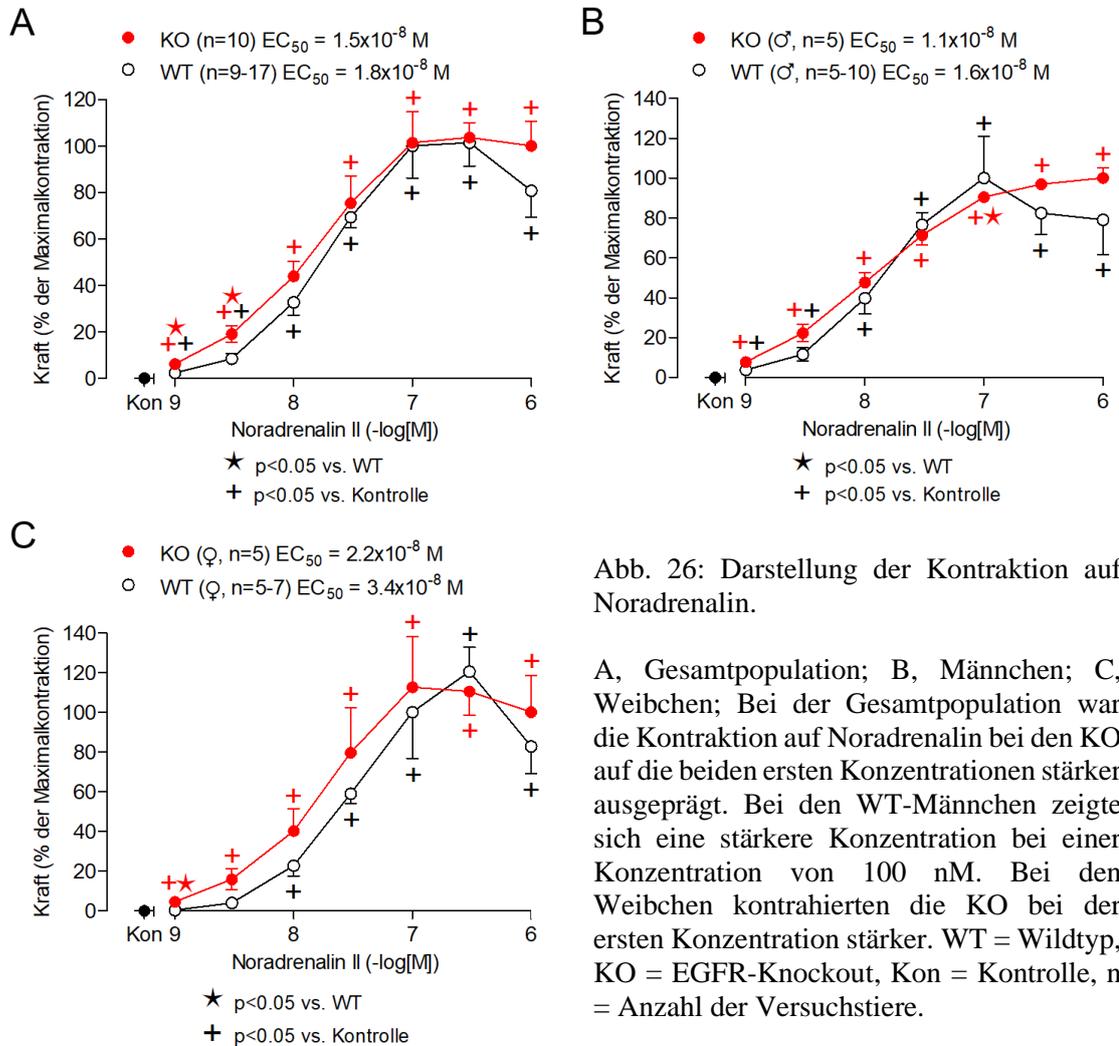


Abb. 26: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin.

A, Gesamtpopulation; B, Männchen; C, Weibchen; Bei der Gesamtpopulation war die Kontraktion auf Noradrenalin bei den KO auf die beiden ersten Konzentrationen stärker ausgeprägt. Bei den WT-Männchen zeigte sich eine stärkere Konzentration bei einer Konzentration von 100 nM. Bei den Weibchen kontrahierten die KO bei der ersten Konzentration stärker. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

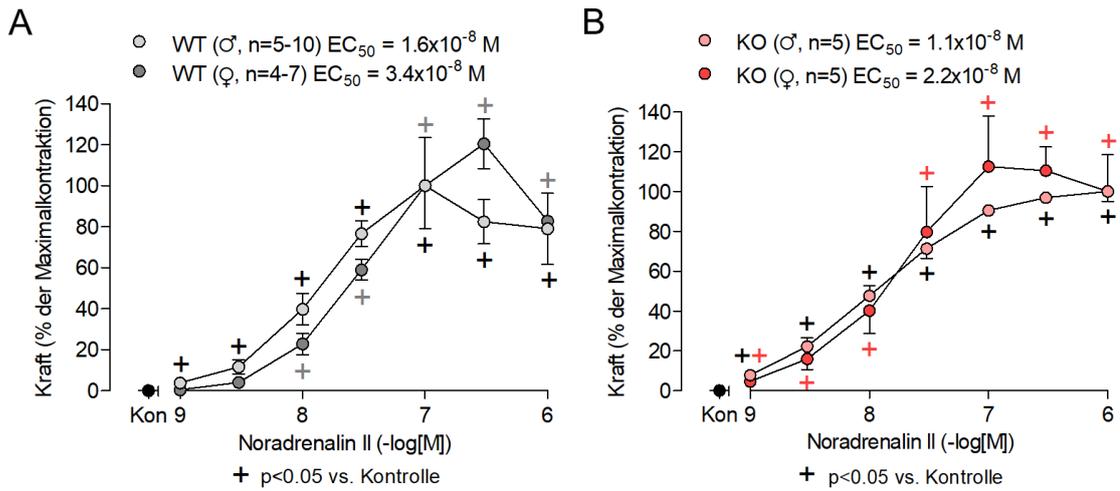
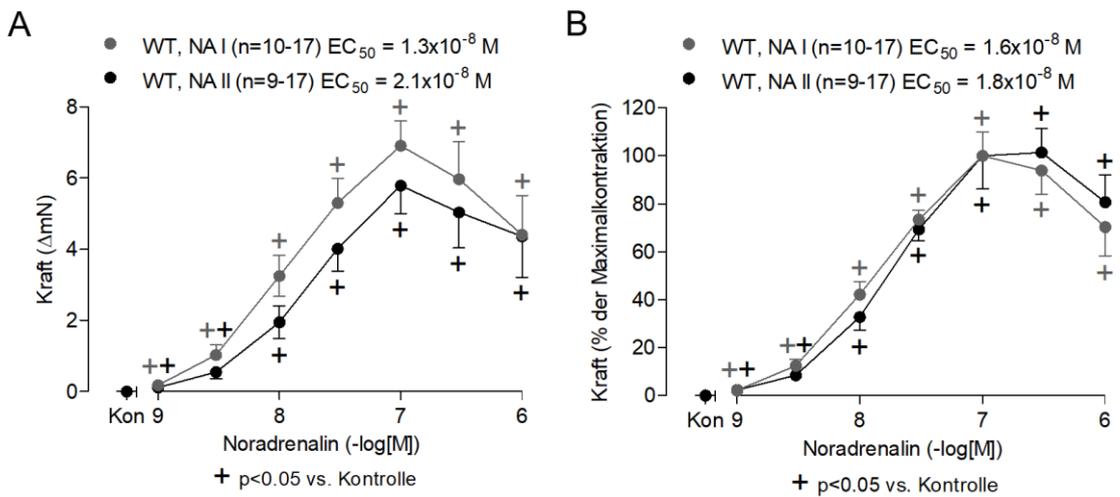


Abb. 27: Darstellung der Kontraktion auf Noradrenalin, Geschlechtervergleich.

A, WT. B, KO. Es bestand kein Unterschied in der Vasokonstriktion beim Vergleich der Geschlechter innerhalb der Mauslinien. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.



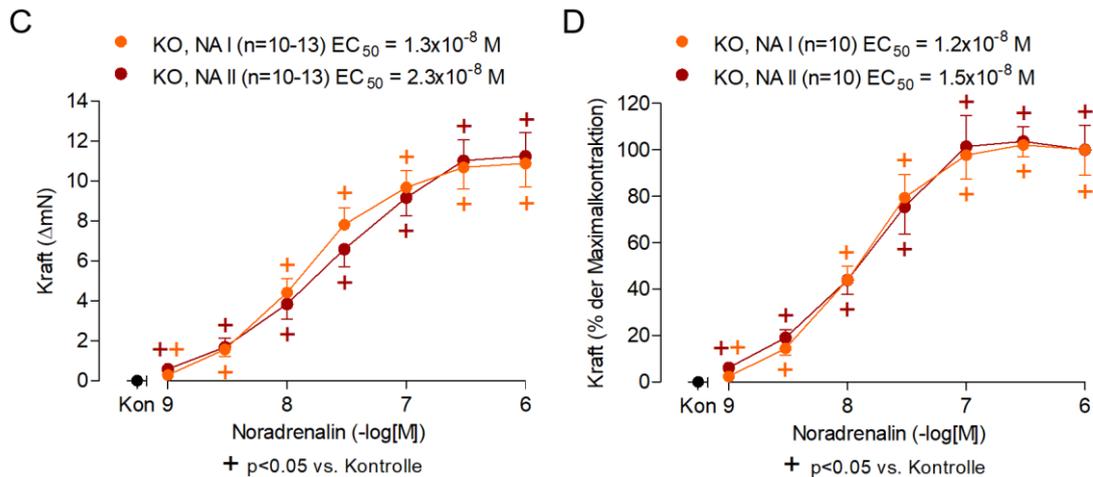


Abb. 28: Vergleich der Kontraktion auf Noradrenalin I und II.

A, WT, Darstellung in delta-mN; B, WT, Darstellung in Prozent des Maximaleffekts; C, KO, Darstellung in delta-mN; D, KO, Darstellung in Prozent des Maximaleffekts. Es zeigt sich kein Unterschied in der Kontraktion auf die beiden nacheinander zugegebenen Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

#### 4.2.8 Carbachol

Carbachol wurde als Konzentrations-Wirkungskurve in den Konzentrationen 100 nM, 300 nM, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M appliziert, worauf die Gefäße mit einer zunehmenden Dilatation reagierten, wie bereits zuvor gezeigt. Diese war sowohl bei den WT als auch bei den KO nachweisbar. Die Ergebnisse der Vasodilatation in delta-mN sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Vasodilatation trat bei WT und KO ab der ersten Konzentration auf ( $p < 0,05$ , Abb. 29A). Bei den WT-Weibchen trat eine Vasodilatation ab der dritten (1  $\mu$ M), bei den KO-Weibchen ab der ersten Konzentration auf ( $p < 0,05$ , Abb. 29B). In einer Varianzanalyse mittels ANOVA werden die Werte bei den Weibchen in beiden Mauslinien ab der zweiten Konzentration signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei den Männchen verhielt es sich umgekehrt ( $p < 0,05$ , Abb. 30C). In einer Varianzanalyse mittels ANOVA ändert sich hierbei nichts. Bei den Männchen war die Vasodilatation in niedrigeren Konzentrationen (100 nM, 300 nM, 1  $\mu$ M) bei den WT tendenziell stärker. Die maximale Dilatation fiel bei den KO in allen Gruppen tendenziell stärker aus ( $p > 0,05$ ). Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen war jedoch nicht nachzuweisen. In einer Varianzanalyse mittels ANOVA wird dieser Wert signifikant ( $p < 0,05$ .) Vergleicht man die Geschlechter einer Gruppe zeigte sich für alle delta-mN-Werte bei WT und KO eine scheinbar stärkere Dilatation bei den Weibchen, welche allerdings ebenfalls nicht statistisch signifikant war ( $p > 0,05$ , Abb. 30). In einer Varianzanalyse mittels

ANOVA wird dieser Wert signifikant ( $p < 0,05$ .) Die  $IC_{50}$ -Werte entsprachen bei den WT-Tieren in etwa den Ergebnissen, welche aus anderen Versuchen bekannt waren (Glaza et al. 2011), wichen bei den KO allerdings stärker davon ab (Abb. 29, 30). Bei Normierung der Dilatationsdaten auf den maximalen Effekt war eine Dilatation bei der Gesamtpopulation, den WT-Männchen und den KO-Weibchen ab der ersten Konzentration nachweisbar ( $p < 0,05$ , Abb. 31). Bei WT Weibchen und KO-Männchen kam es zu einer Vasodilatation ab der zweiten Konzentration (Abb. 31B, C). Im Vergleich der beiden Mauslinien war bei den WT bei der Gesamtpopulation und den Männchen für die Konzentrationen 300 nM, 1  $\mu$ M und 3  $\mu$ M eine ausgeprägtere Dilatation zu sehen ( $p < 0,05$ , Abb. 31A, C). Bei den Weibchen war kein Unterschied nachweisbar (Abb. 31B). Beim Geschlechtervergleich in der Prozentdarstellung des Maximaleffekts dilatierten die WT-Männchen stärker bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M. Bei den KO war der Effekt bei den Weibchen bei den Konzentrationen 300 nM, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M stärker ausgeprägt ( $p < 0,05$ , Abb. 32). Bei den  $IC_{50}$ -Werten zeigten sich unterschiedliche Werte, welche je nach Geschlecht und Darstellung stark variierten (Abb. 31, 32).

Tabelle 3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Carbachol.

Dargestellt ist die Kraftentwicklung in den Mausearten nach Applikation der verschiedenen Carbachol-Konzentrationen in mN. Es zeigte sich eine allmähliche Abnahme der Kontraktion. MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung, WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout. 1. T-Test, +  $p < 0,05$  gegen Vorspannung; 2. T-Test gegen Wildtyp

Konzentration ( $\mu$ M)		Gesamt		Männchen		Weibchen	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO
0,1	MW	-0.74	-0.91	-0.37	-0.07	-1.58	-1.55
	SEM	0.36	0.50	0.13	0.05	1.03	0.73
	1. T-TEST	$p < 0.05+$	$p < 0.05+$	$p < 0.05+$	0.133	0.132	$p < 0.05+$
	2. T-TEST		0.790		0.250		0.990
0,3	MW	-1.65	-1.96	-1.17	-0.50	-2.73	-3.05
	SEM	0.58	0.67	0.28	0.33	1.64	0.79
	1. T-TEST	$p < 0.05+$	$p < 0.05+$	$p < 0.05+$	0.072	0.106	$p < 0.05+$
	2. T-TEST		0.750		0.280		0.880
1	MW	-2.80	-3.66	-2.43	-1.47	-3.63	-5.30
	SEM	0.67	0.98	0.57	0.65	1.68	1.08
	1. T-TEST	$p < 0.05+$					
	2. T-TEST		0.490		0.420		0.500
3	MW	-3.45	-5.19	-3.02	-3.23	-4.43	-6.65
	SEM	0.64	1.15	0.65	1.16	1.35	1.44
	1. T-TEST	$p < 0.05+$					
	2. T-TEST		0.190		0.890		0.370
10	MW	-3.71	-5.84	-3.32	-4.96	-4.30	-7.08
	SEM	0.61	0.86	0.71	1.01	1.06	1.31
	1. T-TEST	$p < 0.05+$					
	2. T-TEST		0.060		0.220		0.170

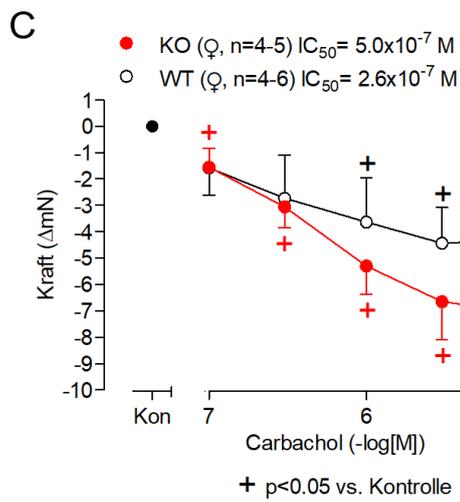
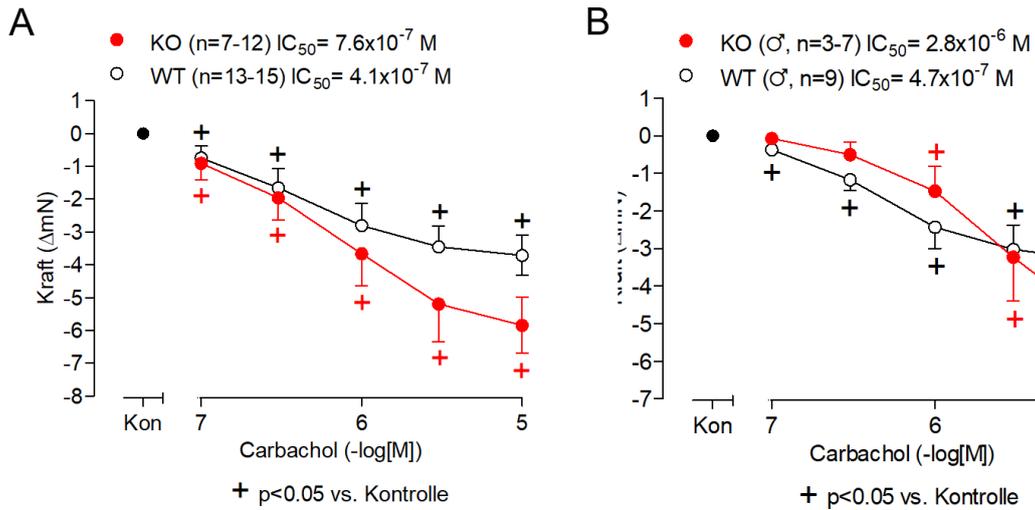


Abb. 29: Darstellung der Dilatation auf Carbachol.

A, Gesamtpopulation; B, Männchen; C, Weibchen; Es war kein Unterschied in der Vasodilatation zwischen WT und KO nachweisbar. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

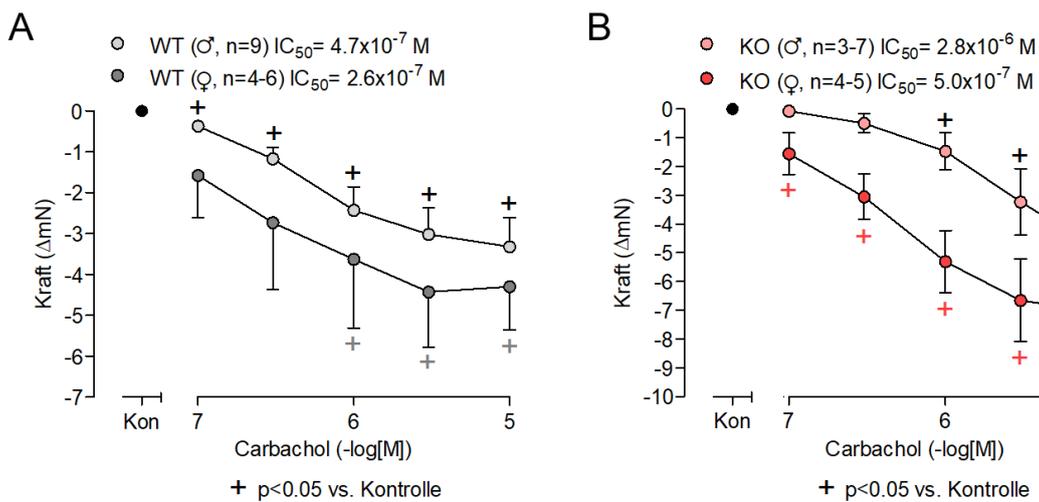


Abb. 30: Darstellung der Dilatation auf Carbachol, Geschlechtervergleich.

A, WT, B, KO. In beiden Mauslinien bestand kein Unterschied in der Dilatation des Gefäßes zwischen den Geschlechtern. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

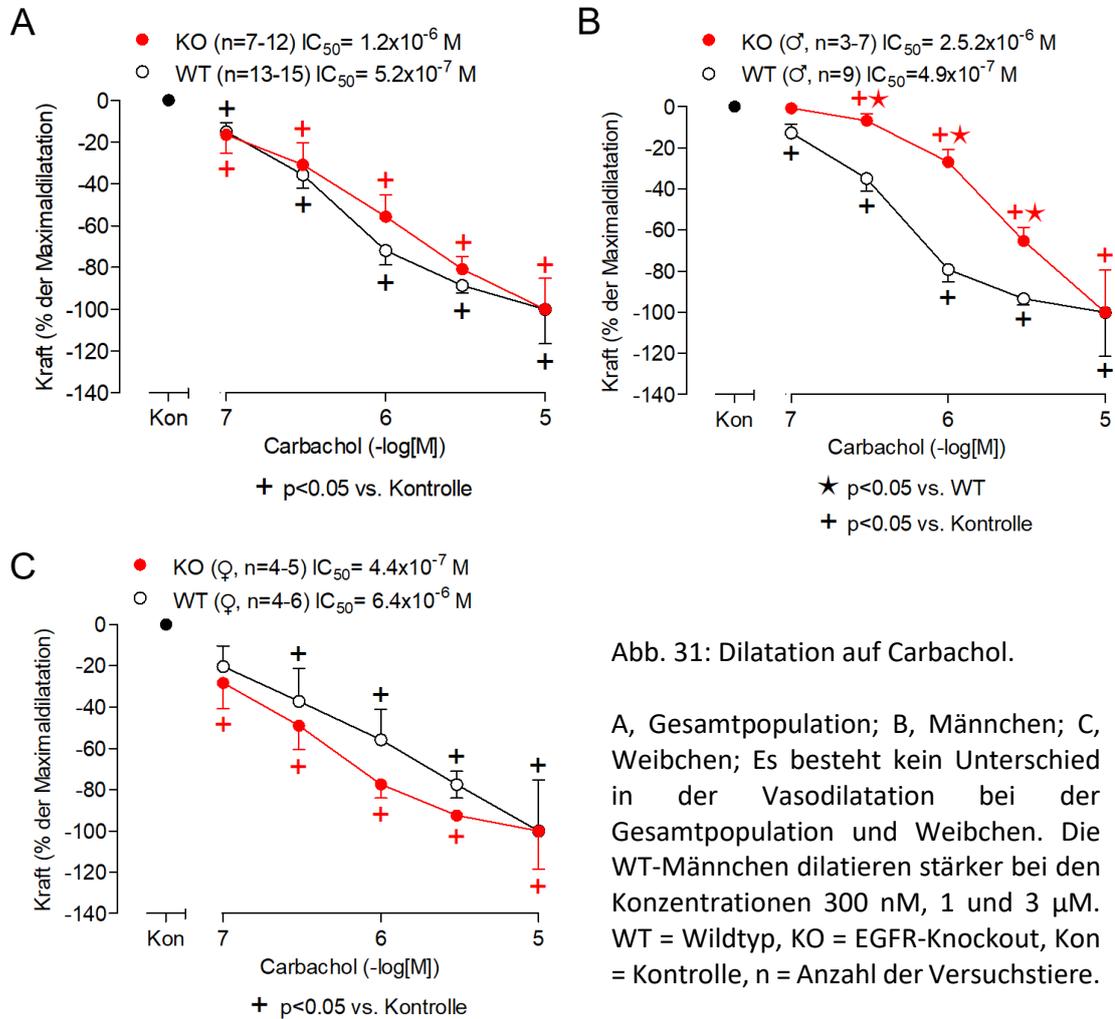


Abb. 31: Dilatation auf Carbachol.

A, Gesamtpopulation; B, Männchen; C, Weibchen; Es besteht kein Unterschied in der Vasodilatation bei der Gesamtpopulation und Weibchen. Die WT-Männchen dilatieren stärker bei den Konzentrationen 300 nM, 1 und 3  $\mu$ M. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

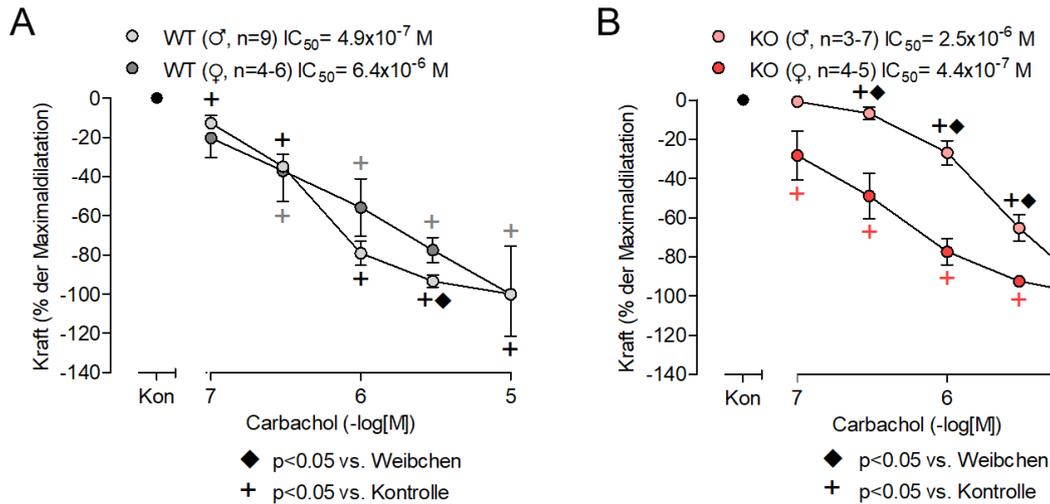


Abb. 32: Darstellung der Dilatation auf Carbachol, Geschlechtervergleich.

A, WT, B, KO. Bei den WT fällt die Dilatation des Gefäßes bei den Weibchen in der vierten Konzentration stärker aus. Bei den KO dilatieren die Weibchen ab der zweiten Konzentration stärker. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

#### 4.2.9 Natrium-Nitrit ( $NaNO_2$ )

Natrium-Nitrit als NO-Donor wurde in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu$ M appliziert und löste eine konzentrationsabhängige Dilatation der Aortenringe sowohl bei WT als auch bei KO aus, welche in niedrigen Konzentrationen nur sehr gering und bei der höchsten Konzentration von 100  $\mu$ M am stärksten ausfiel. Die Ergebnisse der Vasodilatation in delta-mN sind in Tabelle 4 dargestellt. Ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M trat bei WT- und KO-Männchen und -Weibchen eine Vasodilatation gegenüber der Vorspannung, bei der WT-Gesamtpopulation schon ab 3  $\mu$ M auf. Zwischen WT und KO war weder in der Gesamtpopulation noch bei Auftrennung nach Geschlecht ein Unterschied in der Dilatation festzustellen ( $p < 0,05$ , Abb. 33). Die  $IC_{50}$ -Konzentration für die männlichen und weiblichen Tiere war sehr unterschiedlich und schwankend. Bei der Darstellung in Prozent der Maximalkonzentration verhielt es sich ähnlich wie in delta-mN. Eine Vasodilatation war in der Gesamtpopulation ab der ersten Natrium-Nitrit-Gabe vorhanden. Bei der Auftrennung nach Geschlecht kam es bei Weibchen und Männchen sowohl bei WT als auch KO erst nach der dritten Konzentration zu einer Vasodilatation. Es bestand kein Unterschied zwischen WT und KO ( $p > 0,05$ , Abb. 35). Beim Vergleich von Männchen und Weibchen innerhalb einer Kohorte zeigten sich vergleichbare vasodilatierende Effekte. Die Dilatation setzte ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M ein. Für die Männchen und Weibchen ergaben sich keine

Unterschiede, weder in der Darstellung in delta-mN ( $p > 0,05$ , Abb. 34) noch in der Normierung auf die Maximalkonzentration (ohne Darstellung).

Tabelle 4: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Natrium-Nitrit.

Dargestellt ist die Kraftentwicklung in den Mausearten nach Applikation der verschiedenen Natrium-Nitrit-Konzentrationen in mN. Es zeigt sich eine allmähliche Abnahme der Kontraktion. MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung, WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout. 1. T-Test, +  $p < 0,05$  gegen Vorspannung; 2. T-Test gegen Wildtyp. K.W. = kein Wert, da keine Berechnung möglich.

Konzentration ( $\mu\text{M}$ )		Gesamt		Männchen		Weibchen	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO
1	MW	-0.04	-0.05	-0.06	0.00	0.00	-0.08
	SEM	0.04	0.05	0.06	0.00	0.00	0.07
	1. T-TEST	0.280	0.210	0.332	k.W.	k.W.	0.297
	2. T-TEST		0.918		0.606		0.407
3	MW	-0.16	-0.13	-0.23	0.00	0.00	-0.20
	SEM	0.07	0.09	0.10	0.00		0.14
	1. T-TEST	p<0.05+	0.120	0.069	k.W.	k.W.	0.186
	2. T-TEST		0.761		0.257		0.292
10	MW	-0.41	-0.45	-0.42	-0.37	-0.40	-0.50
	SEM	0.10	0.13	0.12	0.15	0.19	0.19
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+
	2. T-TEST		0.842		0.841		0.754
30	MW	-1.04	-1.10	-0.88	-1.27	-1.45	-1.00
	SEM	0.27	0.29	0.21	0.45	0.73	0.38
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+
	2. T-TEST		0.897		0.452		0.625
100	MW	-2.15	-2.65	-1.88	-2.87	-2.53	-2.43
	SEM	0.41	0.48	0.29	0.70	0.89	0.63
	1. T-TEST	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+	p<0.05+
	2. T-TEST		0.448		0.183		0.939

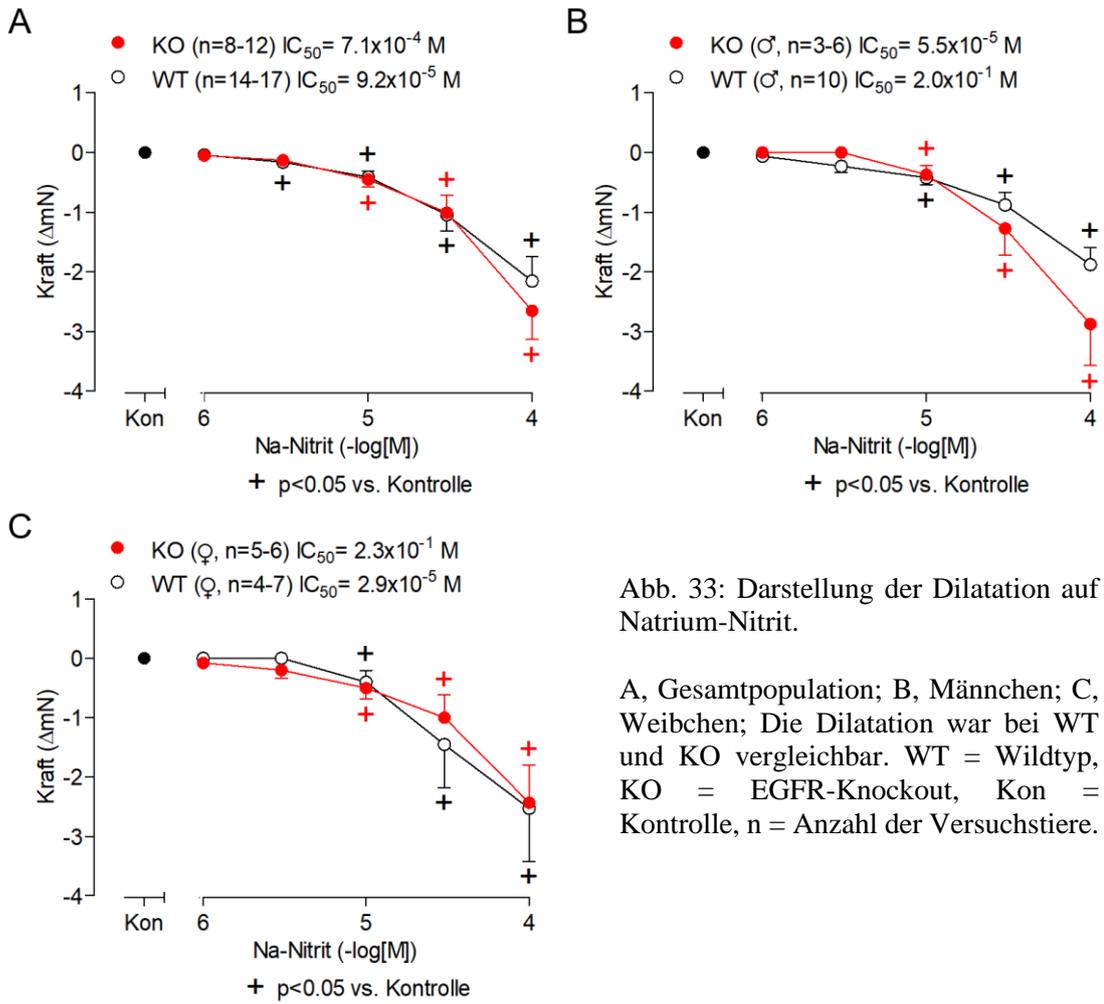


Abb. 33: Darstellung der Dilatation auf Natrium-Nitrit.

A, Gesamtpopulation; B, Männchen; C, Weibchen; Die Dilatation war bei WT und KO vergleichbar. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

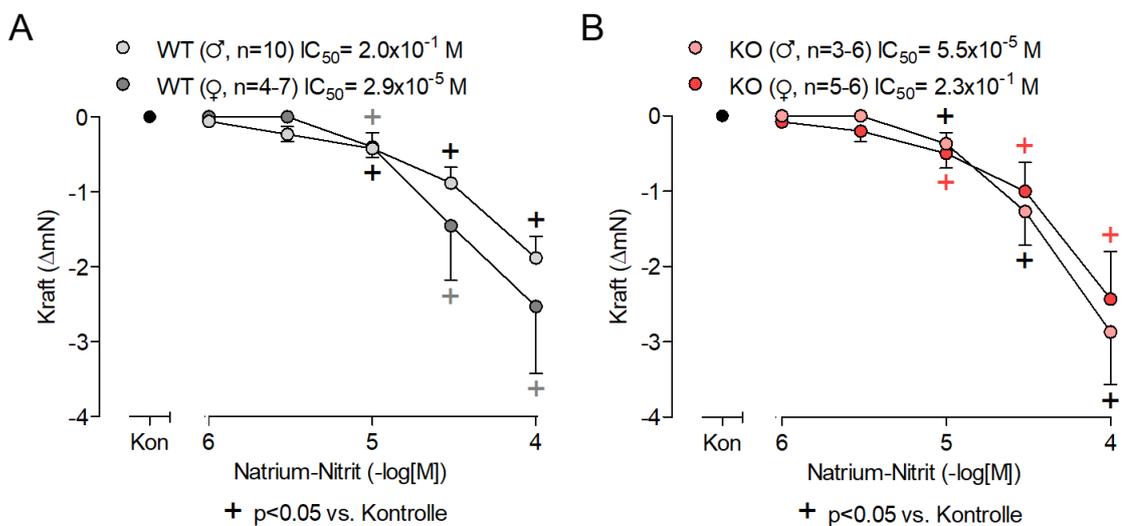


Abb. 34: Darstellung der Dilatation auf Natrium-Nitrit, Geschlechtervergleich.

A, WT; B, KO. In beiden Mauslinien bestand kein Unterschied in der Dilatation des Gefäßes zwischen den Geschlechtern. Eine Dilatation setzte erst ab einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  ein. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

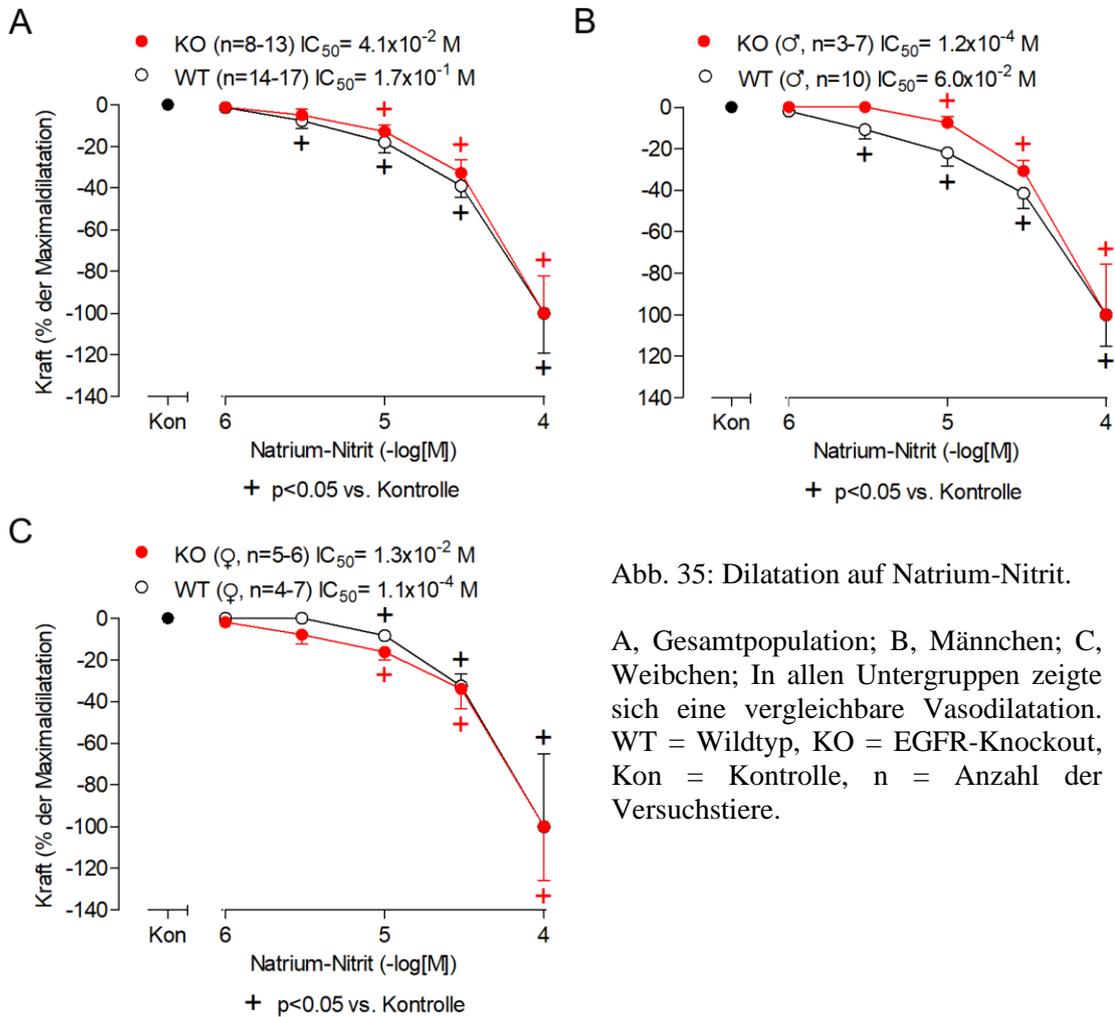


Abb. 35: Dilatation auf Natrium-Nitrit.

A, Gesamtpopulation; B, Männchen; C, Weibchen; In allen Untergruppen zeigte sich eine vergleichbare Vasodilatation. WT = Wildtyp, KO = EGFR-Knockout, Kon = Kontrolle, n = Anzahl der Versuchstiere.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

#### 5.1.1 Knockout-Mausmodell

Phänotypisch war kein Unterschied zwischen WT und KO auszumachen, allerdings waren die Herzen der KO bei gleichem Gewicht und gleicher Tibiallänge deutlich hypertrophiert. Bei C57BL/6 Mäusen mit Einzelnukleotidmutation im EGFR-Gen, welche mit einer über 90%igen Reduktion der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität einhergeht, zeigte sich eine Störung der Valvulogenese mit Linksherzhypertrophie, Aortenklappendysfunktion und Herzversagen. Histologisch fanden sich verdickte Klappensegel, Kalzifikationen, eine Veränderung der extrazellulären Matrix sowie interstitielle Zellproliferation und Inflammation (Porras und Masters 2015). Für Prostaglandin E2 zeigte sich via Transaktivierung des EGFR eine Beteiligung an der pathophysiologischen Entwicklung einer Hypertrophie von Kardiomyozyten in neonatalen Rattenherz-Zellkulturen (Pang et al. 2016). In neonatalen Kardiomyozyten von Ratten wurde via  $\beta_2$ -Adrenozeptoren und EGFR-Transaktivierung allerdings ebenfalls das Zellüberleben gefördert (Chen et al. 2012). Die Ergebnisse unserer Versuche sprechen für eine wichtige Rolle des EGFR in der Entwicklung einer Hypertrophie des Herzens. Die genetische Deletion des EGFR mit einer auf Proteinebene reduzierten Nachweisbarkeit auf 40% der WT-Aktivität führt zu einer Linksherzhypertrophie und -dilatation mit reduziertem Überleben der Versuchstiere. Histologisch ließen sich keine Fibrose oder myokardialen Läsionen nachweisen, sondern lediglich vergrößerte Kardiomyozyten als Zeichen einer physiologischen Hypertrophie mit möglicherweise fatalen Arrhythmien als Auslöser der frühen Sterblichkeit (Schreier et al. 2013). Als Zeichen eines oxidativen Stresses fand sich eine erhöhte NOX4 mRNA-Expression und -Aktivität (Schreier et al. 2013). Dies spielt im kardialen Umbau und Herzversagen eine Rolle (Tsutsui et al. 2011). Dabei schränken ROS durch Proteinveränderungen die kontraktile Funktion ein, aktivieren Hypertrophie-auslösende Signalkaskaden und leiten eine Apoptose ein (Tsutsui et al. 2011). In einem Mausmodell, in welchem der EGFR nur in VSMC ausgeschaltet wurde, bestand keine kardiale Hypertrophie, was gegen eine kompensatorische Hypertrophie aufgrund vaskulärer Veränderungen spricht (Schreier et al. 2016). Bei Mäusen mit einer artifiziellen kardialen Drucküberlastung führte die Applikation eines Urotensin II-Antagonisten zu einer kardialen Dysfunktion mit reduzierter Phosphorylierung des EGFR und erhöhter Apoptose sowie Fibrose. Über die Aktivierung des Urotensin-Rezeptors und Transaktivierung des EGFR wurde das Zellüberleben verbessert (Esposito et al. 2011). Des Weiteren wurde eine wichtige Rolle des EGFR in der ischämischen Präkonditionierung in Mäuseherzen und HL-1 Myozyten beschrieben, welche über eine Transaktivierung durch Adenosinrezeptoren via MMP, HB-EGF und ERK1/2

erfolgt (Williams-Pritchard et al. 2011). In der H9C2-Zelllinie von Rattenkardiomyozyten zeigte sich ein kardioprotektiver Effekt durch Muskarinrezeptoren via EGFR-Transaktivierung vermittelt über den PI<sub>3</sub>K/Akt-Signalweg. Dabei konnte ein TNF- $\alpha$  vermittelter ER-Stress and Apoptose verhindert werden (Miao et al. 2015). Mittlerweile gibt es eine zunehmende Evidenz für eine wichtige protektive Funktion des EGFR durch Transaktivierung bei kardialen Stress (Xu und Cai 2015; Reichelt et al. 2017). Via EGFR werden abhängig vom jeweiligen transaktivierenden GPCR physiologische sowie pathologische Signale vermittelt und inflammatorische, profibrotische und apoptotische Prozesse in Gang gesetzt. Er verbessert aber auch das Zellüberleben und vermittelt die physiologische Hypertrophie. Somit ist er auch an der Aufrechterhaltung und Homöostase der Herzfunktion beteiligt (Grisanti et al. 2017).

### 5.1.2 Präparation

Bei der Präparation wurde der proximale Teil der Aorta descendens nach dem Arcus aortae verwendet und das Gefäß unmittelbar nach Austritt aus dem Herzen abgetrennt. Allerdings erfolgten keine Längenmessungen. Für C57BL/6-Mäuse wurde nachgewiesen, dass die vasokonstriktive Antwort auf KCl, Noradrenalin und Serotonin abhängig vom verwendeten Gefäß ist. Selbst innerhalb der Aorta bestanden Unterschiede zwischen dem thorakalen und abdominalen Teil. Gleiches gilt für die Endothel-abhängige und -unabhängige Vasodilatation (Kleinbongard et al. 2013; Yu et al. 2015). Die Präparation der Aortenringe war technisch herausfordernd, da unter dem Mikroskop präpariert wurde. Es wurde schonend gearbeitet, um jegliche Scherkräfte zu vermeiden, trotzdem waren die Präparate einem gewissen mechanischen Stress ausgesetzt. Beim Einfädeln des Drahtes könnte es unter Umständen zu einer Schädigung des Endothels mit konsekutiver Reaktion von Endothelzellen wie der Freisetzung von NO oder vasokonstriktiver Substanzen gekommen sein (Vanhoutte et al. 2017). Perivaskuläres Fettgewebe enthält ein «adrenerges System» und ist in der Lage Noradrenalin freizusetzen, aufzunehmen und zu metabolisieren. Für perivaskuläres Fett von Rattenmesenterien wurde gezeigt, dass es zu einer Abschwächung der kontraktile Effekte auf Noradrenalin führen kann. Verantwortlich dafür sind die Enzyme Semicarbazid-sensitive Aminoxidase (SSAO) und Monoaminoxidase (MAO-A), welche Noradrenalin spalten (Ayala-Lopez und Watts 2017; Ayala-Lopez et al. 2017). Es bestand kein Unterschied in der Präparation der beiden Mauslinien. Aufgrund der kleinen Zahl der Tiere fielen Ungenauigkeiten bei der Präparation aber möglicherweise stärker ins Gewicht.

### 5.1.3 Dehnbarkeit

Die benötigte Dehnung zum Einstellen einer vergleichbaren Vorspannung war bei den KO höher als bei den WT, was bedeutet, dass die Compliance, also die Elastizität der Aortenringe, nach Knockout des EGFR erhöht ist und die Gefäße weniger steif sind. Der Grund dafür ist ein dilatatives Remodeling, welches in Aorten und Koronarien von KO nachweisbar war. Der Aortendurchmesser in WT und KO war gleich, aber histologisch zeigte sich eine reduzierte Media-Dicke mit erniedrigter Wand-Lumen-Ratio und resultierendem erhöhten Wandstress und eine leichte Fibrose (Schreier et al. 2011). Bei in vivo-Versuchen waren mittlerer und diastolischer Blutdruck aufgrund eines geringeren peripheren Widerstands in KO erniedrigt (Schreier et al. 2013). Der systolische Blutdruck war aufgrund eines erhöhten Schlagvolumens gleich (Schreier et al. 2013). Zudem konnte in Versuchen mit AT II gezeigt werden, dass eine EGFR-abhängige Mediafibrose und Arterienwandversteifung bei Gefäßen mit einem EGFR-KO in VSMC nachweislich verhindert wird (Schreier et al. 2017). Die Ergebnisse sprechen für eine wichtige Funktion des EGFR in der Entwicklung der Gefäßarchitektur und der Zell-Homöostase (Schreier et al. 2017). Histologisch waren keine Unterschiede in den Aorten von Mäusen mit einem postnatalen EGFR-KO nachweisbar (Schreier et al. 2016). Die Unterschiede sind deshalb möglicherweise auf die entwicklungsbedingten Veränderungen im Herzen zurückzuführen (Schreier et al. 2016).

## 5.2 Kontraktionsversuche

### 5.2.1 Serotonin

Es bestanden keine Unterschiede im Kontraktionsverhalten der Aortenringe zwischen WT- und KO-Tieren oder zwischen den Geschlechtern. Auf die Applikation von Serotonin reagierten alle Gefäße mit einer transienten starken Kontraktion. Die Erstbeschreibung dieses Effekts liegt viele Jahrzehnte zurück (Watts et al. 2012). Für Serotonin sind abhängig von der Spezies, des zu untersuchenden Gefäßes, aktivierten Rezeptors, der Endothelintaktheit und des Vorliegens weiterer vasokonstriktiver Moleküle dilatierende und konstriktive Effekte beschrieben worden. Letztere werden dabei von 5-HT<sub>2A</sub>- oder 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren vermittelt und können durch ein beschädigtes Endothel sowie in Anwesenheit anderer Vasokonstriktoren wie KCl, Noradrenalin und Endothelin-1 verstärkt werden und den Effekt anderer Vasokonstriktoren wie Angiotensin II, Endothelin-1 oder Noradrenalin verstärken (Maassen van den Brink et al. 2008; Watts und Davis 2011). Später einsetzende vasodilatierende Effekte beruhen auf mehreren Faktoren wie der direkten 5-HT<sub>7</sub>-vermittelten Relaxation von VSMC und der Serotonin-vermittelten Freisetzung von NO durch Endothelzellen (Watts und Davis 2011; Machida et al. 2013). Eine Beteiligung an

der Kontraktion von VSMC durch Transaktivierung des EGFR via Serotoninrezeptoren wurde bisher nicht beschrieben. Allerdings konnten langfristige Effekte wie die Serotonin-induzierte Aktivierung von 5-HT<sub>2B</sub>- und geringer 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren in Astrozyten mittels EGFR-Transaktivierung durch Metalloproteinasen resultierend in einer ERK-Phosphorylierung (Li et al. 2010a) sowie eine 5-HT<sub>2A</sub>-induzierte Proliferation in mesangialen Nierenzellen nachgewiesen werden (Staruschenko 2014). Für eine Beteiligung des EGFR an der Serotonin-induzierten Kontraktion ergab sich in dieser Studie kein Anhalt. Es wurde jedoch nur die maximale Kontraktion gemessen. Dauer der Kontraktion und allenfalls bestehende Unterschiede in den vasodilatierenden Effekten wurden nicht betrachtet. Die Ergebnisse konnten in weiteren Untersuchungen mit Mäusen, die einen postnatalen gewebsspezifischen KO für VSMC hatten, bestätigt werden (Schreier et al. 2016).

### 5.2.2 Epidermal Growth Factor

EGF löste eine Vasokonstriktion in den WT-Aorten aus, jedoch nicht bei den KO. Bei der Auftrennung nach Geschlecht war diese Kontraktion jedoch nur für die Männchen signifikant, obwohl bei keinem der KO-Tiere eine Kontraktion auftrat. Als Grund dafür kann die geringere Zahl der Weibchen (n=7 statt n=10) diskutiert werden. Hier fallen einzelne Tiere, welche kaum reagierten, stärker ins Gewicht. Dies zeigte sich z.B. durch eine große Streuung der Messwerte. Außerdem betrug die maximale EGF-vermittelte Kontraktion weniger als ein Zehntel der KCl-vermittelten Vasokonstriktion. Die Reaktion auf EGF diente ebenfalls als Erfolgskontrolle des EGFR-KO. In bisherigen Studien zu der durch EGF ausgelösten Vasokonstriktion gab es widersprüchliche Ergebnisse. Für Kaninchen konnte eine EGF-induzierte Vasokonstriktion in Aortenringen ausgelöst werden, welche mittels des Tyrosinkinase-Inhibitors RG50864 konzentrationsabhängig reduziert wurde. Dieser Effekt konnte nicht für Noradrenalin und Endothelin gezeigt werden (Merkel et al. 1993). In Aortenringen von Ratten, bei welchen das Endothel entfernt worden war, konnte durch 100nM EGF keine Kontraktion ausgelöst werden. EGF bewirkt eine Calcium-Sensitivierung in glatten Gefäßmuskelzellen. Verantwortlich dafür ist eine Rho-kinase-abhängige Inaktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase via MEK/ERK1/2-Weg (Sasahara et al. 2015). In Versuchen mit Aortenringen von DOCA (Deoxycorticosteronacetat)-Salz-Ratten löste EGF hingegen eine ERK1/2-vermittelte Kontraktion aus, welche durch den PI<sub>3</sub>K-Signalweg vermittelt wird (Kim et al. 2006). Keine Reaktion auf EGF trat in Aortenringen normotensiver Ratten im Gegensatz zu hypertensiven Tieren auf. Aufgehoben werden konnte die Kontraktion durch EGFR-Tyrosinkinase-, Calciumkanal- und MAP-Kinase-Inhibitoren (Florian und Watts 1999). Auf molekularer Ebene könnte also der PI<sub>3</sub>K-Signalweg

und eine MAPK-Aktivierung für die Vasokonstriktion verantwortlich sein, wie bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte (Lee et al. 2015).

### 5.2.3 Kaliumchlorid (KCl)

Kalium-Ionen lösten in allen Gefäßringen eine starke Vasokonstriktion aus. Dieser Effekt wurde bereits vor über 100 Jahren beschrieben (Mathison 1911). Dabei handelt es sich um eine „mechanische Kontraktion“, welche durch die Erhöhung des extrazellulären Kalium-Spiegels ausgelöst wird. Da  $K^+$ -Kationen für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials entlang eines Gradienten von intrazellulär nach extrazellulär strömen müssen, führt die extrazelluläre Erhöhung des Kalium-Spiegels in glatten Muskelzellen zu einem verminderten Kaliumstrom und einer Depolarisation der Zelle mit Aktivierung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle, einer Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$  und schließlich einer Kontraktion (Karaki et al. 1984). Allerdings war die Kontraktion der KO deutlich geringer ausgeprägt. Da abgewartet wurde bis sich eine stabile Kontraktion eingestellt hatte, war es möglich, einen zeitlichen Verlauf zu erstellen und die Steigung zu berechnen. Dabei zeigte sich, dass die Kontraktion in den WT in sehr viel kürzerer Zeit erfolgte und schneller ihr Maximum erreichte. Bei Messungen an Carotiden von waved-2-Mäusen hatten EGFR- und  $PI_3K$ -Inhibitoren keinen Effekt auf eine KCl-induzierte Kontraktion, die bei HB-EGF KO-Mäusen normal war, allerdings wurde hier eine 125 mmol/l Lösung verwendet (Chansel et al. 2006). In anderen Studien mit Mäusen, die einen gewebsspezifischen EGFR-KO in VSMC hatten, konnte kein Unterschied in der durch 25 mM KCl ausgelösten Kontraktion zwischen WT- und KO-Tieren nachgewiesen werden. Die Kontraktion der Aortenringe in den hier gezeigten Versuchen ist in etwa gleich stark der Kontraktion der weiblichen KO-Tiere in der Versuchsreihe von Schreier und Kollegen (~6 mN) (Schreier et al. 2016). In dieser Studie wurde eine modifizierte Krebs–Ringer-Lösung mit einer niedrigeren  $K^+$ -Konzentration (4.7mmol/l) verwendet. Die Konzentration des  $Ca^{2+}$  war gleich. Möglicherweise können die Ergebnisse durch eine veränderte Zusammensetzung des extrazellulären Milieus erklärt werden. Oder es spielt eine veränderte Regulation von  $Ca^{2+}$ -Kationen-Kanälen als Adaptation auf die genetische Deletion des EGFR eine Rolle, da der EGFR via  $PLC\gamma$  mit der Bildung von sekundären Botenstoffen zu einer Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und zur Aktivierung von PKC führt, welche ebenfalls in die Kontraktion von SMC involviert ist (Wang 2017). Die durch  $ET_A$ -Rezeptoren ausgelöste Aktivierung und Stimulation des  $Ca^{2+}$ -Einstroms ist HB-EGF- und EGFR-vermittelt. Die Aktivierung von  $PI_3K$  in VSMC erfolgt durch GPCR via EGFR (Chansel et al. 2006). Möglicherweise liegt für GPCR ein redundantes System vor, welches sich bei Wegfall der direkten Aktivierung durch den Botenstoff am Rezeptor bei der „mechanischen Kontraktion“ durch KCl bemerkbar macht. Durch EGFR erfolgt eine Aktivierung

von Phospholipase C $\gamma$  mit nachfolgender Hydrolyse von PIP $_2$ , wobei IP $_3$  entsteht, welches Ca $^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum freisetzt. Zudem wird Phospholipase A $_2$  aktiviert, wodurch Leukotrien C $_4$  gebildet wird, welches nicht spannungsabhängige Ca $^{2+}$ -Kanäle in der Zellmembran öffnet. Der Ca $^{2+}$ -Einstrom öffnet Kalium-Kanäle, welche zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führen und dafür sensitive Ca $^{2+}$ -Kanäle öffnen, die den Influx erhöhen (Sánchez-González et al. 2010). Auch wenn in den verwendeten Tieren die Gene des Calcium-Stoffwechsels nicht verändert waren (Schreier et al. 2013), so ist vielleicht doch eine gestörte Antwort im Rahmen der Calcium-Freisetzung möglich. Die Ergebnisse der Experimente könnten zudem bei höheren K $^+$ -Konzentrationen anders ausfallen, da in einer Arbeit für Lösungen mit einer Konzentrationen von 40-50 mM KCl ein maximaler vasokonstriktiver Effekt beschrieben wurde (Karaki et al. 1984).

#### 5.2.4 Endothelin-1

Endothelin-1 (ET-1) ist ein Peptid und potenter Vasokonstriktor, für das bereits früh ein starker vaso-konstriktiver Effekt auf Aortenringe von Ratten nachgewiesen werden konnte (Yanagisawa et al. 1988a; Yanagisawa et al. 1988b). Mittlerweile ist Endothelin Gegenstand der Forschung in der pulmonal-arteriellen Hypertonie (Nadeau et al. 2018), in der arteriellen Hypertonie, v.a. in Salz-sensitiven Tiermodellen, bei denen ET-1-Spiegel erhöht sind (Davenport et al. 2016) sowie in der Pathogenese des ischämischen zerebrovaskulären Insults und den nach subarachnoidalen Blutungen ausgelösten Vasospasmen (Yu et al. 2015). In der Forschung der arteriellen Hypertonie ist allerdings strittig, ob die erhöhten ET-1-Spiegel an der Pathogenese beteiligt sind oder ob es sich um ein sekundäres Phänomen als Folge eines Endothelschadens handelt (Xu et al. 2017). Zwei Arten von Rezeptoren spielen in der Blutdruckregulation eine Rolle. ET-1 $_A$ -Rezeptoren finden sich auf VSMC und vermitteln eine Vasokonstriktion. ET-1 $_B$ -Rezeptoren sind in Endothelzellen nachzuweisen, wo sie die Vasokonstriktion durch die Produktion vasodilatierender Substanzen wie Prostacyclin und NO vermindern (Titus und Marappa-Ganeshan 2020). Endothelin-Effekte sind EGFR-vermittelt. In VSMC löste ET-1 via ET $_A$ -Rezeptoren ein Zellwachstum aus, welches durch eine Inhibition der EGFR-Kinase verhindert werden konnte (Forrester et al. 2016). ET-1 führte durch erhöhten oxidativen Stress via Aktivierung von c-Src zu einer Transaktivierung des EGFR und einer Hyperproliferation von VSMC bei spontan hypertensiven Ratten (Li et al. 2010). In Mausearten erzeugte Endothelin eine Phosphorylierung der MAPK/ERK via EGFR, welche die Genexpression für Kollagen I induzierte (Flamant et al. 2003). Zudem führte die Inhibition der EGFR-Phosphorylierung in Aortenringen von Mäusen zu einem reduzierten vasopressorischen Effekt, welcher auch in Mäusen vorhanden war, die einen beeinträchtigten EGFR exprimierten (waved-2) (Flamant et al. 2003). In Basilarisarterien von

Kaninchen konnte durch MAPK-Inhibitoren die ET-1 induzierte Kontraktion sowie in VSMC die ERK1/2 Stimulation via EGFR unterdrückt werden. Dieser Effekt ließ sich auch für den selektiven EGFR-Antagonisten AG1478 nachweisen, welcher zudem ET-1 induzierte Vasospasmen in vivo hemmte (Kawanabe et al. 2004). Bei Mesenterialgefäßen von diabetischen Ratten war die Reaktion auf ET-1 erhöht. Durch eine Behandlung mit AG1478 normalisierten sich die Spiegel an phosphoryliertem EGFR und die Gefäßreaktionen (Benter et al. 2005). Dies spricht für eine Beteiligung des EGFR an der Entwicklung der diabetischen vaskulären Dysfunktion (Akhtar und Benter 2013). In Karotiden HB-EGF-defizienter Mäuse war die durch ET-1 ausgelöste Vasokonstriktion vermindert und der ET-1-induzierte Calcium Peak reduziert. Dieser Effekt konnte auch in WT durch AG1478, MMP-Inhibition sowie PI<sub>3</sub>K-Inhibitoren reproduziert werden (Chansel et al. 2006).

In der hier vorliegenden Arbeit löste Endothelin-1 eine stärkere Kontraktion bei den KO im Vergleich zu den WT aus. Bei der Auftrennung nach Geschlecht sind die Ergebnisse für beide Geschlechter nicht mehr signifikant, was an der geringeren Zahl und damit höheren Streuung in den Subgruppen liegen kann. In Versuchen mit Mäusen, welche einen gewebsspezifischen KO nur für glatte Gefäßmuskelzellen hatten, zeigte sich ein vergleichbarer vasokonstriktiver Effekt für Endothelin-1 (Schreier et al. 2016). Wie bereits erläutert, ist ET-1 ein potenter Vasokonstriktor wie auch Vasodilatator. Die vasodilatierenden Effekte können während der Präparation von Blutgefäßen für ex vivo-Versuche durch Schädigung des Endothels verloren gehen. ET-1 wird aus endothelialen Zellen freigesetzt und funktioniert im Sinne einer autokrinen Rückkopplung auf endotheliale ET-1<sub>B</sub>-Rezeptoren, die zur Freisetzung von Vasodilatoren führen (Davenport et al. 2016). Dieser Feedback-Mechanismus limitiert die vasokonstriktiven Effekte durch ET-1 via ET<sub>A</sub>-Rezeptoren auf glatte Muskelzellen und spielt eine essenzielle Rolle in der kardiovaskulären Homöostase (Davenport et al. 2016). Niedrige Level vermitteln eine Vasodilatation, höhere und pathophysiologische Konzentrationen erhöhen den Blutdruck und totalen peripheren Widerstand (Davenport et al. 2016). Möglicherweise sind die Ergebnisse präparationsbedingt zu erklären, was die hohe Streuung erklären würde. Zum anderen kann diskutiert werden, ob die Kontraktion vor allem in der arteriellen Hypertonie oder anderen Gefäßpathologien eine Rolle spielt, wo der EGFR hochreguliert ist.

### 5.2.5 Noradrenalin

Noradrenalin (NA) wurde als KWK appliziert und löste eine Kontraktion in den Aortenringen aus, welche in dem Bereich der in der Literatur angegebenen Werte für  $\alpha$ -Adrenozeptor-vermittelte Wirkungen in großen Arterien lag (~1 - 10 nM NA) (Guimarães und Moura 2001). Dabei war die Kontraktion bei den KO-Tieren mit steigender Dosis stärker ausgeprägt. Zudem

kam es bei den WT in hohen Konzentrationen zu einem Abfall des Gefäßtonus, was bei den KO nicht auftrat. NA vermittelt in hohen Konzentrationen auch eine  $\beta$ -adrenerge Wirkung, welcher diese Vasodilatation zugeschrieben wurde (Sheng und Zhu 2018). Zudem war die Kontraktion bei den männlichen KO in höheren Konzentrationen stärker als bei den weiblichen.

Die Aktivierung von  $\beta$ -Adrenozeptoren und EGFR-Transaktivierung führen zu einer Veränderung des ERK1/2- und Akt-Signalwegs, der über verschiedene Wege das Zellüberleben durch eine Veränderung von apoptotischen Genen verbessert (Grisanti et al. 2014).  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR transaktivieren den EGFR unabhängig von G-Proteinen, aber abhängig von GPCR-Kinase/ $\beta$ -Arrestin-vermittelten Signalwegen. Dabei spielt eine Src- und MMP-vermittelte HB-EGF-Abspaltung eine Rolle. Für die  $\beta_2$ -AR-vermittelte EGFR-Transaktivierung ist dabei eine  $PI_3K$ -abhängige Src-Aktivierung nötig, welche die Einbindung der Rezeptoren in einem Multirezeptor-Komplex verstärkt. Während der  $\beta_1$ -EGFR-Komplex durch eine  $\beta_1$ -AR-Stimulation scheinbar nicht vermehrt ist, wird der GPCR Kinase/ $\beta$ -Arrestin-Weg benötigt, um die Verbindung aufrechtzuerhalten (Grisanti et al. 2017). Der  $\beta$ -adrenerge Effekt in VSMC hängt also stärker von einer EGFR-vermittelten Wirkung ab als der  $\alpha$ -adrenerge Effekt. Die Regulation des Blutdrucks wird u.a. durch den peripheren Widerstand bestimmt, der durch das vegetative Nervensystem mit Freisetzung von Katecholaminen gesteuert wird. Die wichtigsten sind Adrenalin und Noradrenalin, welche an den  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - und  $\alpha_{1D}$ -, den  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{1C}$ - sowie  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Adrenozeptoren angreifen.  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren vermitteln ihre Wirkung über Gq/11-Proteine, welche PLC aktivieren, die über weitere Wege intrazelluläres  $Ca^{2+}$  freisetzt und PKC aktiviert. In VSMC führt dies zu einer Kontraktion.  $\beta$ -Adrenozeptoren vermitteln ihre Hauptwirkung in Gefäßen durch aktivierende  $G_{as}$ -Proteine, aber auch inhibitorische  $G_i$ -Proteine, welche Adenylylcyclase aktivieren und cAMP erhöhen. Dadurch kommt es unter anderem zu einer Aktivierung von Proteinkinase A und der Senkung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels in Gefäßen und somit einem vom vaskulären Tonus abhängigen vasodilatierenden Effekt. In VSMC kommen beide Arten von Rezeptoren vor, meist überwiegt jedoch der  $\alpha$ -Adrenozeptor-vermittelte Effekt. In Endothelzellen kommen zudem  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vor, deren Aktivierung zu einer NO-Freisetzung führt, wodurch vasokonstriktive Effekte abgeschwächt werden. Zudem gibt es auch  $\beta$ -Adrenozeptoren auf Endothelzellen, welche ebenfalls den Vasotonus beeinflussen (Wehrwein et al. 2016; Conceição-Vertamatti et al. 2017). Es wäre also auch eine  $\alpha$ -Adrenozeptor-vermittelte Wirkung durch Endothelzellen denkbar, welche EGFR-abhängig erfolgt. Durch Stimulation von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren werden allerdings auch pathologische Prozesse im Rahmen der arteriellen Hypertonie wie Hypertrophie und Migration von VSMC vermittelt (Zhang und Faber 2001; Roberts 2012). Diese Effekte erfolgen durch die ROS-abhängige Abspaltung von HB-EGF, Transaktivierung des EGFR und Aktivierung des MEK1/2- und MAPK-Signalwegs (Zhang et al. 2004). Doch nicht nur für Langzeiteffekte gibt es Hinweise, sondern auch für eine EGFR-vermittelte Vasokonstriktion. Durch Adrenozeptoren kommt es zu einer Aktivierung von MMP

zum Teil durch mitochondriale ROS, die dann Liganden abspalten, die den EGFR aktivieren (Hao et al. 2004; Hao et al. 2006). In diesen Gefäßen wird für die Aufrechterhaltung des adrenergen Vasotonus die Aktivierung von PI<sub>3</sub>K und eine ATP-Synthese benötigt und durch erhöhte Level von GPCR-Agonisten die Transaktivierung des EGFR verstärkt (Nagareddy et al. 2009). An der  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-induzierten Kontraktion von thorakaler Rattenaorta ist ebenfalls die PI<sub>3</sub>K- und ERK1/2-abhängige Transaktivierung des EGFR beteiligt (Ulu et al. 2010). Die Ergebnisse der hier dargestellten Versuche stützen diese These nicht. Die Aortenringe der WT-Tiere zeigten im Vergleich zu den KO eine geringere Vasokonstriktion in Gegenwart von NA. Möglicherweise kommt es durch den frühzeitigen Wegfall des EGFR in der Entwicklung zu einer Hochregulation von adrenergen Signalwegen, welche eine größere Rolle in der Aufrechterhaltung des Vasotonus spielen. In diabetischen Ratten sind die Antworten in Mesenterialgefäßen auf Vasokonstriktoren (NA, ET-1, Angiotensin) erhöht und vasodilatierende Effekte von Carbachol und Histamin vermindert (Benter et al. 2005). Eine Normalisierung konnte durch Behandlung mit dem EGFR-Antagonisten AG1478 erreicht werden. Die Spiegel an phosphoryliertem EGFR waren im Mesenterialbett der diabetischen Tiere erhöht und normalisierten sich mit der Behandlung (Benter et al. 2005). Also könnten die EGFR-vermittelten Effekte bei der Hypertonie vor allem in pathologisch veränderten Systemen eine Rolle spielen und bei normotensiven Tieren nicht zum Tragen kommen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Hochregulation von  $\alpha$ -Adrenozeptoren in EGFR-KO-Tieren dar, um eine allenfalls EGFR-vermittelte Teilreaktion zu kompensieren. Es könnte auch zu einer Down-Regulation von  $\beta$ -Adrenozeptoren als Folge des EGFR-KO kommen. In einem Mausmodell mit einem gefäßspezifischen KO des EGFR waren die Katecholaminlevel in WT und KO nicht verändert (Schreier et al. 2016), was gegen eine Downregulation von  $\beta$ -Adrenozeptoren über eine Desensitivierung aufgrund erhöhter Katecholamindosen spricht. Bei den KO war zudem ein Unterschied in der Reaktion auf hohe Konzentrationen NA zwischen den männlichen und weiblichen Tieren nachweisbar, wobei die Kontraktion bei den männlichen Tieren deutlich ausgeprägter war. Dieser Unterschied war bei den WT-Tieren nicht vorhanden. Östrogenrezeptoren werden in Herz- und Gefäßmuskeln exprimiert, vermitteln genomische und nicht-genomische Aktionen und regulieren unter anderem die Durchblutung des Herzens (Machuki et al. 2018). Zudem beeinflusst Östrogen die Genexpression von  $\beta$ -AR und Calcium-regulierenden Proteinen, welche Einfluss auf die Kontraktilität von Muskelzellen haben. Membran-gebundene Rezeptoren vermitteln dabei schnelle Effekte (Machuki et al. 2018).  $\beta_2$ -Adrenozeptoren vermitteln ihre Wirkung im physiologischen Bereich über  $G\alpha_s$ -Proteine, welche über eine cAMP-Erhöhung zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und erhöhter Kontraktilität führen. Bei hohen Katecholaminkonzentrationen koppeln sie aber an  $G\alpha_i$ -Proteine, was zu einer Unterdrückung der cAMP-Produktion und damit gegenteiligem Effekt zur physiologischen Wirkung führt. Dieses Phänomen wird „stimulus-mediated trafficking“ genannt (Machuki et al. 2018). Für eine Untergruppe von Östrogenrezeptoren (ER <sub>$\alpha$</sub> ) wurde eine Vasodilatation von glatten

Gefäßmuskelzellen in Aorten nachgewiesen. Durch  $ER_{\alpha}$  wird das Enzym PKA in glatten Gefäßmuskelzellen von Aorten erhöht, was für eine Beteiligung an der GPCR/ $G\alpha_s$ /cAMP-Signalkaskade spricht. Zudem wird maßgeblich die Expression von  $\beta$ -AR beeinflusst. In kardiovaskulären Geweben koppelt ein weiterer Östrogenrezeptor (GPR30) an klassische GPCR wie  $G\alpha_s$  und  $G\alpha_i$  (Machuki et al. 2018). GPR30 greift wie  $\beta_2$ -Rezeptoren an die  $G\alpha_i$ -Untereinheiten an und aktiviert zudem den PI<sub>3</sub>K/Akt-Signalweg, welche die Apoptose durch Bcl-2 Proteine hemmt. In weiblichen Rattenmodellen wurde durch Östrogen via GPR30 und  $ER_{\alpha}$  die Expression von  $\beta_2$ -AR erhöht. GPR30 imitiert das duale Koppeln von  $\beta_2$ -AR an die  $G\alpha_s$ - und  $G\alpha_i$ -Proteine (Machuki et al. 2018). Es wäre also möglich, dass die Effekte des EGFR-KO bei männlichen Tieren stärker zum Tragen kommen. In Mausarten wurde zudem eine Vasodilatation durch Aktivierung G-Protein-gekoppelter Östrogenrezeptoren beschrieben, die über eine NO-Freisetzung aus Endothelzellen wirkt (Fredette et al. 2018). Auch dieser Effekt könnte mitverantwortlich für die schwächere Kontraktion der Aortenringe von weiblichen Tieren sein.

### 5.2.6 Carbachol

Carbachol ist ein synthetisch hergestelltes direktes Parasympathomimetikum, welches strukturverwandt zu Acetylcholin ist und auf nikotinerge und muskarinische Rezeptoren die gleiche Wirkung hat (Vardanyan und Hruby 2006). Unter physiologischen Bedingungen greift Acetylcholin an muskarinische Rezeptoren in Gefäßen an, von denen im kardiovaskulären System fünf verschiedene ( $M_1$ - $M_5$ ) bekannt sind. Durch  $M_2$ / $M_4$ -Rezeptoren werden Signalwege aktiviert, bei denen  $G_i$ -vermittelt eine Hemmung der Adenylylcyclase oder die Regulation von G-Protein-abhängigen  $K^+$ -Kanälen erfolgt.  $M_1$ / $M_3$ / $M_5$ -Rezeptoren vermitteln über  $G_q$ -Proteine eine Aktivierung von Phospholipase C mit Produktion von IP<sub>3</sub> und DAG (Eglen 2012). Für die Wirkung von muskarinischen Substanzen spielt die Intaktheit des Blutgefäßes eine wichtige Rolle. Die meisten Gefäße reagieren auf Acetylcholin bei intaktem Endothel mit einer Relaxation (Furchgott und Zawadzki 1980). Dabei wird durch die Aktivierung von  $M_3$ / $M_5$ -Rezeptoren in Endothelzellen eine Reihe von Substanzen freigesetzt, welche parakrin auf VSMC wirken. Dazu gehören Prostacyclin, EDHF (endothelium-dependent hyperpolarization factor) und NO. Letzteres vermittelt die stärkste relaxierende Wirkung und wird durch eNOS gebildet, welche abhängig von  $Ca^{2+}$  und Calmodulin aktiviert wird (Harvey 2012). Ein weiterer indirekter Mechanismus durch muskarinische Rezeptoren, welcher zu einer Senkung des peripheren Widerstandes führt, ist die Hemmung der sympathischen Neurotransmitter-Freisetzung durch präsynaptische  $M_2$ -Rezeptoren (Harvey 2012). VSMC selbst besitzen  $M_1$ / $M_3$ -Rezeptoren, die über  $G_q$ -Proteine bei einem Endothelschaden eine Vasokonstriktion vermitteln. Der Mechanismus ist ebenfalls PLC- und IP<sub>3</sub>-abhängig. Die damit verbundene Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$  führt zu einer

Kontraktion durch Calmodulin-abhängige Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (Harvey 2012). In Mesenterialgefäßen diabetischer Ratten war die Reaktion auf Vasokonstriktoren wie Noradrenalin, Endothelin-1 und Angiotensin II erhöht, wohingegen die vasodilatierenden Effekte von Carbachol und Histamin vermindert waren (Benter et al. 2005). Eine Behandlung mit dem EGFR-Antagonisten AG1478 oder Genistein normalisierte die Änderungen des Vasotonus. Bei gesunden Tieren trat keine Änderung nach Zugabe der Inhibitoren auf. Zudem waren die Spiegel an phosphoryliertem EGFR im Mesenterialbett der diabetischen Tiere deutlich erhöht und normalisierten sich nach Zugabe des Antagonisten (Benter et al. 2005).

Die Endothel-vermittelte Dilatation der Aortenringe durch Carbachol war ab einer Konzentration von 100 nM gegenüber der Ausgangsspannung messbar. Die Dilatation fiel bei den KO und bei den WT gleich aus, für die Gesamtpopulation sowie Weibchen war die Dilatation in der höchsten Konzentration in einer Varianzanalyse mittels ANOVA signifikant. Der Grund dafür könnte sein, dass die vasodilatierenden Effekte auch abhängig von der jeweiligen Vorkontraktion der Gefäße waren, welche bei den KO aufgrund der stärkeren Wirkung von NA höher war. Allerdings konnte kein Hinweis auf eine Beteiligung des EGFR an der Endothel-vermittelten Dilatation im physiologischen Zustand gefunden werden. Versuche mit Carbachol nach Vorkontraktion mit Serotonin an Aortenringen von Mäusen, welche einen VSMC-spezifischen KO für den EGFR hatten, stützen das Ergebnis dieser Untersuchung (Schreier et al. 2016).

### 5.2.7 Natrium-Nitrit

Stickstoffmonoxid (NO) wurde schon vor vielen Jahren als ein wichtiger gefäßdilatierender Faktor entdeckt, welcher aus Endothelzellen freigesetzt wird (Robert Furchgott, Louis Ignarro, Ferid Murad Nobelpreis 1998). Anfang der 1990er Jahre gelang schließlich der Nachweis der biochemischen Synthese (Knowles und Moncada 1992). Es handelt sich bei NO um einen sehr wichtigen Faktor für die Homöostase des Gefäßtonus. Die Synthese erfolgt durch eine Hydroxylierung von L-Arginin mit Hilfe von NADPH und Sauerstoff durch das endotheliale  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Enzym NO-Synthase (eNOS). Im Anschluss erfolgt durch FAD und FMN sowie  $\text{BH}_4$  die Spaltung in NO und Citrullin (Conceição-Vertamatti et al. 2017). Da NO sehr klein und lipophil ist, diffundiert es gut in Muskelzellen. Hier aktiviert es die Guanylylcyclase, welche aus GTP cGMP bildet. Dadurch wird die Proteinkinase G und nachfolgend eine Phosphatase aktiviert, welche die leichte Kette des Myosins der SMC dephosphoryliert und so den Muskeltonus erniedrigt. NO hemmt auch den nach intrazellulär gerichteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport und vermindert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit der kontraktile Elemente (Conceição-Vertamatti et al. 2017). Stimuli wie Bradykinin, Histamin, Substanz P, Adenosin und

Scherkräfte führen zu einer NO-Freisetzung und damit verbundenen Vasodilatation. Dieser Mechanismus spielt vor allem in arteriellen Gefäßen eine Rolle (Yu et al. 2015). Für ein Zusammenspiel zwischen EGFR und NO sind zahlreiche Beispiele vorhanden. In Nervenzellen löst eine Hypoxie die Aktivierung der EGFR-Kinase via NO aus nNOS aus (Mishra et al. 2010), für Zellen aus Bronchialkarzinomen konnte eine NO-vermittelte schnelle Aktivierung des EGFR durch ionisierende Strahlung gezeigt werden (Lee et al. 2017b). Auch bei triple-negativen (Fehlen von Östrogen-, Progesteron-, HER2/NEU-Rezeptoren) Mammakarzinomen führt eine NO-Freisetzung durch iNOS zu einer Aktivierung des EGFR via S-Nitrosylation (Switzer et al. 2012). Nachfolgend kommt es u.a. zu einer Src-Aktivierung und ERK-Phosphorylierung und mit Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, Chemoresistenz und reduzierter Prognose (Garrido et al. 2017). Via HB-EGF und EGFR erfolgt über den PI<sub>3</sub>K- und MAPK-Signalweg eine Aktivierung von eNOS, NO-Produktion und Anregung von Migration und Angiogenese (Demidova-Rice et al. 2012; Camaré et al. 2017).

NO kann über zwei verschiedene Mechanismen VSMC aus Aorten relaxieren. Zum einen über eine Stimulation der SERCA mit nachfolgender Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme ins sarkoplasmatische Reticulum, zum anderen über eine lösliche Guanylylcyclase-vermittelte cGMP-Bildung, welche den kontraktilem Apparat desensitiviert (Lima et al. 2014; van de Pol et al. 2017). Die Frage, ob eine NO-vermittelte Dilatation EGFR benötigt, ist bisher nicht untersucht worden.

Bei Natrium-Nitrit handelt es sich um einen NO-Donor, der zur Freisetzung von NO metabolisiert werden muss (Ignarro et al. 2002) und auch via NO-Metabolismus die Durchblutung bei chronischen Ischämien verbessert (Bir et al. 2012). In dieser Arbeit wirkte die Applikation von Natrium-Nitrit sowohl bei WT als auch bei KO vasodilatierend. Ab einer Konzentration von 10 µM war der Effekt statistisch signifikant gegenüber der Ausgangsspannung. Es bestand allerdings kein Unterschied zwischen den WT- und KO-Tieren, was gegen eine Beteiligung des EGFR an der über exogenes NO-vermittelten Vasodilatation spricht. Auch die Endothel-vermittelte Vasodilatation ist dementsprechend wohl nicht EGFR-abhängig. In Mäusen, welche einen gewebsspezifischen EGFR-KO in VSMC hatten, konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen EGFR und NO-vermittelter Gefäßdilataion mittels SNAP, einem NO-Donor, nach Vorkontraktion mit Serotonin nachgewiesen werden (Schreier et al. 2016).

### 5.3 Fazit

Mäuse mit einer herz- und gefäßspezifischen genetischen Deletion des EGFR zeigten phänotypisch keine Unterschiede. Bei der Präparation der Herzen fand sich eine ausgeprägte Hypertrophie bei den KO. In Kardiomyozyten von Ratten tritt durch Noradrenalin-Stimulation eine Hypertrophie auf, welche zu einer Hochregulation von GDF-15 führt. Letzteres führt über

eine Hemmung des EGFR zu einem negativen Feedback der Hypertrophie, was auch hier eine Rolle spielen könnte (Xu et al. 2014). Die Elastizität der Aorten war erhöht. Dies ist möglicherweise auf die histologisch nachweisbare leicht verminderte Media-Dicke mit reduziertem Verhältnis von Wand zu Lumen zurückzuführen (Schreier et al. 2013). Zudem kann die genetische Deletion des EGFR in VSMC eine Wandversteifung und Mediaverdickung durch chronische Angiotensin II-Infusion verhindern (Schreier et al. 2017). Auf die Applikation von EGF erfolgte bei WT eine gering ausgeprägte Kontraktion, die bei den KO nicht nachweisbar war. Auf die Applikation von Serotonin reagierten beide genetischen Varianten gleichermaßen mit einer transienten starken Kontraktion. Auf die Applikation von  $K^+$  reagierten die Gefäße mit einer Kontraktion, welche bei den WT deutlich ausgeprägter war. Es kam vor allem zu einer schnelleren Kontraktion bis zum Erreichen des Maximums. Der genaue Grund hierfür ist unklar, möglicherweise liegt die Ursache im  $Ca^{2+}$ -Haushalt begründet, da via EGFR interne  $Ca^{2+}$ -Speicher angesprochen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine veränderte Expression von Kalium-Kanälen durch den EGFR-KO. Die Versuche mit Endothelin ergaben keinen eindeutigen Beleg für eine Beteiligung des EGFR an der Endothelin-vermittelten Kontraktion der Gefäßringe. Bei der Reaktion auf Noradrenalin zeigte sich in hohen Konzentrationen ein Abfall des Vasotonus bei den WT-Tieren. Verantwortlich dafür könnte ein  $\beta$ -Adrenozeptor-vermittelter Effekt sein, welcher zu einer Vasodilatation führt und nach EGFR-KO nicht mehr vorhanden ist, da auch  $\beta$ -Adrenozeptoren via Transaktivierung des EGFR eine Wirkung vermitteln. Verantwortlich könnte auch eine veränderte  $\beta$ -Adrenozeptor-Dichte sein. Die Ergebnisse der Kontraktionsexperimente entsprechen in Bezug auf die verwendeten Substanzen weitgehend den Effekten, welche in der Literatur für C57BL/6-Mäuse beschrieben sind (Russell und Watts 2000). Zur Untersuchung der Endothel-vermittelten Vasodilatation erfolgte eine Applikation von Carbachol, zur Untersuchung der nicht-Endothel-vermittelten Vasodilatation eine Applikation des NO-Donors Natrium-Nitrit. Bei beiden gab es keine Unterschiede in der Vasodilatation zwischen WT und KO und somit keinen Hinweis für eine Beteiligung des EGFR. Entgegen zuvor durchgeführten Studien, in denen die Beteiligung des EGFR an der Aufrechterhaltung der Vasokonstriktion beschrieben wurde, fanden sich hier keine Hinweise für eine Beteiligung des EGFR an der vasokonstriktiven oder vasodilatierenden Wirkung der untersuchten Substanzen. Dieses war die erste Untersuchung, welche mit einer herz- und gefäßspezifischen genetischen Deletion des EGFR anstatt mit Antagonisten, funktionsunfähigen Rezeptoren oder zwischengeschalteten Signalmolekülen arbeitete.

GPCR gehören auch in der Herzinsuffizienz-Forschung zu den primären Angriffspunkten. Die Transaktivierung des EGFR wirkt sich positiv auf das Überleben von Kardiomyozyten aus. Allerdings vermittelt er auch pathologische Prozesse wie Fibrose und Hypertrophie und steht deshalb weiterhin im Fokus der Forschung.

Zudem ist unklar, ob sich die Ergebnisse dieser Arbeit auch auf andere Blutgefäße wie Koronarien, Pulmonalarterien oder zerebrale Gefäße übertragen lassen. Gerade im Hinblick auf eine möglicherweise veränderte  $\beta$ -Adrenozeptor-Antwort könnte dies eine Rolle spielen. In Koronarien von C57BL/6-Mäusen ist die EGFR-Tyrosinkinase sowie nachgeschaltete Signalkaskaden am myogenen Tonus beteiligt, welcher auf intraluminale Druckwechsel erfolgen (Amin et al. 2011). Möglicherweise kommen die Effekte eines EGFR-KO in kleinen Gefäßen anders zum Tragen.

Bisher liefern Modelle mit Inhibitoren sehr kontroverse Daten bzgl. der Wirkung des EGFR im Gefäßsystem (Grisanti et al. 2017). Aus diesem Grund braucht es genetische Modelle wie das in dieser Arbeit verwendete, um gezieltere Aussagen zu physiologischen und pathologischen Abläufen machen zu können.

#### **5.4 Klinische Bedeutung der Ergebnisse**

Der EGFR ist in der Mehrzahl der Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome überexprimiert und deshalb ein wichtiger Teil in der Forschung und Therapie von Krebserkrankungen, wo EGFR-Antagonisten eine wichtige Rolle in der onkologischen Behandlung spielen. Es werden EGFR-TKI-Antagonisten verwendet (Tan et al. 2018) sowie monoklonale Antikörper, welche innerhalb des therapeutischen Spektrums der Behandlung diverser Tumorentitäten einen wichtigen Stellenwert haben (Moradi-Kalbolandi et al. 2018). Vielbeschriebene Nebenwirkungen einer Anti-EGFR-Therapie sind Hypomagnesiämien, Infusionsreaktionen, Diarrhoe und alle Arten von Haut- und Schleimhautproblemen (Arora et al. 2017), seltener schwerwiegende Lungenfibrosen (Sakao und Tatsumi 2012). Ansonsten scheinen EGFR/ErbB1-Inhibitoren verglichen mit anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren nur eine minimale kardiovaskuläre Toxizität zu haben. Für Erlotinib wurde eine renale Toxizität und Hypertonie lediglich in Kombination mit dem VEGF-A-Inhibitor Bevacizumab beschrieben (Forrester et al. 2016). Die Transaktivierung des EGFR via GPCR scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Resistenzen von Tumorzellen gegen EGFR-Tyrosinkinase-Antagonisten zu spielen (Kuzumaki et al. 2012) sowie in der Entwicklung der chronischen Niereninsuffizienz aufgrund fibrotischer Umbauprozesse (Tang et al. 2013). Dabei ist auch im Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen die Erforschung des EGFR an Herz- und Gefäßmuskelzellen wichtig, da der EGFR auch wichtige physiologische Funktionen erfüllt wie die Erholung im Rahmen akuter Nierenschäden (Tang et al. 2013) sowie an der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase beteiligt ist. Unbestritten sind auch die Langzeiteffekte durch GPCR, welche via Transaktivierung des EGFR erfolgen. In der Entwicklung der Arteriosklerose spielt der EGFR eine zentrale Rolle. Bei Mäusen, die eine fettreiche Nahrung erhielten und bei denen das Apolipoprotein E genetisch deletiert war, erfolgte

durch den EGFR in arteriosklerotischen Läsionen oxidativer Stress, eine Makrophagen-Infiltration, Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und eine SMC-Proliferation, was den EGFR zu einem möglichen therapeutischen Angriffspunkt macht (Wang et al. 2017).

Da der EGFR nicht nur eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen während der Entwicklung der Gefäßarchitektur spielt, sondern auch eine Schnittstelle für die Aktivierung von verschiedenen pathologischen Prozessen innerhalb der Gefäße durch Aktivierung von GPCR ist, wäre es von Bedeutung, einen gemeinsamen Angriffspunkt zu haben.

In der vorliegenden Arbeit besteht kein Hinweis auf eine Beteiligung des EGFR an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks durch Kontraktion auf Serotonin, Endothelin-1 und Katecholaminen. Sie kann also dazu beitragen, die komplexen Vorgänge, welche bei der Transaktivierung des EGFR bestehen, weiter aufzuschlüsseln und die Forschung in der arteriellen Hypertonie und ihren Folgen weiter voranzutreiben. Wahrscheinlich müssen weitere Studien unter pathologischen Versuchsbedingungen erfolgen, bei denen eine chronische Überstimulation des EGFR durch GPCR vorliegt. Eine EGFR-Aktivierung geht mit einem erhöhten Vasotonus bei arterieller Hypertonie einher. Gezeigt werden konnte eine EGFR-vermittelte Vasokonstriktion in Aortenringen von Ratten sowie eine verstärkte Vasokonstriktion durch ET-1 mit konsekutiv erhöhten systolischen Blutdruck (Chao und Davis 2011). In Arterien eines hypertensiven Rattenmodells sowie humanen Präparaten von Patienten mit arterieller Hypertonie war die Endothel-vermittelte maximale Relaxation vermindert sowie die konstriktiven Effekte auf Endothelin, Serotonin und Noradrenalin erhöht (Li et al. 2007). Zudem schwächte eine EGFR-Inhibition durch PKI-166 (EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor) das Fortschreiten der arteriellen Hypertonie in 5/6-nephrektomierten Ratten ab und erhielt die kardiale und vaskuläre Funktion (Ulu et al. 2013). Noradrenalin/ Adrenalin vermittelt vor allem via  $\beta_2$ -Adrenozeptoren eine Resistenz gegen Anoikis bei hepatozellulären Karzinomen (HCC), was z.T. über die Aktivierung der EGFR-Signalkaskade erfolgt. EGFR-Antagonisten, Adrenozeptor-Blocker und MAO-A konnten Anoikis einleiten und ein HCC-Fortschreiten verhindern. Zudem wurden  $\beta$ -Blocker als Krebs-Medikamente getestet und konnten in einigen Studien das Fortschreiten von Brustkrebs und malignen Melanomen verhindern (Li et al. 2014). Das Ergebnis dieser Arbeit spricht für einen möglichen Effekt auf das Gefäßsystem nach Ausschalten des EGFR durch eine Abschwächung des  $\beta$ -Adrenozeptor-Effektes. G-Protein-gekoppelte Östrogen-rezeptoren (GPER) konnten via Aktivierung von c-Src, EGFR, PI<sub>3</sub>K und ERK zu einer NO-Bildung führen, welche in Mausearten zu einer Vasodilatation führte (Fredette et al. 2018). Östrogene spielen möglicherweise auch eine Rolle in der Verhinderung einer Hypertrophie von VSMC durch die Downregulation von SIRT1 sowie den AKT- und ERK-Signalweg (Lee et al. 2017a). Auch hier könnte der EGFR eine Rolle spielen, so dass im Hinblick auf die Behandlung mit EGFR-Antagonisten in der Tumorbehandlung von Frauen weitere Untersuchungen sinnvoll wären, da via EGFR auch protektive Effekte vermittelt werden.

## 5.5 Ausblick

Die Transaktivierung des EGFR ist aktuell Gegenstand der Forschung in unterschiedlichen medizinischen Bereichen wie Krebserkrankungen, arterieller Hypertonie, Arteriosklerose, Herzinsuffizienz und Wundheilung. Als Wachstumsfaktorrezeptor, welcher physiologische sowie pathologische Prozesse vermittelt, steht der EGFR auch in der klinischen Forschung zunehmend im Fokus, da Medikamente, die den EGFR als Ziel haben, bereits eingesetzt werden. Durch ein besseres Verständnis der Abläufe, Signalkaskaden und genauen Wirkmechanismen des EGFR nach Transaktivierung durch GPCR hofft man, akute Effekte von Signalmolekülen beeinflussen zu können und langfristige Folgen einer Stimulation des EGFR mit den daraus resultierenden Folgen verhindern zu können.

Das Mausmodell dieser Arbeit bietet die Möglichkeit, die Rolle des Rezeptors in der physiologischen Entwicklung sowie im Rahmen verschiedener Reaktionen gezielt zu betrachten, ohne teilweise unspezifische Antagonisten zu verwenden. Die Experimente lassen einige Fragen offen, welche für zukünftige Arbeiten interessant sein könnten.

- Wie erklärt sich der veränderte Effekt auf die Applikation von Kaliumchlorid. Weitere Versuche mittels verschiedener  $K^+$ -Konzentrationen und Patch-Clamp-Versuche zur Klärung einer eventuell veränderten Ligandenbindung sowie PCR zur Messung der Rezeptordichte sowie Ionen-Messungen in Zellen wären sinnvoll.
- Wie erklärt sich der Effekt des EGFR-KO auf  $\beta$ -Adrenozeptoren? Ergänzend könnten Untersuchungen mit Applikation von  $\beta$ -Blockern erfolgen.
- Kommt es zu kompensatorischen Mechanismen nach EGFR-KO mit einer Zu- oder Abnahme der Dichte von anderen Rezeptoren?
- Inwiefern spielt der Serotonin-Rezeptor für die Vasokonstriktion eine Rolle? Kommt es auch hier analog zu  $\beta$ -Adrenozeptoren zu konzentrationsabhängigen Änderungen?
- Gibt es nach EGFR-KO redundante Signale über weitere Erb-Rezeptoren, welche EGFR-nachgeschaltete Signalkaskaden aktivieren?
- Es sollten weitere Untersuchungen zu Unterschieden zwischen Männchen und Weibchen erfolgen mit der Frage, ob möglicherweise der Östrogen-Rezeptor im Hinblick auf den EGFR eine Rolle spielt.
- Untersuchungen von Gefäßen verschiedener Lokalisation (z.B. mesenterial, koronar, cerebral) im Hinblick auf einen veränderten Vasotonus wären wünschenswert.

## 6 Zusammenfassung

Die Transaktivierung des EGFR via GPCR führt bekanntlich zu Langzeiteffekten in Kardiomyozyten und VSMC wie Hypertrophie, Proliferation, Fibrose und ist an der Entstehung von Arteriosklerose beteiligt. Möglicherweise kommt es auch zu kurzfristigen Effekten in der Blutdruckregulation. In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Tiermodell untersucht, inwiefern der EGFR bei Vasokonstriktion und -dilatation eine Rolle spielt.

Für die Experimente wurde eine Knockout-Mauslinie, bei welcher der EGFR herz- und gefäßspezifisch ausgeschaltet war, mit ihren WT-Wurfgeschwistern in Bezug auf Phänotyp und dem Verhalten von Aortenringen auf vasoaktive Substanzen verglichen. Dazu wurde Kaliumchlorid als nicht-rezeptorvermittelter Vasokonstriktor und anschließend EGF als eigentlicher Agonist des EGFR appliziert.

Danach wurden Substanzen untersucht, bei denen eine Transaktivierung im Rahmen des vasoaktiven Effekts untersucht werden sollte. Dazu zählte Endothelin-1, Noradrenalin, Carbachol, Natrium-Nitrit und Serotonin.

Auf die Applikation von Kaliumchlorid reagierten beide Mauslinien mit einer starken anhaltenden Kontraktion, welche bei den WT stärker war und schneller ein Plateau erreichte. Auf EGF reagierten die WT-Aorten mit einer schwachen Kontraktion, die bei den KO nicht auftrat. Nach Zugabe von Endothelin-1 fand eine Vasokonstriktion bei beiden Mauslinien statt, welche bei der Gesamtpopulation der KO stärker ausgeprägt war. Dies spricht gegen eine Beteiligung des EGFR an der Endothelin-Rezeptor-vermittelten Vasokonstriktion. Hier könnten eine kompensatorische Hochregulation von Rezeptoren oder andere Kompensationsmechanismen eine Rolle spielen.

Auf Noradrenalin reagierten die Aorten mit einer konzentrationsabhängigen Kontraktion, welche sich initial nicht unterschied. In hohen Konzentrationen kam es bei den WT zu einer Vasodilatation, die bei den KO nicht zu beobachten war. Verantwortlich dafür sind wahrscheinlich  $\beta$ -Adrenozeptoren. Möglicherweise spielt der EGFR in der  $\beta$ -Adrenozeptor-vermittelten Vasodilatation eine Rolle. Ob es sich hierbei möglicherweise auch um Hochregulation von  $\alpha$ - oder Herunterregulation von  $\beta$ -Adrenozeptoren handelt oder die Effekte innerhalb der Signalkaskade der Zellen stattfinden, ist unklar. Auf Serotonin trat eine transiente starke Kontraktion auf, welche sich bei den Mauslinien nicht unterschied. Auch die endothel-vermittelte und endothel-unabhängige Vasodilatation nach Vorkontraktion mit Noradrenalin waren vergleichbar. Zusammenfassend konnte keine Beteiligung des EGFR an der Vasokonstriktion auf  $\alpha$ -Adrenozeptor, Endothelin-1- oder Serotonin-Rezeptoren sowie der endothel- oder nicht-endothel-vermittelten Vasodilatation nachgewiesen werden. Allerdings

zeigte sich eine veränderte Vasokonstriktion auf die Applikation von Kaliumchlorid, die bei den KO deutlich schwächer und langsamer ausfiel. Somit scheint der EGFR möglicherweise die Kalium-vermittelte Kontraktion durch Herunterregulation von Kalium-Rezeptoren oder eine veränderte nachfolgende Calcium-Freisetzung zu beeinflussen. Zudem gibt es eine Beteiligung an der  $\beta$ -Adrenozeptor-vermittelten Vasodilatation bei hohen Noradrenalin-Konzentrationen durch den EGFR.

Die Transaktivierung des EGFR durch GPCR ist klinisch bedeutsam in der Onkologie und Resistenzentwicklung gegen Medikamente in Krebszellen, wo sie zu einer Aktivierung von anti-apoptotischen Signalen und Zellwachstum in Krebszellen führt sowie in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie.

Die Beteiligung des EGFR an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks und der Beteiligung an der Kontraktion einzelner Substanzen war bisher unklar. In verschiedenen Studien gab es Hinweise für eine Beteiligung. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dagegen. Möglicherweise spielen die kurzfristigen Effekte des EGFR eine größere Rolle in pathologischen Systemen wie bei Vorliegen einer arteriellen Hypertonie im Rahmen chronischer Überstimulation durch vasoaktive Substanzen. Aufgrund der hohen Inzidenz der arteriellen Hypertonie mit ihren möglichen schweren Folgen und der Beteiligung des EGFR an der Pathogenese spielt die Forschung an diesem Rezeptor zum Verständnis der Pathogenese und der Entwicklung von Medikamenten mit einem möglichen zentralen Angriffspunkt trotz Stimulation durch viele verschiedene Substanzen eine wichtige Rolle.

## Literaturverzeichnis

- Akhtar S, Benter IF (2013) The role of epidermal growth factor receptor in diabetes-induced cardiac dysfunction. *Bioimpacts* 3:5–9. <https://doi.org/10.5681/bi.2013.008>
- Amin AH, Abd Elmageed ZY, Partyka M, Matrougui K (2011) Mechanisms of myogenic tone of coronary arteriole: Role of downstream signaling of the EGFR tyrosine kinase. *Microvasc Res* 81:135–142. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.11.001>
- Angeletti PU, Salvi ML, Chesanow RL, Cohen S (1964) Azione dell' "epidermal growth factor" sulla sintesi de acidi nucleici e proteine dell'epitelio cutaneo (Action of the "epidermal growth factor" on nucleic acid and protein synthesis in cutaneous epithelium). *Experientia* 20:146–148
- Arora N, Gupta A, Singh PP (2017) Biological agents in gastrointestinal cancers: Adverse effects and their management. *J Gastrointest Oncol* 8:485–498. <https://doi.org/10.21037/jgo.2017.01.07>
- Arteaga CL, Engelman JA (2014) ERBB receptors: From oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* 25:282–303.
- Arts MR, Baron M, Chokr N, Fritzler MJ, Servant MJ (2014) Systemic sclerosis immunoglobulin induces growth and a pro-fibrotic state in vascular smooth muscle cells through the epidermal growth factor receptor. *PLoS ONE* 9:e100035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100035>
- Atef ME, Anand-Srivastava MB (2014) Enhanced expression of Gq $\alpha$  and PLC- $\beta$ 1 proteins contributes to vascular smooth muscle cell hypertrophy in SHR: Role of endogenous angiotensin II and endothelin-1. *Am J Physiol, Cell Physiol* 307:C97-106. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00337.2013>
- Atef ME, Anand-Srivastava MB (2016) Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gq $\alpha$ /PLC $\beta$ 1 proteins and hypertrophy of VSMC from SHR: Role of growth factor receptor transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310:H608-18.
- Ayala-Lopez N, Thompson JM, Watts SW (2017) Perivascular Adipose Tissue's Impact on Norepinephrine-Induced Contraction of Mesenteric Resistance Arteries. *Front Physiol* 8:37.
- Ayala-Lopez N, Watts SW (2017) New actions of an old friend: Perivascular adipose tissue's adrenergic mechanisms. *Br J Pharmacol* 174:3454–3465. <https://doi.org/10.1111/bph.13663>
- Benter IF, Yousif MHM, Griffiths SM, Benboubetra M, Akhtar S (2005) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase-mediated signalling contributes to diabetes-induced vascular dysfunction in the mesenteric bed. *Br J Pharmacol* 145:829–836. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706238>
- Bernet A, Sabatier S, Picketts DJ, Ouazana R, Morlé F, Higgs DR, Godet J (1995) Targeted inactivation of the major positive regulatory element (HS-40) of the human alpha-globin gene locus. *Blood* 86:1202–1211
- Bir SC, Pattillo CB, Pardue S, Kolluru GK, Docherty J, Goyette D, Dvorsky P, Kevil CG (2012) Nitrite anion stimulates ischemic arteriogenesis involving NO metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303:H178-88. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01086.2010>
- Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R (2017) Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biol* 12:18–34. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.007>
- Carpenter G, Lembach KJ, Morrison MM, Cohen S (1975) Characterization of the binding of <sup>125</sup>I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem* 250:4297–4304

- Cattaneo F, Guerra G, Parisi M, Marinis M de, Tafuri D, Cinelli M, Ammendola R (2014) Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci* 15:19700–19728.
- Chansel D, Ciroidi M, Vandermeersch S, Jackson LF, Gomez A-M, Henrion D, Lee DC, Coffman TM, Richard S, Dussaule J-C, Tharaux P-L (2006) Heparin binding EGF is necessary for vasospastic response to endothelin. *FASEB J* 20:1936–1938.
- Chao J-T, Davis MJ (2011) The roles of integrins in mediating the effects of mechanical force and growth factors on blood vessels in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 13:421–429.
- Chen H, Ma N, Xia J, Liu J, Xu Z (2012)  $\beta$ 2-Adrenergic receptor-induced transactivation of epidermal growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor via Src kinase promotes rat cardiomyocyte survival. *Cell Biol Int* 36:237–244.
- Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: Towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:505–516. <https://doi.org/10.1038/nrm1962>
- Cohen MV, Downey JM (2015) Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: Historical perspective and lessons for the future. *Br J Pharmacol* 172:1913–1932.
- Cohen S (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237:1555–1562
- Cohen S (1965) The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* 12:394–407
- Cohen S, Elliott GA (1963) The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J Invest Dermatol* 40:1–5
- Conceição-Vertamatti AG, Borghi F, Canova F, Grassi-Kassisse DM (2017) History of vascular reactivity models and their involvement in hypertension pathogenesis. *VASA* 46:431–439.
- Danish Myo Technology Dual Wire Myograph System - Model 410A User Manual Version 3.3
- Das M, Miyakawa T, Fox CF, Pruss RM, Aharonov A, Herschman HR (1977) Specific radiolabeling of a cell surface receptor for epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:2790–2794
- Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, Pollock DM, Webb DJ, Maguire JJ (2016) Endothelin. *Pharmacol Rev* 68:357–418.
- Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM (2012) Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Adv Skin Wound Care* 25:349–370. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000418541.31366.a3>
- Descorbeth M, Anand-Srivastava MB (2010) Role of growth factor receptor transactivation in high glucose-induced increased levels of Gq/11alpha and signaling in vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 49:221–233. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.12.010>
- Doroszkowski A, Janus A, Szahidewicz-Krupska E, Mazur G, Derkacz A (2016) Resistant Hypertension. *Adv Clin Exp Med* 25:173–183. <https://doi.org/10.17219/acem/58998>
- Duru EA, Fu Y, Davies MG (2012) Urokinase requires NAD(P)H oxidase to transactivate the epidermal growth factor receptor. *Surgery* 152:879–885.
- Duru EA, Fu Y, Davies MG (2014) Protease-mediated human smooth muscle cell proliferation by urokinase requires epidermal growth factor receptor transactivation by triple membrane signaling. *J. Surg. Res.* 192:254–262. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.06.054>
- Eglen RM (2012) Overview of muscarinic receptor subtypes. *Handb Exp Pharmacol*:3–28.

- El-Hashim AZ, Khajah MA, Renno WM, Babyson RS, Uddin M, Benter IF, Ezeamuzie C, Akhtar S (2017) Src-dependent EGFR transactivation regulates lung inflammation via downstream signaling involving ERK1/2, PI<sub>3</sub>K $\delta$ /Akt and NF $\kappa$ B induction in a murine asthma model. *Sci Rep* 7:9919. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09349-0>
- Esposito G, Perrino C, Cannavo A, Schiattarella GG, Borgia F, Sannino A, Pironti G, Gargiulo G, Di Serafino L, Franzone A, Scudiero L, Grieco P, Indolfi C, Chiariello M (2011) EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by  $\beta$ -arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 106:577–589. <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0163-2>
- Flamant M, Tharaux P-L, Placier S, Henrion D, Coffman T, Chatziantoniou C, Dussaulte J-C (2003) Epidermal growth factor receptor trans-activation mediates the tonic and fibrogenic effects of endothelin in the aortic wall of transgenic mice. *FASEB J* 17:327–329.
- Florian JA, Watts SW (1999) Epidermal growth factor: A potent vasoconstrictor in experimental hypertension. *Am J Physiol* 276:H976-83
- Forrester SJ, Kawai T, O'Brien S, Thomas W, Harris RC, Eguchi S (2016) Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Mechanisms, Pathophysiology, and Potential Therapies in the Cardiovascular System. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56:627–653.
- Fredette NC, Meyer MR, Prossnitz ER (2018) Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 176:65–72.
- Freed DM, Bessman NJ, Kiyatkin A, Salazar-Cavazos E, Byrne PO, Moore JO, Valley CC, Ferguson KM, Leahy DJ, Lidke DS, Lemmon MA (2017) EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics. *Cell* 171:683-695.e18.
- Fuhrman B (2012) The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 222:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.044>
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–376.
- Garrido P, Shalaby A, Walsh EM, Keane N, Webber M, Keane MM, Sullivan FJ, Kerin MJ, Callagy G, Ryan AE, Glynn SA (2017) Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways. *Oncotarget* 8:80568–80588. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19631>
- Glaza I, Szadujkis-Szadurski L, Szadujkis-Szadurski R, Gajdus M, Olkowska J (2011) Modulating activity of M1 receptor to the reaction of ileal smooth muscle. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 65:478–481
- Gomez GG, Wykosky J, Zanca C, Furnari FB, Cavenee WK (2013) Therapeutic resistance in cancer: MicroRNA regulation of EGFR signaling networks. *Cancer Biol Med* 10:192–205.
- Gorden P, Carpentier JL, Cohen S, Orci L (1978) Epidermal growth factor: Morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5025–5029
- Grisanti LA, Guo S, Tilley DG (2017) Cardiac GPCR-Mediated EGFR Transactivation: Impact and Therapeutic Implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 70:3–9.
- Grisanti LA, Talarico JA, Carter RL, Yu JE, Repas AA, Radcliffe SW, Tang H-A, Makarewich CA, Houser SR, Tilley DG (2014)  $\beta$ -Adrenergic receptor-mediated transactivation of epidermal growth factor receptor decreases cardiomyocyte apoptosis through differential subcellular activation of ERK1/2 and Akt. *J Mol Cell Cardiol* 72:39–51.
- Guimarães S, Moura D (2001) Vascular adrenoceptors: An update. *Pharmacol Rev* 53:319–356

- Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A, Fernandez-Patron C (2004) Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ Res* 94:68–76.
- Hao L, Nishimura T, Wo H, Fernandez-Patron C (2006) Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:819–825.
- Harvey RD (2012) Muscarinic receptor agonists and antagonists: Effects on cardiovascular function. *Handb Exp Pharmacol*:299–316. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9_13)
- Heppner DE, van der Vliet A (2016) Redox-dependent regulation of epidermal growth factor receptor signaling. *Redox Biol* 8:24–27. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.12.002>
- Hofmann SL, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL, Hammer RE (1988) Overexpression of low density lipoprotein (LDL) receptor eliminates LDL from plasma in transgenic mice. *Science* 239:1277–1281
- Hollenberg MD, Cuatrecasas P (1973) Epidermal growth factor: Receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:2964–2968
- Holtwick R, Gotthardt M, Skryabin B, Steinmetz M, Potthast R, Zetsche B, Hammer RE, Herz J, Kuhn M (2002) Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7142–7147.
- Hooper JK, Cohen S (1967) Epidermal growth factor. I. The stimulation of protein and ribonucleic acid synthesis in chick embryo epidermis. *Biochim Biophys Acta* 138:347–356
- Hooper JK, Cohen S (1967) Epidermal growth factor. II. Increased activity of ribosomes from chick embryo epidermis for cell-free protein synthesis. *Biochim Biophys Acta* 138:357–368
- Houde M, Desbiens L, D'Orléans-Juste P (2016) Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol* 77:143–175. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.05.002>
- Hynes NE, Stern DF (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198:165–184
- Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J (2002) Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: An overview. *Circ Res* 90:21–28
- Jagadeesha DK, Takapoo M, Banfi B, Bhalla RC, Miller FJ (2012) Nox1 transactivation of epidermal growth factor receptor promotes N-cadherin shedding and smooth muscle cell migration. *Cardiovasc Res* 93:406–413. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr308>
- Johnson LK, Baxter JD, Vlodavsky I, Gospodarowicz D (1980) Epidermal growth factor and expression of specific genes: Effects on cultured rat pituitary cells are dissociable from the mitogenic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:394–398
- Kamato D, Rostam MA, Bernard R, Piva TJ, Mantri N, Guidone D, Zheng W, Osman N, Little PJ (2015) The expansion of GPCR transactivation-dependent signalling to include serine/threonine kinase receptors represents a new cell signalling frontier. *Cell Mol Life Sci* 72:799–808. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1775-0>
- Karaki H, Urakawa N, Kutsky P (1984) Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi* 20:427–444
- Kawanabe Y, Masaki T, Hashimoto N (2004) Involvement of epidermal growth factor receptor-protein tyrosine kinase transactivation in endothelin-1-induced vascular contraction. *J Neurosurg* 100:1066–1071. <https://doi.org/10.3171/jns.2004.100.6.1066>
- Kim J, Lee C-K, Park H-J, Kim HJ, So HH, Lee KS, Lee HM, Roh HY, Choi WS, Park TK, Kim B (2006) Epidermal growth factor induces vasoconstriction through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated mitogen-activated protein kinase pathway in hypertensive rats. *J Pharmacol Sci* 101:135–143

- Kleinbongard P, Schleiger A, Heusch G (2013) Characterization of vasomotor responses in different vascular territories of C57BL/6J mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 238:1180–1191.
- Knowles RG, Moncada S (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci* 17:399–402
- Komposch K, Sibia M (2015) EGFR Signaling in Liver Diseases. *Int J Mol Sci* 17.
- Köse M (2017) GPCRs and EGFR - Cross-talk of membrane receptors in cancer. *Bioorg Med Chem Lett* 27:3611–3620. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.002>
- Kovacs E, Zorn JA, Huang Y, Barros T, Kuriyan J (2015) A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Annu Rev Biochem* 84:739–764.
- Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Suzuki T, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK, Okano H, Narita M (2012) Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the development of gefitinib-resistance in transforming non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE* 7:e44368.
- Latorraca NR, Venkatakrishnan AJ, Dror RO (2017) GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem Rev* 117:139–155. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00177>
- Lee C-H, Su S-C, Chiang C-F, Chien C-Y, Hsu C-C, Yu T-Y, Huang S-M, Shieh Y-S, Kao H-W, Tsai C-S, Hung Y-J, Lin C-Y (2017) Estrogen modulates vascular smooth muscle cell function through downregulation of SIRT1. *Oncotarget* 8:110039–110051.
- Lee L-K, Kim M-Y, Kim J-H, Lee J-U, Park B-S, Yang S-M, Jeon H-J, Lee W-D, Noh J-W, Kwak T-Y, Lee T-H, Kim J-Y, Kim H-Y, Hwang B-Y, Kim B, Kim J (2015) A review of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension and its relevance for cardiovascular physiotherapy research. *J Phys Ther Sci* 27:303–307. <https://doi.org/10.1589/jpts.27.303>
- Lee SY, Jeong EK, Ju MK, Jeon HM, Kim MY, Kim CH, Park HG, Han SI, Kang HS (2017) Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer* 16:10. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0577-4>
- Lemmon MA, Schlessinger J, Ferguson KM (2014) The EGFR family: Not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a020768.
- Li B, Zhang S, Li M, Hertz L, Peng L (2010) Serotonin increases ERK1/2 phosphorylation in astrocytes by stimulation of 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Neurochem Int* 57:432–439.
- Li J, Cao Y-X, Liu H, Xu C-B (2007) Enhanced G-protein coupled receptors-mediated contraction and reduced endothelium-dependent relaxation in hypertension. *Eur J Pharmacol* 557:186–194. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.057>
- Li J, Yang X-M, Wang Y-H, Feng M-X, Liu X-J, Zhang Y-L, Huang S, Wu Z, Xue F, Qin W-X, Gu J-R, Xia Q, Zhang Z-G (2014) Monoamine oxidase A suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by inhibiting the adrenergic system and its transactivation of EGFR signaling. *J Hepatol* 60:1225–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.02.025>
- Li Y, Lévesque L-O, Anand-Srivastava MB (2010) Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H1959–67.
- Liebmann C (2011) EGF receptor activation by GPCRs: An universal pathway reveals different versions. *Mol Cell Endocrinol* 331:222–231. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.008>
- Lima RG de, Silva BR, da Silva RS, Bendhack LM (2014) Ruthenium complexes as NO donors for vascular relaxation induction. *Molecules* 19:9628–9654.
- Lin C-C, Lin W-N, Cheng S-E, Tung W-H, Wang H-H, Yang C-M (2012) Transactivation of EGFR/PI<sub>3</sub>K/Akt involved in ATP-induced inflammatory protein expression and cell motility. *J Cell Physiol* 227:1628–1638. <https://doi.org/10.1002/jcp.22880>

- M. J. Mulvany Dual Wire Myograph System - Model 410A User Guide. Danish Myo Technology
- Maassen van den Brink A, Centurión D, Villalón CM (2008) Crosstalk of vascular 5-HT<sub>1</sub> receptors with other receptors: Clinical implications. *Neuropharmacology* 55:986–993.
- Machida T, Iizuka K, Hirafuji M (2013) 5-hydroxytryptamine and its receptors in systemic vascular walls. *Biol Pharm Bull* 36:1416–1419. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00344>
- Macho AP, Lozano-Durán R, Zipfel C (2015) Importance of tyrosine phosphorylation in receptor kinase complexes. *Trends Plant Sci* 20:269–272.
- Machuki JO, Zhang HY, Harding SE, Sun H (2018) Molecular pathways of oestrogen receptors and  $\beta$ -adrenergic receptors in cardiac cells: Recognition of their similarities, interactions and therapeutic value. *Acta Physiol (Oxf)* 222. <https://doi.org/10.1111/apha.12978>
- Makki N, Thiel KW, Miller FJ (2013) The epidermal growth factor receptor and its ligands in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 14:20597–20613.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, Backer G de, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F (2013) 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 31:1281–1357. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000431740.32696.cc>
- Martinez-Lemus LA (2012) The dynamic structure of arterioles. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110:5–11. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00813.x>
- Mathison GC (1911) The effects of potassium salts upon the circulation and their action on plain muscle. *J Physiol (Lond)* 42:471–494
- Merkel LA, Rivera LM, Colussi DJ, Perrone MH (1993) Inhibition of EGF-induced vasoconstriction in isolated rabbit aortic rings with the tyrosine kinase inhibitor RG50864. *Biochem Biophys Res Commun* 192:1319–1326. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1560>
- Miao Y, Bi X-Y, Zhao M, Jiang H-K, Liu J-J, Li D-L, Yu X-J, Yang Y-H, Huang N, Zang W-J (2015) Acetylcholine inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  activated endoplasmic reticulum apoptotic pathway via EGFR-PI<sub>3</sub>K signaling in cardiomyocytes. *J Cell Physiol* 230:767–774.
- Miller FJ, Chu X, Stanic B, Tian X, Sharma RV, Davisson RL, Lamb FS (2010) A differential role for endocytosis in receptor-mediated activation of Nox1. *Antioxid Redox Signal* 12:583–593. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2857>
- Mindur JE, Swirski FK (2019) Growth Factors as Immunotherapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39:1275–1287.
- Mishra OP, Ashraf QM, Delivoria-Papadopoulos M (2010) Hypoxia-induced activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase in the cerebral cortex of newborn piglets: The role of nitric oxide. *Neurochem Res* 35:1471–1477.
- Moradi-Kalbolandi S, Hosseinzade A, Salehi M, Merikhian P, Farahmand L (2018) Monoclonal antibody-based therapeutics, targeting the epidermal growth factor receptor family: From herceptin to Pan HER. *J Pharm Pharmacol*. <https://doi.org/10.1111/jphp.12911>
- Mugabe BE, Yaghini FA, Song CY, Buharalioglu CK, Waters CM, Malik KU (2010) Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 332:116–124.
- Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41:19–26

- Nadeau V, Potus F, Boucherat O, Paradis R, Tremblay E, Iglarz M, Paulin R, Bonnet S, Provencher S (2018) Dual ETA/ETB blockade with macitentan improves both vascular remodeling and angiogenesis in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 8:2045893217741429. <https://doi.org/10.1177/2045893217741429>
- Nagareddy PR, Chow FL, Hao L, Wang X, Nishimura T, MacLeod KM, McNeill JH, Fernandez-Patron C (2009) Maintenance of adrenergic vascular tone by MMP transactivation of the EGFR requires PI<sub>3</sub>K and mitochondrial ATP synthesis. *Cardiovasc Res* 84:368–377.
- Natarajan A, Wagner B, Sibilia M (2007) The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17081–17086.
- Norton CE, Broughton BRS, Jernigan NL, Walker BR, Resta TC (2013) Enhanced depolarization-induced pulmonary vasoconstriction following chronic hypoxia requires EGFR-dependent activation of NAD(P)H oxidase 2. *Antioxid Redox Signal* 18:1777–1788.
- Ockenga W, Kühne S, Bocksberger S, Banning A, Tikkanen R (2013) Non-neuronal functions of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Genes (Basel)* 4:171–197.
- Pang L, Cai Y, Tang EHC, Irwin MG, Ma H, Xia Z (2016) Prostaglandin E Receptor Subtype 4 Signaling in the Heart: Role in Ischemia/Reperfusion Injury and Cardiac Hypertrophy. *J Diabetes Res* 2016:1324347. <https://doi.org/10.1155/2016/1324347>
- Porras AM, Masters KS (2015) Wave mice: A new tool in the quest to characterize aortic valvular disease etiologies. *J Thorac Dis* 7:E332–4. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.09.01>
- Prado AF, Pernomian L, Azevedo A, Costa RAP, Rizzi E, Ramos J, Paes Leme AF, Bendhack LM, Tanus-Santos JE, Gerlach RF (2018) Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction. *Redox Biol* 18:181–190. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.07.005>
- Rahmani F, Ziaemehr A, Shahidsales S, Gharib M, Khazaei M, Ferns GA, Ryzhikov M, Avan A, Hassanian SM (2019) Role of regulatory miRNAs of the PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Cell Physiol*.
- Rajaram P, Chandra P, Ticku S, Pallavi BK, Rudresh KB, Mansabdar P (2017) Epidermal growth factor receptor: Role in human cancer. *Indian J Dent Res* 28:687–694.
- Reichelt ME, O'Brien S, Thomas WG, Headrick JP (2017) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in responses to myocardial stress and cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol* 83:97–110. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.12.014>
- Roberts RE (2012) The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway: A potential therapeutic target in hypertension. *J Exp Pharmacol* 4:77–83.
- Rodríguez-Moyano M, Díaz I, Dionisio N, Zhang X, Avila-Medina J, Calderón-Sánchez E, Trebak M, Rosado JA, Ordóñez A, Smani T (2013) Urotensin-II promotes vascular smooth muscle cell proliferation through store-operated calcium entry and EGFR transactivation. *Cardiovasc Res* 100:297–306. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt196>
- Roskoski R (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 79:34–74. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>
- Russell A, Watts S (2000) Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 294:598–604
- Sakao S, Tatsumi K (2012) Molecular mechanisms of lung-specific toxicity induced by epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Oncol Lett* 4:865–867. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.872>

- Sánchez-González P, Jellali K, Villalobo A (2010) Calmodulin-mediated regulation of the epidermal growth factor receptor. *FEBS J* 277:327–342. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07469.x>
- Sandoval Y-HG, Li Y, Anand-Srivastava MB (2011) Transactivation of epidermal growth factor receptor by enhanced levels of endogenous angiotensin II contributes to the overexpression of  $G_{i\alpha}$  proteins in vascular smooth muscle cells from SHR. *Cell Signal* 23:1716–1726. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.06.006>
- Sasahara T, Okamoto H, Ohkura N, Kobe A, Yayama K (2015) Epidermal growth factor induces  $Ca^{2+}$  sensitization through Rho-kinase-dependent phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 762:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.042>
- Schafer AE, Blaxall BC (2017) G Protein Coupled Receptor-mediated Transactivation of Extracellular Proteases. *J Cardiovasc Pharmacol* 70:10–15. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000475>
- Schauwienold D, Sastre AP, Genzel N, Schaefer M, Reusch HP (2008) The transactivated epidermal growth factor receptor recruits Pyk2 to regulate Src kinase activity. *J. Biol. Chem.* 283:27748–27756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801431200>
- Schreier B, Hünerberg M, Mildenerger S, Rabe S, Bethmann D, Wickenhauser C, Gekle M (2017) Deletion of the EGF receptor in vascular smooth muscle cells prevents chronic angiotensin II-induced arterial wall stiffening and media thickening. *Acta Physiol (Oxf)*.
- Schreier B, Döhler M, Rabe S, Schneider B, Schwerdt G, Ruhs S, Sibilina M, Gotthardt M, Gekle M, Grossmann C (2011) Consequences of epidermal growth factor receptor (ErbB1) loss for vascular smooth muscle cells from mice with targeted deletion of ErbB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1643–1652. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.223537>
- Schreier B, Gekle M, Grossmann C (2014) Role of epidermal growth factor receptor in vascular structure and function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 23:113–121.
- Schreier B, Hünerberg M, Rabe S, Mildenerger S, Bethmann D, Heise C, Sibilina M, Offermanns S, Gekle M (2016) Consequences of postnatal vascular smooth muscle EGFR deletion on acute angiotensin II action. *Clin Sci* 130:19–33. <https://doi.org/10.1042/CS20150503>
- Schreier B, Rabe S, Schneider B, Bretschneider M, Rupp S, Ruhs S, Neumann J, Rueckschloss U, Sibilina M, Gotthardt M, Grossmann C, Gekle M (2013) Loss of epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes causes arterial hypotension and cardiac hypertrophy. *Hypertension* 61:333–340.
- Sheng Y, Zhu L (2018) The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 10:17–28
- Shimizu N, Maekawa M, Asai S, Shimizu Y (2015) Multicolor FISHs for simultaneous detection of genes and DNA segments on human chromosomes. *Chromosome Res* 23:649–662.
- Sibilina M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M (2007) The epidermal growth factor receptor: From development to tumorigenesis. *Differentiation* 75:770–787. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00238.x>
- Siddiqui S, Fang M, Ni B, Lu D, Martin B, Maudsley S (2012) Central role of the EGF receptor in neurometabolic aging. *Int J Endocrinol* 2012:739428. <https://doi.org/10.1155/2012/739428>
- Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L (2018) Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 12:3–20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>
- Smiljanic K, Dobutovic B, Obradovic M, Nikolic D, Marche P, Isenovic ER (2011) Involvement of the ADAM 12 in thrombin-induced rat's VSMCs proliferation. *Curr Med Chem* 18:3382–3386.

- Sorokin A, Staruschenko A (2015) Inhibition of ENaC by endothelin-1. *Vitam Horm* 98:155–187. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2015.01.001>
- Staiculescu MC, Foote C, Meininger GA, Martinez-Lemus LA (2014) The role of reactive oxygen species in microvascular remodeling. *Int J Mol Sci* 15:23792–23835.
- Stanic B, Pandey D, Fulton DJ, Miller FJ (2012) Increased epidermal growth factor-like ligands are associated with elevated vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in a primate model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:2452–2460.
- Staruschenko A (2014) To cleave or not to cleave: Role of ADAM17 in cell proliferation in PKD. *Am J Physiol Renal Physiol* 307:F658-9. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00341.2014>
- Staruschenko A, Palygin O, Ilatovskaya DV, Pavlov TS (2013) Epidermal growth factors in the kidney and relationship to hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 305:F12-20.
- Sur S, Agrawal DK (2014) Transactivation of EGFR by G protein-coupled receptor in the pathophysiology of intimal hyperplasia. *Curr Vasc Pharmacol* 12:190–201.
- Switzer CH, Glynn SA, Cheng RY-S, Ridnour LA, Green JE, Ambis S, Wink DA (2012) S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer. *Mol Cancer Res* 10:1203–1215. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0124>
- Tan C-S, Kumarakulasinghe NB, Huang Y-Q, Ang YLE, Choo JR-E, Goh B-C, Soo RA (2018) Third generation EGFR TKIs: Current data and future directions. *Mol Cancer* 17:29.
- Tang J, Liu N, Zhuang S (2013) Role of epidermal growth factor receptor in acute and chronic kidney injury. *Kidney Int* 83:804–810. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.435>
- Titus A, Marappa-Ganeshan R (2020) StatPearls: Physiology, Endothelin, Treasure Island (FL)
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2011) Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H2181-90. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00554.2011>
- Ulu N, Gurdal H, Landheer SW, Duin M, Guc MO, Buikema H, Henning RH (2010)  $\alpha$ 1-Adrenoceptor-mediated contraction of rat aorta is partly mediated via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol* 161:1301–1310.
- Ulu N, Henning RH, Guner S, Zoto T, Duman-Dalkilic B, Duin M, Gurdal H (2013) Intracellular transactivation of epidermal growth factor receptor by  $\alpha$ 1A-adrenoceptor is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase independently of activation of extracellular signal regulated kinases 1/2 and serine-threonine kinases in Chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 347:47–56.
- van de Pol V, Kurakula K, DeRuiter MC, Goumans M-J (2017) Thoracic Aortic Aneurysm Development in Patients with Bicuspid Aortic Valve: What Is the Role of Endothelial Cells? *Front Physiol* 8:938. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00938>
- Van Kleef ME, Spiering W (2017) Hypertension: Overly important but under-controlled. *Eur J Prev Cardiol* 24:36–43. <https://doi.org/10.1177/2047487317709116>
- Van Rossum JM, Burgers JP (1984) Quantitative relationships between dynamics and kinetics of drugs: A systems dynamics approach. *Drug Metab Rev* 15:365–382.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC (2017) Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)* 219:22–96.
- Vardanyan RS, Hruby VJ (2006) *Synthesis of essential drugs*, 1st ed. Elsevier, Amsterdam, Boston
- Wang L, Huang Z, Huang W, Chen X, Shan P, Zhong P, Khan Z, Wang J, Fang Q, Liang G, Wang Y (2017) Inhibition of epidermal growth factor receptor attenuates atherosclerosis via decreasing inflammation and oxidative stress. *Sci Rep* 8:45917.

- Wang W, Qiao Y, Li Z (2018) New Insights into Modes of GPCR Activation. *Trends Pharmacol Sci* 39:367–386. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.01.001>
- Wang X, Khalil RA (2018) Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol* 81:241–330. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>
- Wang Z (2017) ErbB Receptor Signaling, vol 1652. Springer New York, New York, NY
- Watts SW, Davis RP (2011) 5-hydroxytryptamine receptors in systemic hypertension: An arterial focus. *Cardiovasc Ther* 29:54–67. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00173.x>
- Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM (2012) Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev* 64:359–388. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004697>
- Wehrwein EA, Orer HS, Barman SM (2016) Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol* 6:1239–1278.
- Williams-Pritchard G, Knight M, Hoe LS, Headrick JP, Peart JN (2011) Essential role of EGFR in cardioprotection and signaling responses to A1 adenosine receptors and ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H2161-8.
- Xu M, Lu Y-P, Hasan AA, Hoher B (2017) Plasma ET-1 Concentrations are Elevated in Patients with Hypertension - Meta-Analysis of Clinical Studies. *Kidney Blood Press Res* 42:304–313.
- Xu X-y, Nie Y, Wang F-f, Bai Y, Lv Z-z, Zhang Y-y, Li Z-j, Gao W (2014) Growth differentiation factor (GDF)-15 blocks norepinephrine-induced myocardial hypertrophy via a novel pathway involving inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 289:10084–10094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.516278>
- Xu Z, Cai L (2015) Diabetic cardiomyopathy: Role of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Mol Cell Cardiol* 84:10–12. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.002>
- Yamaoka T, Kusumoto S, Ando K, Ohba M, Ohmori T (2018) Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113491>
- Yamaoka T, Ohba M, Ohmori T (2017) Molecular-Targeted Therapies for Epidermal Growth Factor Receptor and Its Resistance Mechanisms. *Int J Mol Sci* 18.
- Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S, Goto K (1988) Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6964–6967
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988) A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *J Hypertens Suppl* 6:S188-91
- Yu Q-J, Tao H, Wang X, Li M-C (2015) Targeting brain microvascular endothelial cells: A therapeutic approach to neuroprotection against stroke. *Neural Regen Res* 10:1882–1891.
- Zhang H, Faber JE (2001) Trophic Effect of Norepinephrine on Arterial Intima-Media and Adventitia Is Augmented by Injury and Mediated by Different 1-Adrenoceptor Subtypes. *Circ Res* 89:815–822. <https://doi.org/10.1161/hh2101.098379>
- Zhang H, Chalothorn D, Jackson LF, Lee DC, Faber JE (2004) Transactivation of epidermal growth factor receptor mediates catecholamine-induced growth of vascular smooth muscle. *Circ Res* 95:989–997. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000147962.01036.bb>
- Zhang L, Wang X, Cao H, Chen Y, Chen X, Zhao X, Xu F, Wang Y, Woo AY-H, Zhu W (2016) Vasopressin V1A receptor mediates cell proliferation through GRK2-EGFR-ERK1/2 pathway in A7r5 cells. *Eur J Pharmacol* 792:15–25.

## Thesen

1. Der Herz- und Gefäß-spezifische EGFR-Knockout führt zu einer Hypertrophie der Herzen, welche wahrscheinlich verantwortlich ist für die frühere Sterblichkeit.
2. Nach KO des EGFR ist die Dehnbarkeit der Aorta erhöht, was wahrscheinlich an einer verminderten Media-Dicke der Gefäße liegt.
3. Die Kontraktion der genetisch veränderten Aorten nach Zugabe von 25 mM KCl ist abgeschwächt und die Zeit bis zum Erreichen des maximalen Effekts ist länger.
4. EGF löst über den EGFR eine Kontraktion im Organbad aus, welche bei den transgenen Tieren nicht nachzuweisen ist.
5. Der EGFR ist nicht an der durch Endothelin-1 ausgelösten Vasokonstriktion im Organbad beteiligt.
6. Der EGFR ist nicht an der  $\alpha$ -Adrenozeptor-vermittelten Vasokonstriktion im Organbad beteiligt.
7. Der EGFR ist an der  $\beta$ -Adrenozeptor-vermittelten Vasodilatation im Organbad beteiligt.
8. Der EGFR ist nicht an der durch Serotonin ausgelösten Vasokonstriktion im Organbad beteiligt.
9. Der EGFR ist nicht an der endothel-vermittelten sowie an der endothel-unabhängigen Vasodilatation beteiligt.

## Anlage

### Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in pro analysi-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage gewonnen.

### Genotypisierung der Versuchstiere

Puffer DNA-Extraktion	Proteinase K 10 mg/ml, 1,0 M Tris-HCl pH 8,0 (TRISMA-Base), 0,5 M EDTA pH 8,0 (Titriplex-EDTA), SDS 10 %, 5 M NaCl, Wasser (Sigma), dNTP-Mix peqlab 4x25 µmol
Agarosegel	Agarose 2 %, TAE-Puffer, Ethidiumbromid 0,01 %
TAE-Puffer	2 M Tris/Acetat, 5 M Natrium-Acetat, 0,5 M EDTA, pH 7,8
Ladepuffer	TAE-Puffer 50 %, Glycerol 50 %,

### Kontraktionskraftmessungen an Mausearten

#### Tyrode

Stamm I	NaCl 17,5 % (g/V)
	KCl 1,005 % (g/V)
	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O 0,56 % (g/V)
Stamm II	NaHCO <sub>3</sub> 5,00 % (g/V)
Stamm III	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,29 % (g/V)
NaCl	119,8 mM
KCl	5,4 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1,1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	22,6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,42 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,51 mM
Glukose	5,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	0,05 mM
pH 7,4	

### Verwendete Substanzen

1% SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim
2%iges Agarosegel	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Carbachol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbogen	
dNTP-Mix	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Endothelin-1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol 70%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glukose	Merck, Darmstadt
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Isopropranolol	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Roth, Karlsruhe
L (+) – Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> -EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Natrium-Nitrit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Noradrenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Primer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reaktionspuffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Serotonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Taq-Polymerase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim

### Geräte und Bezugsquellen

Dual Wire Myograph	Modell A 410, Danish Myo Technology, A/S, Aarhus, Dänemark
Elektrophorese	Power Supply, E835, E231, Consort, Turnhout, Belgien
Bildbearbeitung	Gimp 2, Creative Commons, Mountain View, USA

Interface	Myo Interface 410A, Danish Myo Technology, A/S, Aarhus, Dänemark
Kaltlichtquelle	Optech PL 2000, Photonic, Wien, Österreich
Magnetrührer	RCT basic safety control, Sigma-Aldrich, Steinheim
Textbearbeitung	Word, Excel, Powerpoint, Microsoft, Redmond, USA
Mikroskop	Stereomikroskop SM33, Hund, Wetzlar
PCR Gerät	TProfessional Basic Thermocycler, Biometra, Göttingen
pH-Meter	inolab pH 7110, Xylem Analytics, Weilheim
Pinzette	Uhrmacher Pinzette BD 331R, Aesculap, Tuttlingen neoLab 7, Dumont, Montignez, Schweiz
Pipette	Research Adjustable, Eppendorf GmbH, Hamburg
Präparierschale Silikon (Tacosil®), Thauer& Co. KG, Dresden	
Graphen	Prism 5, GraphPad Software, San Diego, USA
Schere	Federschere, Augenschere, Aesculap, Tuttlingen
Schreiber	Watanabe MC 6715 Multirecorder, Japan
Spektralphotometer	Nanovue™ Plus, Biochrom, Cambridge, UK
Thermomixer	Comfort, Eppendorf GmbH, Hamburg
UV Licht	BioDoc-It Imaging System, UVP, Cambridge, UK
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
Waage	Basic 2100 S, Sartorius, Göttingen
Waage (mikro)	Toledo XA105DU, Mettler Instruments GmbH, Gießen
Wärmebad	Exatherm U3 Electronic, Thermostat, Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### Primer

Primer R4	5'- GCCTGTGTCCGGGTCTCGTCG-3'
Primer R6	5'-CAACCAGTGCACCTAGCCTGGC-3'
Primer LacZ	5'-GGATAATGCGAACAGCGCACGGCG-3'
Primer Cre 800	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG
Primer Cre 1200	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC

### PCR-Programm

Denaturierung	94 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	30 s	35 Zyklen
Primerhybridisierung	56 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	1 Zyklus

## **Publikationen von Teilen dieser Arbeit**

Schreier B., Rabe S., Schneider B., Bretschneider M., Rupp S., Ruhs S., Neumann J., Rueckenschloss U., Sibilial M., Gotthardt M., Grossmann C., Gekle M., Loss of epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes causes arterial hypotension and cardiac hypertrophy, *Hypertension*. 2013 Feb;61(2) 333-40.

Rupp S., Schreier B., Grossmann C., Gergs U., Gekle M., Neumann J., Targeted deletion of the epidermal growth factor receptor in mice increased vascular response to noradrenaline, 77th Annual Meeting Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 2011, Frankfurt a. Main, Posterbeitrag.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die eingereichte Arbeit mit dem Titel

### **Wirkungen von EGF-Rezeptoren an der Mauseorta**

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen habe.

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

## **Danksagung**

Ich möchte zuerst Herrn Prof. Dr. med. Joachim Neumann und Herrn Prof. Dr. med. Michael Gekle dafür danken, mir dieses spannende Thema überlassen zu haben. Durch diese Arbeit konnte ich erste Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten gewinnen und dabei stets von einer guten wissenschaftlichen Betreuung und Unterstützung profitieren.

Ein großes Dankeschön möchte ich Frau Dr. med. vet. Barbara Schreier und Herrn PD Dr. rer. nat. Ulrich Gergs aussprechen, die stets ein offenes Ohr hatten und auch immer einen guten Tipp parat. Es war schön, dass man auch bei den vermeintlich banalen Fragen stets das Gefühl hatte, ernst genommen zu werden und wertvolle Ratschläge bei den kleinen und großen Problemen bekam.

Allen Mitarbeitern des pharmakologischen Instituts möchte ich danken, dass sie mir die Zeit im Labor so angenehm gestalteten und Hilfestellung bei meinen ersten eigenen Versuchen leisteten. Insbesondere Frau Reber, die mich in den ersten Wochen intensiv und geduldig eingearbeitet hat und mir immer wieder zahlreiche Tipps für mein Arbeiten geben konnte, möchte ich hier für ihre Unterstützung danken.

Ich danke meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Studienzeit und während der Fertigstellung dieser Arbeit uneingeschränkt unterstützt haben. Auch wenn mein Weg nicht immer der geradlinigste war, hatte ich nie das Gefühl unter Druck zu stehen und immer den vollen Rückhalt. Das ist nicht selbstverständlich.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Partnerin Monika bedanken, die mir nicht nur einen wundervollen Sohn geschenkt, sondern mich auch immer wieder ermuntert und motiviert hat, mit der Arbeit weiterzumachen. Danke für deine Geduld und Unterstützung.