

Aus dem Johannes-Müller-Centrum für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktion von Endothelin-A – und Endothelin-B-Rezeptoren  
bei der Endothelin-1 induzierten Antwort glomerulärer  
Arteriolen der Maus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Janice Schildroth

aus Hennigsdorf

Datum der Promotion: 22.06.2014

# Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	2
2	Abstrakt.....	3
3	Einleitung .....	7
3.1	Struktur der Endotheline.....	8
3.2	Synthese, Speicherung und Elimination von ET-1 .....	9
3.3	Endothelin-Rezeptoren.....	11
3.4	Renale hämodynamische Wirkungen des ET-1 .....	16
3.5	Fragestellungen .....	24
4	Methoden.....	26
4.1	Tiere .....	26
4.2	Isolation und Perfusion der Arteriolen .....	26
4.3	Kontraktionsmessungen der Arteriolen .....	29
4.4	Protokolle .....	30
4.5	Substanzen und Geräte .....	32
4.6	Statistik.....	33
5	Ergebnisse.....	34
5.1	Kontraktionsmessungen an afferenten Arteriolen .....	34
5.2	Kontraktionsmessungen an efferenten Arteriolen .....	43
5.3	Vergleich der ET-1-Antwort in afferenten und efferenten Arteriolen.....	54
6	Diskussion .....	56
6.1	Methoden .....	56
6.2	ET-1 Wirkungen auf die afferente Arteriole .....	63
6.3	ET-1 Wirkungen auf die efferente Arteriole .....	65
6.4	Vergleich der ET-1 Antwort in afferenten und efferenten Arteriolen .....	67
6.5	Limitationen der Studie.....	68
7	Literatur.....	70
8	Anhang .....	92
8.1	Eidesstattliche Versicherung .....	92
8.2	Lebenslauf.....	93
8.3	Publikationen.....	94
8.4	Danksagung .....	96

# 1 Abkürzungsverzeichnis

AA	afferente Arteriole
Ang-II	Angiotensin-II
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonucleinsäure
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Exon
EA	efferente Arteriole
EC <sub>50</sub>	effektive Konzentration, bei der 50% der max. Wirkung erreicht werden
ET-R	Endothelin-Rezeptor
ET <sub>A</sub> -R	Endothelin-Rezeptor Typ A
ET <sub>B</sub> -R	Endothelin-Rezeptor Typ B
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ET-4	Endothelin-4
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester, N <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RBF	renaler Blutfluss
RPF	renaler Plasmafluss
RVR	renaler vaskulärer Widerstand
WT	Wildtypen

Im Übrigen werden die gebräuchlichen physikalischen und chemischen Abkürzungen verwendet.

## 2 Abstrakt

Das Endothelinsystem hat für die physiologische Funktion der Niere und für die Entstehung von Nierenerkrankungen eine große Bedeutung. Endothelineffekte an der Niere werden über zwei Rezeptortypen, den ET<sub>A</sub>-Rezeptor und den ET<sub>B</sub>-Rezeptor, vermittelt. ET<sub>A</sub>-Rezeptoren und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren sind auf der glatten Muskelzelle exprimiert, wo sie vasokonstriktorisch wirken können. ET<sub>B</sub>-Rezeptoren sind zudem auf der Endothelzelle exprimiert und vermitteln eine Vasodilatation. Ziel der Studie war es, die differentielle Beteiligung der Endothelinrezeptoren auf die Endothelin-1 induzierte vaskuläre Kontraktilität der afferenten und efferenten Arteriolen darzustellen.

Wir verwendeten das Modell der *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Maus. Diese Mäuse haben keinen funktionsfähigen renal vaskulären ET<sub>B</sub>-Rezeptor. Die Gefäßreaktivität isolierter glomerulärer Arteriolen wurde mit Hilfe eines Mikroperfusionsmeßplatzes untersucht: Arteriolen mit Glomerulus wurden unter Verwendung von Halte- und Perfusionspipetten perfundiert und die Gefäßdurchmesseränderungen wurden videomikroskopisch aufgezeichnet. Wirkstoffe wurden in die Badlösung appliziert. Die Analyse der Durchmesseränderungen erfolgte computergestützt.

In afferenten Arteriolen

-führte die kumulative Endothelin-1-Applikation zu einer dosisabhängigen und ähnlich starken Vasokonstriktion in Wildtypen und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen.

-Selektive ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade hob den vasokonstriktorischen Endothelin-1-Effekt in Wildtypen und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen auf.

-Kumulative ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Stimulation führte zu keiner Änderung der luminalen Durchmesser in Wildtypen und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen.

-Unspezifische Blockade der NO-Synthase änderte die arterioläre Antwort in Wildtypen und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen auf Endothelin-1-Applikation nicht signifikant.

-ET<sub>A</sub>-Rezeptor- und NO-Synthase-Blockade beeinflussten den basalen Durchmesser in Wildtypen und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen nicht signifikant.

In efferenten Arteriolen

-führte die kumulative Endothelin-1-Applikation zu einer konzentrationsabhängigen Konstriktion in Wildtypen und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen, welche in Wildtypen signifikant stärker war als in *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen.

-Während selektiver ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade war die Endothelin-1 vermittelte Vasokonstriktion in den Wildtypen abgeschwächt und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen vollständig aufgehoben.

-Kumulative ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Aktivierung führte zu einer Vasokonstriktion in Wildtypen, während es keinen Effekt in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen hatte.

-Während Blockade der NO-Synthase war die vasokonstriktorische Antwort auf kumulative Endothelin-1-Applikation in Wildtypen und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen signifikant stärker als ohne NO-Synthase-Blockade.

-Selektive ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade veränderte den basal arteriolären Durchmesser nicht.

-Blockade der NO-Synthase reduzierte den basalen Durchmesser in Wildtypen.

Afferente Arteriolen kontrahierten auf kumulative Endothelin-1-Applikation stärker als efferente Arteriolen in Wildtypen.

Die funktionellen Ergebnisse unterstützen die Annahme eines speziesspezifisch variabel ausgeprägten Endothelinsystems. Diese Speziesspezifität bezieht sich auf die differentielle Beteiligung von ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren an der Vasokonstriktion beziehungsweise Vasodilatation glomerulärer Arteriolen. Unsere Befunde weisen erstmalig auf eine dilatative Wirkung von ET<sub>A</sub>-Rezeptoren in diesen Gefäßen hin.

Die Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der Funktion von Endothelinrezeptoren im Bereich der glomerulären Gefäße, der Effekte von Endothelin auf die Nierenperfusion und auf die glomeruläre Filtrationsrate in der Maus.

## Abstract

Endothelins play an important role in the physiology and pathophysiology of the kidney. In the kidney endothelins mediate their effects by two receptors: The  $ET_A$ -receptor and the  $ET_B$ -receptor.  $ET_A$ - and  $ET_B$ -receptors are expressed on smooth muscle cells, where they act to induce vasoconstriction.  $ET_B$ -receptors are also expressed on endothelial cells, where they can mediate vasodilation. The aim of this study was to investigate the differential involvement of the endothelin-receptors on the Endothelin-1 mediated vascular contractility of the afferent and efferent arterioles.

We used the model of the rescued- $ET_B$ -receptor-deficient mice. These mice lack a functional renal vascular  $ET_B$ -receptor. The vascular reactivity of the isolated glomerular arterioles was investigated using the technique of microperfusion. Arterioles with intact glomeruli were perfused with the help of holding- and perfusionpipettes. The changes in the luminal diameter of the vessels were documented with videomicroscopy. Different drugs were added to the bath-solution. The changes of luminal diameter were analyzed with specific computer programs.

In afferent arterioles

- cumulative Endothelin-1 application led to a dose-dependent and strong vasoconstriction in both wildtypes and rescued- $ET_B$ -receptor-deficient mice.
- Selective blocking of the  $ET_A$ -receptor abolished the vasoconstrictory effect of Endothelin-1 in wildtypes and rescued- $ET_B$ -receptor-deficient mice.
- Cumulative  $ET_B$ -receptor stimulation did not change the luminal diameter in wildtypes and rescued- $ET_B$ -receptor-deficient mice.
- NO-Synthase-blockade did not significantly change the arteriolar response to Endothelin-1 application of wildtypes and rescued- $ET_B$ -receptor-deficient mice.
- $ET_A$ -receptor- and NO-Synthase-blockade did not significantly influence the basal luminal diameter in wildtypes and rescued- $ET_B$ -receptor-deficient mice.

In efferent arterioles

-cumulative Endothelin-1 application led to a dose dependent vasoconstriction in wildtypes and rescued-ET<sub>B</sub>-receptor-deficient mice. The effect in wildtype mice was significantly stronger than in rescued-ET<sub>B</sub>-receptor-deficient mice.

-A selective block of the ET<sub>A</sub>-receptor decreased the Endothelin-1 mediated vasoconstrictory response in wildtypes and abolished the Endothelin-1 mediated vasoconstrictory response in rescued-ET<sub>B</sub>-receptor-deficient mice.

-Cumulative ET<sub>B</sub>-receptor stimulation led to a vasoconstriction in wildtypes but had no effect in rescued-ET<sub>B</sub>-receptor-deficient mice.

-The vasoconstrictory response to cumulative Endothelin-1 application in wildtypes and rescued-ET<sub>B</sub>-receptor-deficient mice was significantly stronger during NO-Synthase-blockade than it was without NO-Synthase-blockade.

-Selective ET<sub>A</sub>-receptor-blockade did not change the basal arteriolar diameter.

-NO-Synthase-blockade reduced the basal arteriolar diameter in wildtypes.

The vasoconstriction to cumulative Endothelin-1 application was stronger in afferent than in efferent arterioles.

The functional results support the assumption of species specific, variabel expression of the endothelin system. This species specificity refers to the differential contribution of the ET<sub>A</sub>- and ET<sub>B</sub>-receptor on vasoconstriction and vasodilation of glomerular arterioles. Our results point for the first time to a dilatatory effect of the ET<sub>A</sub>-receptor in these vessels.

This study contributes for the understanding of the function of endothelin receptors in glomerular vessels, the effects of endothelin on the perfusion of the kidney and on the glomerular filtration rate in the mouse.

### 3 Einleitung

Die Endotheline bilden eine Familie aus drei 21-Aminosäure-Peptiden. Unter diesen drei Endothelinen ist Endothelin-1 (ET-1) die biologisch wichtigste Isoform im kardiovaskulärem System (1-4). ET-1 ist ein multifunktionelles Hormon, welches in der Physiologie und Pathophysiologie des kardiovaskulären und renalen Systems eine bedeutende Rolle spielt.

Am gesunden Herzen hat ET-1 chronotrope (5), arrhythmogene (6) und inotrope Effekte (7) und fördert eine Hypertrophie der Kardiomyozyten (8). Es spielt eine Rolle in der Pathogenese der kardialen Ischämie (9), der Herzinsuffizienz (10) und beim kardialen Remodelling (11). An den Koronararterien wirkt ET-1 vasokonstriktorisch (12).

ET-1 ist ein ausgeprägter Konstriktor von trachealen (13) und bronchialen glattmuskulären Zellen (14). Die pulmonalarterielle Hypertonie geht mit erhöhten ET-1-Plasmakonzentrationen einher, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren (15). Obwohl erhöhte ET-1-Plasmaspiegel auch bei anderen Erkrankungen beobachtet werden und ET-1 dort an der Pathophysiologie beteiligt ist, ist die klinische Verwendung von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten bisher auf die idiopathische pulmonale Hypertonie und digitale Ulzerationen im Rahmen einer Sklerodermie beschränkt.

ET-1 moduliert den renal vaskulären Widerstand (16-19), die Natriumhomöostase (20) und glomeruläre Funktionen (21). Die Besonderheit für die Regulation der glomerulären Gefäße ergibt sich daraus, dass das renale Gefäßbett sensitiver für ET-1 vermittelte Effekte als andere Gefäßbetten ist (22). Die renalen Gefäße sind sensitiver für ET-1 als für Angiotensin-II (Ang-II) (23). Eine weitere Besonderheit des Endothelinsystems in der Niere ist, dass im Gegensatz zu anderen Organen, wo der ET<sub>A</sub>-Rezeptor (ET<sub>A</sub>-R) den vorherrschenden Endothelin-Rezeptortyp darstellt, in der menschlichen Niere der ET<sub>B</sub>-Rezeptor (ET<sub>B</sub>-R) mit circa 70% der überwiegende Endothelinrezeptortyp ist (24). ET-1 wirkt an den Gefäßen nicht nur vasokonstriktorisch, sondern u.a. auch vasodilatatorisch über eine Aktivierung endothelialer ET<sub>B</sub>-R mit konsekutiver NO-Freisetzung (25). Somit ist eine Balance des vasokonstriktorischen und des vasodilatatorischen ET-1-Effektes für die

Regulation des Tonus der afferenten und efferenten Arteriole entscheidend. Durch einen differentiellen Einfluss des ET-1 auf den Tonus der afferenten und efferenten Arteriole und damit auf die GFR könnte ET-1 eine Rolle in der Pathogenese der Hypertonie spielen. So wird das Endothelinsystem nicht nur als wichtiger Faktor bei der Entstehung der arteriellen Hypertonie, sondern auch des akuten ischämischen und des chronischen Nierenversagens diskutiert (21;26-29). Dabei sind sowohl die vasoaktiven Eigenschaften des Endothelins (26) als auch seine Rolle bei der Entstehung einer Nierenfibrose von Bedeutung (29-31).

In dieser Studie untersuchten wir die ET-1-Wirkung sowie den Effekt verschiedener ET<sub>A</sub>-Rezeptor- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoragonisten- und antagonistischen auf afferente und efferente Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse und der Wildtypmäuse (WT). Das Modell der isoliert perfundierten Arteriolen ermöglichte eine Beurteilung der Reaktivität der Gefäße unabhängig von systemischen und tubulären Einflüssen. Die *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse zeichnen sich durch Fehlen eines funktionsfähigen vaskulären ET<sub>B</sub>-R aus (32;33). Mit diesem Mäusemodell umgeht man elegant die Problematiken, welche aus eingeschränkter Rezeptorspezifität verschiedener Agonisten und Antagonisten resultieren. Dies ermöglichte uns eine Untersuchung der differentiellen Beteiligung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors und des ET<sub>B</sub>-Rezeptors in der Vermittlung des akuten ET-1-Effektes in Mäusearteriolen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie leisten einen Beitrag zum Verständnis potentieller pathogenetischer Mechanismen oben genannter Erkrankungen.

### 3.1 Struktur der Endotheline

1988 isolierten *Yanagisawa et al.* aus dem Überstand einer Schweine-Aorten-Endothelzellen-Kultur ein Peptid, welches frühzeitig als eines der stärksten Vasokonstriktoren erkannt wurde: Das Endothelin (3).

Die Endothelinfamilie besteht aus vier 21-Aminosäurepeptiden: Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2), Endothelin-3 (ET-3) (4) und Endothelin-4 (ET-4) (34) sowie 3 31-Aminosäuren-Peptiden: Endothelin-1<sup>1-31</sup>, Endothelin-2<sup>1-31</sup>, Endothelin-3<sup>1-31</sup> (35). Bioaktive 31-Aminosäuren-Endotheline<sup>1-31</sup> werden durch Chymasen gebildet, welche selektiv *big*-ET-1, *big*-ET-2 und *big*-ET-3 an ihrer Tyrosin-31 und Glycin-32-Bindungspalten (35). Das Endothelin-4, oder auch *vasoactive intestinal contractor* (VIC) genannt, ist ein Analog des humanen Endothelin-2 in Ratten und Mäusen (36). ET-2 unterscheidet sich durch 2 Aminosäuren, ET-3 durch 6 Aminosäuren vom ET-1 (4).

Alle drei Isoformen unterscheiden sich in ihrer Potenz, glatte Muskelzellen zu kontrahieren (4). ET-3 konnte in zahlreichen Geweben wie im Gehirn (37;38), im Gastrointestinaltrakt (37-39), in der Nebenniere (40), in der Niere (37;39), in der Lunge (38;39), im Herzen (41) und im Plasma (42) nachgewiesen werden. *Matsumoto et al.* zeigten, dass im Rattengehirn die ET-3-Konzentration höher als die ET-1-Konzentration war (38). Das Vorkommen von ET-3 besonders im Gehirn lässt vermuten, dass ET-3 eine physiologische Aufgabe bei der Regulation der neuronalen Funktion hat (38). Der ET<sub>B</sub>-R hat eine höhere Affinität als der ET<sub>A</sub>-R zu ET-3 (43;44). Somit kann ET-3 über die ET<sub>B</sub>-R-Aktivierung zur Freisetzung von NO und Prostacyclin führen (45;46). ET-3 wirkt auch konstriktorisch (47;48). ET-2 wird unter anderem in Zellen des kardiovaskulären Systems (39;41;49), im Gastrointestinaltrakt (39), im Muskel (39) und im Ovar (50) exprimiert. ET-2 ist ein potenter (Vaso-) Konstriktor (47;48) und hat eine Funktion bei der Ovulation (50).

Unter den Endothelinen ist ET-1 die biologisch wichtigste Isoform im kardiovaskulärem System (1-3). In der menschlichen Niere ist die mRNA aller drei Endothelin-Isoformen vorhanden, wobei ET-1 die maßgebende Isoform darstellt (51). Daher konzentriert sich diese Studie auf die Wirkung von ET-1. ET-1 ist ein 21-Aminosäure-Peptid mit einer relativen molekularen Masse von 2,5. Es besitzt ein freies Amino- und Carboxyende. Das Carboxyende ist für die biologische Aktivität des ET-1 notwendig (52). Das Peptid zeichnet sich durch zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 1 und 15 sowie zwischen den Cysteinen 3 und 11 aus (3). Dadurch erhält das ET-1 eine Haarnadelschleifen-Konfiguration (53) und eine gewisse Resistenz gegen einen enzymatischen Abbau.

### 3.2 Synthese, Speicherung und Elimination von ET-1

Transkription des Pre-Pro-Endothelin-1-Gens führt zur Bildung der Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA. Durch Translation der Pre-Pro-ET-1-mRNA entsteht das aus 203 Aminosäuren bestehende Pre-Pro-Endothelin-1. Dieses Peptid wird durch eine Furin-ähnliche Endopeptidase zu dem aus 37-41 Aminosäuren bestehenden *big*-ET-1 gespalten. Das *big*-ET-1 besitzt nur eine relativ geringe vasokonstriktorische Potenz im Vergleich zum funktionalen, reifen ET-1<sup>1-21</sup> (54). *Big*-ET-1 wird dann durch verschiedene Isoformen des Endothelin-Converting-Enzymes (ECE) zum biologisch aktiven, reifen ET-1<sup>1-21</sup> weiterverarbeitet. Auch andere Metalloproteasen (55) spalten das *big*-ET-1 zum reifen ET-1<sup>1-21</sup> (3).

ET-1 wird von vaskulären Endothelzellen konstitutiv freigesetzt (56;57). Eine bedarfsadaptierte Freisetzung erfolgt unter anderem aus den endothelzell-spezifischen Weibel-Palade-Körpern (57;58). Zusätzlich zu den Endothelzellen wird ET-1 von anderen Zellen des kardiovaskulären und renalen Systems gebildet, wie etwa den glatten Muskelzellen (59). Die Endothelinfreisetzung aus den Endothelzellen ist jedoch 1000-fach höher als die aus den glatten Muskelzellen (59). Endothelin wird unter anderem auch in Epithelzellen der Atemwege (60), Fibroblasten (61), Neuronen (62;63), Kardiomyozyten (64), Leukozyten (65), Makrophagen (66), Darmepithelzellen (67) und anderen Zelltypen produziert. In der Niere wird ET-1 im Endothel der kleinen und mittelgroßen Gefäße, in mesangialen Zellen (68), in peritubulären Kapillaren, im Epithel des proximalen Tubulus, im Kortex, in der Medulla, in der Papille, im Glomerulus, in den Vasa recta und im Sammelrohr gebildet (69). Bei Vergleich der Endothelin-Konzentrationen mehrerer Ratten-Organe (Hirnrinde, Hypothalamus, Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Duodenum) wurde die höchste Konzentration in der inneren Medulla gemessen (70). Zahlreiche Faktoren stimulieren die ET-1-Synthese- und Freisetzung. Darunter sind Vasokonstriktoren wie Angiotensin-II, Vasopressin (71;72), Thromboxan<sub>A2</sub> (73), Wachstumsfaktoren wie Zytokine zum Beispiel Interleukin-1 (74;75), Interleukin-3, Granulozyten-Kolonie-Stimulierender-Faktor (76), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (75), Interferon- $\gamma$  (77), Transformierender-Wachstumsfaktor- $\beta$  (71;78), physikochemische Faktoren wie mechanische Dehnung (79), Druck (80), Hypoxie (81), geringe Scherspannung (82), andere Faktoren wie Insulin (83), Kortikosteroide (84;85) und zahlreiche andere Stimuli. Zahlreiche Faktoren inhibieren die ET-1-Synthese- und Freisetzung. Darunter sind Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (86), Prostaglandin<sub>E2</sub>, Prostaglandin I<sub>2</sub> (87), physikochemische Faktoren wie starke Scherspannung (88), andere Faktoren wie Östrogen und Progesteron (89) und zahlreiche weitere Inhibitoren.

Es ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt, ob eine Speicherung von Endothelin in Zellen stattfindet. Einerseits wurden sowohl *big*-ET-1 als auch ET-1 in Vesikeln (90) und ET-1 in Weibel-Palade-Körpern von Endothelzellen nachgewiesen (57). Andererseits spricht die Abhängigkeit der Endothelinsekretion vom mRNA-Spiegel (3) für eine ständige Neubildung und für eine Regulation der ET-1-Synthese auf Transkriptionsebene.

Der ET-1-Plasmaspiegel mit Konzentrationen im picogramm/ml-Bereich (91;92) ist im Vergleich zu den ET-1-Konzentrationen in den Endothelzellen (93;94) und anderen Zellen niedrig. Die Konzentration des im Plasma zirkulierenden ET-1 ist unter physiologischen Bedingungen zu gering um eine Vasokonstriktion auszulösen (95). Es konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen ET-1 vor allem nach abluminal in Richtung der anliegenden glatten Muskelzellen sezernieren (96;97). Zudem diffundiert ET-1 nach luminal ins Plasma, wo es zu einer Aktivierung des endothelialen ET<sub>B</sub>-R führt (98). ET-1 wirkt demnach autokrin und parakrin auf die abluminal von den Endothelzellen lokalisierten glatten Muskelzellen. Das Plasma-ET-1 stellt damit sozusagen den Überschuss des lokal produzierten ET-1 dar. ET-1 wirkt daher eher als ein lokal freigesetztes und weniger als ein zirkulierendes Hormon.

Die Plasma-ET-1-Halbwertszeit ist mit 1-2 Minuten sehr kurz (99). Der Abbau des Plasma-ET-1 erfolgt vor allem in den Lungen (zu 50%) (100), aber auch zu einem großen Teil in den Nieren (zu 10%), Herz (zu 3,6%) und in der Leber (zu 2,7%) (101;102). Der ET<sub>B</sub>-R ist der für den Abbau des Plasma-ET-1 entscheidende Rezeptor (103;104). Die Degradation des Plasma-ET-1 erfolgt durch Endozytose (105) des ET<sub>B</sub>-Rezeptor-ET-1-Komplexes über *coated pits* und anschließendem lysosomalen Abbau (103;106). Im Gegensatz dazu wird nach Internalisierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptor-ET-1-Komplexes über *caveolae* oder über *coated pits* (105) der ET<sub>A</sub>-Rezeptor recycled. Der Endothelin/ET<sub>A</sub>-R-Komplex zeigt nach Internalisierung eine langsame Dissoziation mit nahezu irreversibler Bindung von ET-1 an seinen Rezeptor. Das ET-1 dieses Komplexes bleibt noch lange intakt. Dieser Mechanismus kann für die anhaltende Kontraktion der glatten Muskelzelle, wie er etwa nach ET-1-Bolus-Applikation beobachtet wird, verantwortlich sein (105).

### **3.3 Endothelin-Rezeptoren**

#### **3.3.1 Klassifikation der Endothelin-Rezeptoren**

Die *International Union of Pharmacology (IUPHAR)* definiert und klassifiziert Rezeptoren. Für die Endothelin-Rezeptoren wurde dies zum ersten Mal 1994 durchgeführt (107) und 2002 aktualisiert (108). Heute werden zwei Endothelin-Rezeptor-Typen unterschieden: Der ET<sub>A</sub>-Rezeptor und der ET<sub>B</sub>-Rezeptor (109).

Die ET<sub>B</sub>-R sind sowohl auf der glatten Muskelzelle als auch auf der Endothelzelle lokalisiert (110). Daher wurden zwei verschiedene ET<sub>B</sub>-R-Subtypen vermutet: ET<sub>B1</sub>-Rezeptoren auf der Endothelzelle und ET<sub>B2</sub>-Rezeptoren auf der glatten Muskelzelle (110). Es gibt jedoch keine Daten, welche die Existenz von zwei unterschiedlichen ET<sub>B</sub>-R-Genen- oder Proteinen unterstützen (111). Die pharmakologisch heterogenen Antworten des ET<sub>B</sub>-Rezeptors zumindest auf S6c scheinen durch ET<sub>B</sub>-Rezeptoren vermittelt zu werden, welche von demselben ET<sub>B</sub>-R-Gen stammen (111). Die ET<sub>B1</sub>-R/ET<sub>B2</sub>-R Nomenklatur wurde von der *International Union of Pharmacology (IUPHAR)* nicht übernommen (109).

Es wurde auch die Existenz eines dritten Endothelin-Rezeptors angenommen, welcher als ET<sub>C</sub>-Rezeptor bezeichnet wurde. Dieser wurde 1993 von *Karne et al.* in *Xenopus laevis* geklont (107;112) und ein ähnlicher Rezeptor wurde auch von *Kumar et al.* in *Xenopus* vermutet (113). Neuere phylogenetische Studien lassen jedoch vermuten, dass das ET<sub>C</sub>-Rezeptor-Gen und das zugehörige Protein in Säugetieren im Verlauf der Evolution verloren gegangen sind. Damit ist der ET<sub>C</sub>-Rezeptor für die menschliche Physiologie und Pharmakologie nicht relevant (114;115).

### 3.3.2 Rezeptorenstruktur

Beide Endothelin-Rezeptoren wurden aus verschiedenen Geweben isoliert und nachgebildet (43;44;116-119). Es existieren beachtliche Homologien zwischen dem ET<sub>A</sub>-R und dem ET<sub>B</sub>-R. In der Aminosäuresequenz sind sie zu etwa 59 % identisch (43;44;120;121). Das Molekulargewicht der Rezeptorproteine beträgt circa 50 kDa (122;123). Sowohl der ET<sub>A</sub>-R als auch der ET<sub>B</sub>-R gehören zu den G-Proteingekoppelten-Rezeptoren (124;125) der Rhodopsin-Rezeptor-Superfamilie (125). Sie bestehen aus einer N-terminalen-Signalsequenz mit einem relativ langen extrazellulären N-terminalen Anteil, sieben transmembranen Domänen und einem intrazellulären COOH-terminalen Anteil. Jeder Endothelin-Rezeptor besitzt zwei separate Liganden-Interaktions-Subdomänen in der N-terminalen Domäne (121;126). Die Selektivität wird durch die extrazellulären Schleifen, besonders die zwischen den transmembranen Domänen 4-6 bestimmt (127). Die Rezeptoren verfügen über einige Serinreste im C-terminalen Bereich und damit über mögliche Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domäne (121).

### 3.3.3 ET<sub>A</sub>-Rezeptor

Der ET<sub>A</sub>-R hat eine ähnliche Affinität für ET-1 und ET-2 im subnanomolaren Bereich und eine 100fach geringere Affinität für ET-3 (1;43). Wichtige bekannte Wirkungen der ET<sub>A</sub>-R-Aktivierung sind Vasokonstriktion (128-133) und Zellproliferation (134). Der vasokonstriktorische Effekt variiert abhängig von der Spezies und dem Gefäßbett. Der ET<sub>A</sub>-R ist an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt. In COS-7-Zellen sind ET<sub>A</sub>-R mit G<sub>Q</sub>, G<sub>S</sub>, G<sub>11</sub>, G<sub>i2</sub> (135) gepaart. ET<sub>A</sub>-R in Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters sind mit G<sub>Q</sub> und G<sub>S</sub> nicht aber mit G<sub>i</sub> (136) verbunden. Eine weitere Studie konnte eine Kopplung des ET<sub>A</sub>-R an G<sub>α12</sub> zeigen (137). Über Stimulation der verschiedenen G-Proteine können die Phospholipase C (138), die Phospholipase A<sub>2</sub> (139), die Phospholipase D (140) oder die Proteinkinase C (141) aktiviert werden. Der vasokonstriktions-induzierende Signalweg der glatten Muskelzelle beinhaltet eine Aktivierung der Phospholipase C, welche eine Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat zu Inositol-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) bewirkt (138). IP<sub>3</sub> vermittelt die Kalzium-Ionen-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und führt so zu einem ersten und transienten intrazellulären Kalziumanstieg (142). Der initiale Kalziumanstieg führt zum einen zu einer Aktivierung der sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptoren (143) und somit zur weiteren Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischem Retikulum und zum anderen zu einer Aktivierung mehrerer Ionenkanäle der Plasmamembran, durch die extrazelluläres Kalzium einströmt und so für den anhaltenden Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration sorgt (142). Durch den Kalziumanstieg kommt es zu einer Öffnung von Chlorid-Ionenkanälen (144), zu einer Aktivierung des Natrium/H<sup>+</sup>- (Protonen-) Austauschers (145) und zu einer Inhibierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (146) und insgesamt zur Depolarisation der glatten Muskelzelle. Außerdem sind reaktive Sauerstoffspezies und Cytochrom-P-450 Metabolite (147) an der ET<sub>A</sub>-R vermittelten Vasokonstriktion beteiligt (148).

Bezüglich der Beteiligung der spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle in dem oben genannten Signaltransduktionsweg existieren jedoch teils sich widersprechende Daten: Die Endothelin vermittelte Vasokonstriktion konnte durch Blockade des spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanals mit Nifedipin vollständig aufgehoben werden (149). In afferenten Arteriolen kam es bei niedrigen ET-1-Dosen

(1 pM und 10 pM) zu einer starken Abschwächung der ET-1 induzierten Vasokonstriktion unter Blockade des spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanals. In efferenten Arteriolen zeigte die Blockade des spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanals jedoch keinen Effekt auf die ET-1 induzierte Vasokonstriktion (95;150;151). In einer anderen Studie hatte die Blockade der spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle keinen Einfluss auf die ET-1 induzierte Vasokonstriktion in afferenten und efferenten Arteriolen (152).

Die Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  führt unter anderem zur Bildung von Thromboxan  $A_2$  und somit zur weiteren Vasokonstriktion und zur Inflammation. Über Aktivierung der Phospholipase D vermittelt der  $ET_A$ -R eine mitogene Wirkung (140) und fördert die Zellproliferation.

Endothelin wirkt als ubiquitär vorkommendes vasoaktives Peptid an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus mit (153). Übereinstimmend mit dieser physiologischen Funktion des Endothelins werden auch die  $ET_A$ -R annähernd ubiquitär exprimiert.  $ET_A$ -R sind hauptsächlich auf der glatten Muskelzelle lokalisiert (154). Hier stellen die  $ET_A$ -R den überwiegenden Endothelin-Rezeptortyp dar (154).  $ET_A$ -R sind in zahlreichen Geweben vorhanden, einschließlich in dem Herzen, in der Lunge (128), in dem Gehirn (130) und schließlich in der Niere mit den afferenten und efferenten Arteriolen (155). Auch auf nicht-vaskulären Strukturen kommen  $ET_A$ -R vor, wie zum Beispiel auf Epithelzellen (156), Neuronen (157) und Myozyten (158).

#### **3.3.4 $ET_B$ -Rezeptor**

Der  $ET_B$ -R hat für alle drei Endothelin-Formen eine ähnliche Affinität im subnanomolaren Bereich (44). Der  $ET_B$ -R ist an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt: In COS-7-Zellen exprimierte  $ET_B$ -R sind mit  $G_Q$ ,  $G_S$ ,  $G_{11}$ ,  $G_{i2}$  (135) verbunden und in Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters exprimierte  $ET_B$ -R sind mit  $G_Q$  und  $G_i$  (136) gepaart. Über die Aktivierung der verschiedenen G-Proteine erfolgt eine Stimulation/Hemmung der Phospholipase C (124), der Phospholipase  $A_2$  (139) und der Phospholipase D (159) und eine Inhibition der Adenylylase (136). Im Unterschied zum  $ET_A$ -R ist der  $ET_B$ -R im vaskulären System nicht nur auf der glatten Muskelzelle, sondern auch auf der Endothelzelle exprimiert (160). Die intrazelluläre Signalkaskade des glattmuskulären  $ET_B$ -R im Sinne der Induktion einer Vasokonstriktion ist der  $ET_A$ -R-Signaltransduktion sehr ähnlich. Auch hier führt die Stimulation der Phospholipase C zur Generierung von  $IP_3$  (135) und DAG und zum

intrazellulären Kalziumanstieg (161;162). Auch sind reaktive Sauerstoffspezies (135) und die Rho-Kinase (163) an der  $ET_B$ -R vermittelten Vasokonstriktion beteiligt. Der endotheliale  $ET_B$ -R wirkt u.a. Tyrosin-Kinase- und Kalzium/Calmodulin-abhängig (164) über die Freisetzung endothelialer Faktoren wie NO (165) und Prostaglandine (166) vasodilatatorisch (111;165;167). Kontrovers wird dabei die Rolle des Prostazyklins diskutiert. Einige Studien zeigten, dass die Endothelin-Rezeptor-Aktivierung zu einer Prostazyklin-Freisetzung führt (45;168), während andere Studien keine Veränderung der  $ET-1$  induzierten Antwort unter Cyclooxygenase-Inhibition darstellten (25;169). Eine wichtige Funktion des  $ET_B$ -R ist seine Beteiligung an der Regulation der Plasma- $ET-1$ -Konzentration. Wie bereits erwähnt, ist der  $ET_B$ -R an der Degradation des zirkulierenden Plasma- $ET-1$  entscheidend beteiligt (170).  $ET_B$ -R-Aktivierung kann in verschiedenen Zelltypen zur Stimulation der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK), der DNA-Synthese (171) und insgesamt zur Proliferation (171;172) führen. In Endothelzellen beispielsweise kann  $ET_B$ -R-Aktivierung die Bildung von VEGF (173) verursachen und somit mitogen wirken. Andere Studien vermuteten einen vorwiegend antiproliferativen Effekt der  $ET_B$ -R-Aktivierung (174). Der  $ET_B$ -R ist entscheidend an der Kontrolle des basalen vaskulären Tonus beteiligt (165). Übereinstimmend mit dieser physiologischen Funktion werden die  $ET_B$ -R in zahlreichen Geweben exprimiert.  $ET_B$ -R sind in den vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen unter anderem in großer Anzahl in der Lunge (175;176), im Gehirn (177) und in geringerer Anzahl im Herzen (154;178) lokalisiert. Auch kommen die  $ET_B$ -R auf nicht-vaskulären Strukturen wie Epithelzellen (154), Gliazellen des Gehirns (154) und Neuronen (179) vor. In der Niere sind die  $ET_B$ -R in den glatten Muskelzellen und in den Endothelzellen der afferenten Arteriolen ausgebildet (155). In den efferenten Arteriolen finden sich  $ET_B$ -R auf den glatten Muskelzellen (155). Außerdem sind renale  $ET_B$ -R unter anderem in den Interlobulararterien und auf den Sammelrohren vorhanden (155).

### 3.3.5 Homo-und Heterodimere

Endothelinrezeptoren können vermutlich Homo- und Heterodimere bilden. Solche Rezeptorinteraktionen könnten für die zum Teil schwer zu interpretierenden experimentellen Ergebnisse verantwortlich sein, bei denen eine klare Zuordnung zur Funktion von  $ET_A$ -R und  $ET_B$ -R nicht getroffen werden konnte. In Astrozyten sind sowohl der  $ET_A$ -R als auch der  $ET_B$ -R an der Entfernung des  $ET-1$  aus dem Plasma

beteiligt(180). Hier führt nur die Kombination eines  $ET_A$ -R-selektiven und eines  $ET_B$ -R-selektiven Antagonisten zur Blockade der ET-1-Eliminierung, nicht jedoch die alleinige Applikation eines  $ET_A$ -R-selektiven- oder eines  $ET_B$ -R-selektiven Antagonisten (180). Es wurde vermutet, dass ET-1 als ein bivalenter Ligand fungieren könnte. Als ein solcher kann ET-1 über seinen N-Terminus an den  $ET_A$ -R und über seinen C-Terminus an den  $ET_B$ -R binden. Damit kann ET-1 eine Ligandenbrücke bilden und die Heterodimerbildung fördern (181). Direkte Nachweise für  $ET_A$ -R- und  $ET_B$ -R-Homo- und Heterodimere kommen von Studien, welche Koimmunoprecipitation der Rezeptoren mit *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) Analysen kombinieren:  $ET_A$ -R und  $ET_B$ -R können konstitutive Heterodimere formen (182).  $ET_A$ -R und  $ET_B$ -R bilden sowohl  $ET_A$ -R/ $ET_A$ -R und  $ET_B$ -R/ $ET_B$ -R Homodimere als auch  $ET_A$ -R/ $ET_B$ -R Heterodimere.  $ET_A$ -R/ $ET_B$ -R Heterodimere haben vermutlich andere pharmakologische und kalzium-signaltransduzierende Effekte als Monomere (183). Endothelin-Rezeptoren können auch mit anderen Rezeptoren Dimere bilden: Der Dopamin-Rezeptor interagiert im proximalen Tubulus physiologischerweise mit dem  $ET_B$ -R. Der eingeschränkte natriuretische Dopamineffekt in spontan hypertensiven Ratten ist zumindest zum Teil durch eine abnorme Dopamin-Rezeptor/ $ET_B$ -R-Interaktion bedingt (184).

### **3.4 Renale hämodynamische Wirkungen des ET-1**

#### **3.4.1 Allgemeine renale hämodynamische Wirkungen des ET-1**

Systemisches und lokal produziertes ET-1 hat in der Niere einen prominenten Einfluss: 1. In der Regulation der renalen Hämodynamik, 2. In der Kontrolle des tubulären Wasser- und Elektrolyttransportes, 3. In der Steuerung der Proliferation und Mitogenese verschiedener Zelltypen.

In verschiedenen Tiermodellen wie zum Beispiel in Ratten, Mäusen und Kaninchen führte ET-1-Infusion- und Applikation zu einem starken Anstieg des renal vaskulären Widerstandes (RVR) (16-19) und entsprechend zu einem Abfall des renalen Plasma- (16;149) und Blutflusses (RBF) (17;19;185-187) sowie des glomerulären Plasma- (21) und Blutflusses (188;189). Der ET-1 vermittelte Abfall des renalen Blutflusses bei unveränderten femoral-arteriellen Druck deutet auf einen Anstieg des renalen vaskulären Widerstandes hin (185).

Experimente in Ratten zeigten, dass die Veränderungen des renalen Plasmaflusses (RPF) nach ET-1-Applikation/Infusion schnell und dosisabhängig auftreten (190): Nach 20-30 Minuten war der RPF auf ein Minimum gesunken, es folgte ein langsamer Wiederanstieg des RPF und nach 1-2 Stunden kehrte der RPF zum Ausgangswert zurück (16;149;191). Im Unterschied dazu führte die ET-1-Infusion in Hunden zu einem raschen und transienten Anstieg des RPF, gefolgt von einem langanhaltendem Abfall des RPF (192).

Die ET-1 induzierte Reduktion des RBF war durch kombinierte ET<sub>A</sub>-R/ET<sub>B</sub>-R-Blockade vollständig aufgehoben (193;194). In einer weiteren Studie in gesunden Menschen hatte die kombinierte ET<sub>A</sub>-R- und ET<sub>B</sub>-R-Blockade mit BQ-123 (selektiver ET<sub>A</sub>-R-Antagonist) und BQ-788 (selektiver ET<sub>B</sub>-R-Antagonist) nur einen minimalen Effekt auf RBF und RVR (195). Unter unselektiver Endothelin-Rezeptor-Blockade mit Bosentan in Ratten fiel der glomerulär-kapilläre Druck und der präglomeruläre Widerstand stieg stark an (196).

In hydronephrotischen Rattennieren war unter ET<sub>A</sub>-R-oder ET<sub>B</sub>-R-Blockade die ET-1-Dosis-Wirkungskurve des glomerulären Blutflusses rechtsverschoben (188).

In einer Studie mit Menschen verminderte BQ-123 den ET-1 induzierten Anstieg des vaskulären Widerstandes (197;198). Gleicherdings reduzierte BQ-123 in einer weiteren Studie mit hydronephrotischen Rattennieren den Abfall des glomerulären Blutflusses bei ET-1-Applikation (189). Die ET-1 induzierte Reduktion des RBF war durch Blockade des ET<sub>A</sub>-R nur teilweise, aber nicht vollständig aufgehoben (193;194).

ET<sub>B</sub>-R Blockade mit BQ-788 verstärkte die ET-1 induzierte Vasokonstriktion (198).

Der ET<sub>B</sub>-R-Agonist IRL-1620 reduzierte den glomerulären und renalen Blutfluss (163;188;193). Die selektive ET<sub>B</sub>-R-Stimulation durch Gabe des ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten BQ-123 und gleichzeitige ET-1-Gabe oder durch Gabe des selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten S6c führte zu einer Reduktion des RBF (143;151).

Selektive ET<sub>A</sub>-R-Stimulation durch Blockade des ET<sub>B</sub>-R mit BQ-788 und gleichzeitige ET-1-Applikation führte zu einem Abfall des RBF.

Eine Blockade des ET<sub>A</sub>-R mit BQ-123 hatte keinen Effekt auf die basale glomeruläre Hämodynamik (196). Auch in einer Studie in Menschen hatte die Infusion mit BQ-123 allein keinen Einfluss auf den RVR, RBF, GFR (197;198).

Systemische ET<sub>B</sub>-R-Blockade mit BQ-788 allein führte bei gesunden männlichen Menschen zu einem Abfall des RBF und zu einem Anstieg des RVR (167). Die

Reduktion des RBF wurde durch eine Vorbehandlung mit L-NAME (NO-Synthase-Blocker) und Ibuprofen aufgehoben (98). Dies legt nahe, dass endogenes ET-1 durch ET<sub>B</sub>-R abhängige NO-oder Prostazyklin-Freisetzung an der Regulation des basalen renalen vaskulären Widerstandes beteiligt ist. In einer anderen Studie jedoch führte die selektive Blockade des ET<sub>B</sub>-R zu keiner Änderung des renalen Plasmaflusses (199).

Die Befunde lassen vermuten, dass sowohl der ET<sub>A</sub>-R als auch der ET<sub>B</sub>-R (sowohl der glattmuskuläre als auch der endotheliale) an den renal hämodynamischen ET-1-Wirkungen beteiligt sind.

ET-1 nimmt an der renalen Autoregulation teil. Ein Anstieg des renalen Blutflusses könnte über endotheliale Rezeptoren für Scherspannung registriert werden. Das Endothel fördert dann die ET-1-Sekretion. ET-1 diffundiert zu den glatten Muskelzellen, bindet an seine Rezeptoren und induziert eine Kontraktion. Der resultierende Anstieg des Tonus würde dem Anstieg des Blutflusses entgegenwirken und würde somit als ein myogener Mechanismus der Autoregulation wirken (200).

#### **3.4.2 ET-1-Effekt auf die GFR**

Die *single nephron GFR* ist das Produkt aus dem Filtrationsdruck entlang der glomerulären Kapillaren und dem Ultrafiltrationskoeffizienten. ET-1 beeinflusst beide Faktoren und damit die *single nephron GFR*. Eine geringe aber druckrelevante ET-1-Dosis (0,63 pmol/min) erhöhte den Filtrationsdruck (190). Dieser erhöhte Filtrationsdruck würde die Filtration fördern. Infusion einer niedrigen ET-1-Dosis (0,63pmol/min) führte jedoch zu einem Abfall des Ultrafiltrationskoeffizienten. Ein moderater Abfall in der glomerulären kapillären Flussrate verursachte eine relativ konstante, unveränderte *single nephron GFR* (190). ET-1 in höheren Konzentrationen (10 pmol/min) verringerte die glomeruläre kapilläre Flussrate und den Ultrafiltrationskoeffizienten und erzeugte einen GFR-Abfall (185). Zahlreiche weitere Studien in unterschiedlichen Tiermodellen konnten zeigen, dass ET-1 in druckrelevanten Konzentrationen zu einem dosisabhängigen Abfall der GFR führt (17;18;149;185;191). In einer nicht-druckrelevanten Dosis veränderte ET-1 die GFR jedoch nicht (16). Es zeigten sich keine Veränderung der GFR auf ET-1-Applikation trotz reduziertem renalen Blutfluss und erhöhtem renalen vaskulären Widerstand bei konstanten mittleren arteriellen Blutdruck (19).

Der unselektive ET-R-Antagonist Bosentan, der selektive ET<sub>A</sub>-R-Antagonist BQ-123 oder eine ET<sub>B</sub>-R-Blockade hatten keinen Einfluss auf die basale GFR (196;199). Dies lässt vermuten, dass ET-1 keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die basale GFR hat.

### 3.4.3 ET-1-Effekt auf die afferente Arteriole

#### *ET-1 induziert eine Vasokonstriktion*

1990 untersuchten *Edwards et al.* erstmalig die ET-1-Wirkung auf isolierte afferente Arteriolen der Kaninchenniere. ET-1-Applikation erzeugte eine konzentrationsabhängige und langanhaltende Vasokonstriktion in isolierten afferenten Arteriolen von Kaninchen (95). Auch andere Studien zeigten, dass ET-1 afferente Arteriolen der Kaninchennieren (19;201), der Rattennieren (17;147;151;191;202-206), der hydronephrotischen Rattennieren (149;150;188;189;207;208) und der Mäusenieren (209) konstringiert. Die initiale Vasokonstriktion trat bei einer ET-1-Dosis von  $10^{-12}$  mol/l auf (205;206). ET-1 bewirkte eine entlang des Gefäßes gleichmäßige Konstriktion (203). Am Ende der zweiten Minute erreichte der vasokonstriktorische ET-1-Effekt das *steady state* (147). ET-1-Applikation kann zu oszillatorischen Gefäßbewegungen der afferenten Arteriolen führen (149). Übereinstimmend mit der durch ET-1 vermittelten Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen, vermittelte ET-1 einen Anstieg des präglomerulären Widerstandes (16;19;185). ET-1 in niedrigen Konzentrationen verstärkte die myogene Antwort in afferenten Arteriolen (210).

#### *ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren sind in der afferenten Arteriole exprimiert*

Unter Verwendung der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde ET<sub>A</sub>-R-Immunoreaktivität ausschließlich auf der glatten Muskelzelle gesehen, während ET<sub>B</sub>-R-Immunoreaktivität sowohl auf der glatten Muskelzelle als auch, in schwacher Ausprägung, auf der Endothelzelle der präglomerulären Gefäße beobachtet wurde (155). In einer Radioligandenbindungsstudie in afferenten Arteriolen, in Arkuat- und Interlobulararterien der Rattennieren wurde das Vorkommen des ET<sub>A</sub>-R und des ET<sub>B</sub>-R in annähernd gleichem Verhältnis aufgezeigt (211), während in einer weiteren Studie in präglomerulären Kaninchenarteriolen das Verhältnis von ET<sub>A</sub>-R zu ET<sub>B</sub>-R mit 40:60 bestimmt wurde (212). Eine weitere Studie in Ratten bestätigte mittels der Immunoblottechnik die Expression sowohl von ET<sub>A</sub>-R

als auch von  $ET_B$ -R in präglomerulären Mikrogefäßen (202). In einer Ligandenbindungsstudie in menschlichen Nieren wurden nahezu keine glattmuskulären  $ET_B$ -R dargestellt (213).

*Der  $ET_A$ -R vermittelt eine ET-1 induzierte Vasokonstriktion in der afferenten Arteriole*  
Der selektive  $ET_A$ -R-Antagonist BQ-123 antagonisierte die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in hydronephrotischen Rattennieren, hob diese jedoch nicht vollständig auf (188;189). In einer weiteren Studie wurde jedoch die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion bei einer ET-1-Dosis von  $10^{-10}$  M durch BQ-123 (in dieser Studie noch als cyclo D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-D-Trp benannt) vollständig aufgehoben (214). Unter Verwendung eines anderen selektiven  $ET_A$ -R-Antagonisten (A-127722), war die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen in Ratten vollständig aufgehoben, außer bei den höchsten verwendeten ET-1-Konzentrationen von  $10^{-9}$  M und  $10^{-8}$  M (206).

Diese Studien weisen darauf hin, dass die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in afferenten Arteriolen zumindest überwiegend über den  $ET_A$ -R vermittelt wird.

*Der  $ET_B$ -R vermittelt eine Vasokonstriktion und/oder Vasodilatation in der afferenten Arteriole*

In afferenten Arteriolen und präglomerulären Gefäßen aus Rattennieren und aus hydronephrotischen Rattennieren führten die selektiven  $ET_B$ -R-Agonisten S6c und IRL-1620 zur Konstriktion (163;188;202). In einer Studie an afferenten Rattenarteriolen führte die Applikation von S6c zu einer konzentrationsabhängigen, starken Vasokonstriktion mit einer maximalen Reduktion des luminalen Durchmessers von  $57\pm 3\%$ , während IRL-1620 eine geringere Vasokonstriktion mit einer maximalen Reduktion des luminalen Durchmessers von  $24\pm 3\%$  vermittelte (206). Unter  $ET_B$ -R-Blockade mit A-192621 und niedrigen ET-1-Konzentrationen ( $10^{-12}$  M- $10^{-9}$  M) war die Vasokonstriktion vollständig aufgehoben und es waren höhere ET-1-Dosen ( $10^{-8}$  M) notwendig um eine signifikante Vasokonstriktion zu induzieren. Ohne  $ET_B$ -R-Blockade induzierte ET-1 schon in einer Konzentration von  $10^{-12}$  M eine signifikante Vasokonstriktion (206). Auch unter selektiver  $ET_B$ -R-Blockade mit BQ-788 und IRL-1038 wurde die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion präglomerulärer Gefäße antagonisiert, jedoch nicht vollständig aufgehoben. Dabei wurde ET-1 in einer Konzentration von  $10^{-9}$  M verwendet (188).

Eine Inhibition der NO-Synthese verstärkte die ET-1 induzierte Vasokonstriktion (201), was mit dem Hintergrund der Kopplung eines endothelialen ET<sub>B</sub>-R an das NO-System (165) auf einen vasodilatatorischen ET<sub>B</sub>-R-Effekt hinweist.

Diese Studien weisen darauf hin, dass die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in afferenten Arteriolen partiell über den ET<sub>B</sub>-R vermittelt wird, zudem gibt es Hinweise auf einen vasodilatatorischen ET<sub>B</sub>-R-Effekt in afferenten Arteriolen.

#### *Effekt der ET<sub>B</sub>-R-Aktivierung auf den basalen arteriolären Durchmesser*

Selektive Blockade des ET<sub>B</sub>-R mit A-192621 hatte in afferenten Arteriolen aus Rattennieren keinen Einfluss auf den basalen arteriolären Durchmesser (202). Im Unterschied dazu führte der selektive ET<sub>B</sub>-R-Antagonist BQ-788 allein in hydronephrotischen Rattennieren zu einer signifikanten Vasodilatation (188), was auf einen tonischen vasokonstriktorisches Effekt des ET<sub>B</sub>-R hinweist. Kombinierte Blockade des ET<sub>A</sub>-R und des ET<sub>B</sub>-R mit dem unselektiven ET-R-Antagonisten Bosentan führte zu einem Anstieg des basalen afferent arteriolären Widerstandes (196). Dies lässt vermuten, dass endogenes ET-1 tonisch die präglomerulären Gefäße dilatiert (196). Zusammen mit der Erkenntnis, dass BQ-123 allein keinen Effekt auf den präglomerulären Widerstand hatte, wurde vermutet, dass dieser tonische vasodilatatorische ET-1-Effekt über den ET<sub>B</sub>-R vermittelt wird (196).

Die Literaturanalyse zeigt Übereinstimmung darüber, dass ET-1 an der afferenten Arteriole eine Vasokonstriktion induziert. Auch sind wahrscheinlich beide Endothelinrezeptortypen an der Vermittlung dieser Vasokonstriktion beteiligt. Es gibt widersprüchliche Aussagen über die differentielle Beteiligung beider Rezeptortypen an der ET-1-induzierten Vasokonstriktion und über die dilatatorische Rolle der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren.

#### **3.4.4 ET-1-Effekt auf die efferente Arteriole**

##### *ET-1 induziert (k)eine Vasokonstriktion in der efferenten Arteriole*

1990 untersuchten *Edwards et al.* erstmalig die ET-1-Wirkung auf isolierte efferente Arteriolen der Kaninchenniere (95). ET-1-Applikation erzeugte eine konzentrationsabhängige und langanhaltende Vasokonstriktion isolierter efferenter Arteriolen des Kaninchens (95). Auch andere Studien zeigten, dass ET-1 efferente Arteriolen der Kaninchennieren in Konzentrationen von 4,0 ng/kg/min (19), der

Rattennieren ab einer ET-1 Konzentration von  $10^{-11}$  M (205;206) und von  $10^{-10}$  M (205) und der hydronephrotischen Rattennieren in ET-1-Konzentrationen von  $3 \times 10^{-10}$  M (149;150) und  $10^{-9}$  M (188;208) konstringiert. Gleichermaßen führte ET-1-Applikation zu einem Anstieg des postglomerulären Widerstandes (16;19;21;185;190). Andere Studien in efferenten Arteriolen aus Rattennieren und aus hydronephrotischen Rattennieren jedoch konnten keinen ET-1-Effekt auf den luminalen Durchmesser der (proximalen) efferenten Arteriolen verzeichnen, wobei ET-1-Konzentrationen von  $5 \times 10^{-7}$  M als Bolus kombiniert mit einer Infusion mit einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6}$  g/h pro 300g Rattengewicht (17) und  $4 \times 10^{-12}$  mol/kg pro Minute (189) und  $10^{-14}$  M -  $10^{-10}$  M (203) verwendet wurden. In den efferenten Arteriolen wurden keine Oszillationen auf ET-1-Applikation, wie diese in den afferenten Arteriolen sichtbar waren, gemessen (149).

*ET<sub>A</sub>-und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren sind in der efferenten Arteriole exprimiert*

Sowohl ET<sub>A</sub>-R- als auch ET<sub>B</sub>-R-Immunoreaktivität wurde in den glatten Muskelzellen in der efferenten Arteriole der Ratte beobachtet. Jedoch konnte keine ET<sub>B</sub>-R-Immunoreaktivität in den Endothelzellen der efferenten Arteriolen gemessen werden (155). In einer Ligandenbindungsstudie in menschlichen Nieren wurden nahezu keine glattmuskulären ET<sub>B</sub>-R dargestellt (213).

*Der ET<sub>A</sub>-R vermittelt (k)eine ET-1 induzierte Vasokonstriktion in der efferenten Arteriole*

Eine Studie in Ratten zeigte, dass die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in den efferenten Arteriolen vor allem durch den ET<sub>A</sub>-R vermittelt wurde (206). In einer weiteren Studie hatte BQ-123 keinen Effekt auf die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in den efferenten Arteriolen der hydronephrotischen Rattennieren, wobei ET-1-Applikation in einer Konzentration von  $10^{-9}$  M eine signifikante Vasokonstriktion induzierte (188). Dies lässt vermuten, dass der ET<sub>A</sub>-R zumindest in dieser ET-1-Konzentration kaum an der ET-1-Antwort beteiligt war. Andererseits schwächten in der gleichen Studie die selektiven ET<sub>B</sub>-R-Antagonisten BQ-788 und IRL-1038 in efferenten Arteriolen der hydronephrotischen Rattennieren die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion bei einer ET-1 Konzentration von  $10^{-9}$  M nur ab und hoben diese nicht vollständig auf. Es blieb also trotz ET<sub>B</sub>-R-Antagonisierung noch eine ET-1-Antwort erhalten, die vermutlich durch den ET<sub>A</sub>-R vermittelt wurde (188).

Es bleibt offen, ob und in welchem Ausmaß der ET<sub>A</sub>-R in efferenten Arteriolen eine ET-1 induzierte Vasokonstriktion vermittelt.

*Der ET<sub>B</sub>-R vermittelt eine Vasokonstriktion und/oder Vasodilatation in der efferenten Arteriole*

Ein vasokonstriktorischer Effekt des ET<sub>B</sub>-Rezeptors konnte in efferenten Arteriolen direkt oder indirekt gezeigt werden: In hydronephrotischen Rattennieren führte die Applikation des selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten IRL-1620 zur konzentrationsabhängigen Vasokonstriktion (163;188). Gleichermäßen konstringierte der ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Agonist IRL-1620 auch die efferenten Arteriolen der Rattennieren (206). Höhere ET-1-Dosen von 1 und 10 nM vermittelten unter ET<sub>A</sub>-R-Blockade eine signifikante Vasokonstriktion (206). Die selektiven ET<sub>B</sub>-R-Antagonisten BQ-788 und IRL-1038 schwächten in efferenten Arteriolen der hydronephrotischen Rattennieren die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion ab (188).

Es gibt Befunde, die auf einen vasodilatatorischen Effekt des ET<sub>B</sub>-Rezeptors in efferenten Arteriolen hinweisen: Der selektive ET<sub>B</sub>-R-Agonist S6c induzierte eine konzentrationsabhängige Vasodilatation (206). ET-1-Applikation erzeugte unter ET<sub>A</sub>-R-Blockade mit A-127722 eine signifikante und konzentrationsabhängige Vasodilatation (206). Der selektive ET<sub>B</sub>-R-Antagonist A-192621 verstärkte die ET-1 induzierte Konstriktion (206). Dieser vasodilatatorische Effekt des ET<sub>B</sub>-R überrascht angesichts fehlender Immunoreaktivität für ET<sub>B</sub>-R in den Endothelzellen der efferenten Arteriolen (155).

*ET-1 hat keinen Einfluss auf den basalen arteriolären Durchmesser der efferente Arteriole*

Der unselektive Endothelin-Rezeptor-Antagonist Bosentan veränderte den basalen efferent arteriolären Widerstand nicht (196). Auch hatte der selektive ET<sub>A</sub>-R-Antagonist BQ-123 keinen Einfluss auf den basalen efferent arteriolären Widerstand (196).

### **3.4.5 Vergleich der ET-1 Antwort in afferenten und efferenten Arteriolen**

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in den afferenten Arteriolen stärker ist als in den efferenten Arteriolen (149;203;206;208). In anderen Studien war jedoch entweder kein Unterschied in der ET-1-Antwort der

efferenten und der afferenten Arteriole zu beobachten (215), oder es gab eine stärkere ET-1 induzierte Vasokonstriktion in efferenten im Vergleich zu afferenten Arteriolen (185;190;205;216).

### 3.5 Fragestellungen

Aus der Literaturanalyse ergeben sich Fragen zur Wirkung von ET-1 in der Mikrovaskulatur der Nierenrinde, die wir mit dem Modell der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse beantworteten. Das Modell ermöglicht die Untersuchung der Endothelin-Rezeptorfunktion durch selektive Ausschaltung des ET<sub>B</sub>-R.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- *Welchen Anteil hat der ET<sub>A</sub>-R an der ET-1 induzierten Vasokonstriktion?*

Protokoll:

ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurve der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse.

- *Welchen Anteil hat der ET<sub>B</sub>-R an der ET-1 induzierten Vasokonstriktion?*

Protokolle:

Vergleich der ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurven in WT und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen.

Vergleich der ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurven während selektiver ET<sub>A</sub>-R-Blockade mit BQ-123 der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse.

Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven des selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten ALA-ET-1 in WT und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen.

Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven des selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten IRL-1620 in WT und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen.

- *Gibt es eine ET-1 induzierte relevante NO-Freisetzung?*

Protokolle:

Vergleich der ET-1-Dosis-Wirkungskurven der WT ohne und mit unspezifischer NO-Synthase-Blockade mit L-NAME zur Darstellung eines eventuell vasodilatatorischen ET<sub>B</sub>-R-Effektes.

Vergleich der ET-1-Dosis-Wirkungskurven der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse ohne und mit unspezifischer NO-Synthase-Blockade mit L-NAME zur Darstellung eines eventuell vasodilatatorischen ET<sub>A</sub>-R-Effektes.

- *Hat endogenes ET-1 einen Effekt auf den basal arteriölen Durchmesser der afferenten und efferenten Arteriolen?*

Protokoll:

Vergleich der Ausgangslumina der afferenten und efferenten Arteriolen der WT und der *rescued-ET<sub>B</sub>-R*-defizienten Mäuse vor und nach BQ-123- und L-NAME-Behandlung.

- *Ist die ET-1 induzierte Vasokonstriktion in den afferenten Arteriolen stärker als in den efferenten Arteriolen?*

Protokoll:

Vergleich der ET-1-Dosis-Wirkungskurven der afferenten und efferenten Arteriolen der WT.

## 4 Methoden

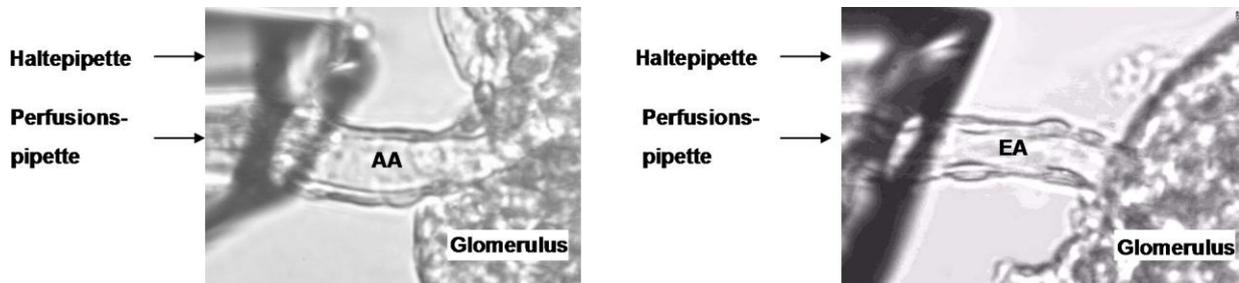
### 4.1 Tiere

Es wurden genetisch veränderte männliche und weibliche *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defiziente Mäuse und Wildtypmäuse (WT) verwendet. Die *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse wurden im Rahmen einer Kooperation von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hocher, CCR, Universitätsmedizin Berlin, bereitgestellt. In den ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Mäusen wurden Exon 3 und Exon 4 der genomischen DNA des ET<sub>B</sub>-R-Gens deletiert. Das verkürzte Transkript kodiert für einen nicht funktionsfähigen ET<sub>B</sub>-R (217). Daher entwickeln ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Mäuse eine kongenitale intestinale Aganglionose (218), äquivalent dem humanen Morbus Hirschsprung (219) und versterben 2 - 4 Wochen postpartal (218). Die *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defiziente Maus wurde durch Kreuzung einer ET<sub>B</sub>-Rezeptor-*knockout* Maus mit einer ET<sub>B</sub>-Rezeptor-transgenen Maus erzeugt (32). Der *Rescue*-Mechanismus entsteht durch ein Dopamin-Beta-Hydroxylase-Promotor-ET<sub>B</sub>-R-Transgen. Dieses Transgen wird vorübergehend in den von der Neuralleiste abstammenden Vorstufen des enterischen Nervensystems exprimiert und fördert so die normale intestinale Entwicklung der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (220). Die ausgewachsenen Tiere zeichnen sich durch Abwesenheit eines funktionsfähigen vaskulären ET<sub>B</sub>-R (32;33) bei normaler gastrointestinaler Entwicklung (220) aus. Alle Mäuse lebten in Käfighaltung mit einem geregelten Licht-Dunkel-Rhythmus und hatten freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser. Sämtliche Tierexperimente fanden unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes vom 01.01.1987, herausgegeben vom Bundesministerium der Justiz, statt. Die Tiertötung wurde durch das LAGESO (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, T 0003/06) genehmigt.

### 4.2 Isolation und Perfusion der Arteriolen

Die narkotisierten Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Nieren wurden sofort entnommen und entlang der kortikomedullären Achse geschnitten. Die Nierenschnitte wurden in 4 °C kaltes, mit Albumin angereichertes *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (0,1% Albumin) gelegt. Die Präparation der Arteriolen erfolgte mit speziell geformten Pinzetten unter einem Stereomikroskop mit

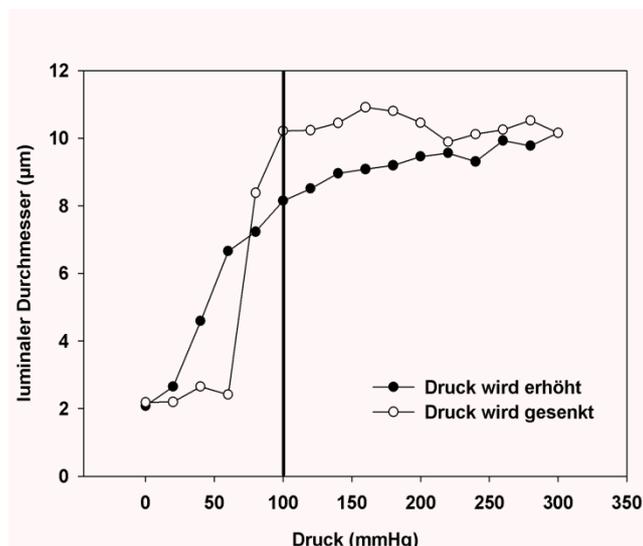
bis zu 250facher Vergrößerung. Zur Lokalisation der Arteriolen orientierten wir uns an den Glomeruli des äußeren Kortex. Nach vorsichtiger Separation der Strukturen wurde der Gefäßbaum der A. interlobularis mit ihrem Übergang in die afferente Arteriole dargestellt. Die afferenten Arteriolen wurden am proximalen Ende nahe der Interlobulararterie abgetrennt. Die efferenten Arteriolen wurden in der gleichen Weise präpariert. Sie wurden vor ihrer Aufzweigung in die Kapillaren abgeschnitten. Die Arteriolen mit intakten Glomerulus wurden in eine thermoregulierte Kammer (Volumen 1,5 ml, VETEC, Deutschland) auf einem invertierten Mikroskop (AXIOVERT 100, Carl Zeiss, Deutschland) transferiert. Die Kammer war auf einem justierbaren Mikroskoptisch befestigt. Zur Herstellung der Pipetten für die Perfusion wurden Glasröhrchen (Drummond Scientific Company, USA) verwendet. Der Durchmesser der Perfusionspipetten betrug 5  $\mu\text{m}$ , die Öffnung der Haltepipetten betrug nach Bearbeitung an der Spitze 26  $\mu\text{m}$ . Das proximale Ende der afferenten Arteriole bzw. das distale Ende der efferenten Arteriole wurde in die Haltepipette gebracht und die Perfusionspipette in das Lumen der Arteriolen vorgeschoben. Das entspricht einer orthograden Perfusion der afferenten Arteriole sowie einer retrograden Perfusion der efferenten Arteriole (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Orthograd perfundierte afferente Arteriole (AA) mit Glomerulus (links). Retrograd perfundierte efferente Arteriole (EA) mit Glomerulus (rechts). Jeweils links im Bild sind Halte- und Perfusionspipette zu sehen.

Die Perfusionspipette war mit einem Druckbehälter für die Perfusionslösungen und einem Manometer verbunden. Zum Austausch der Lösungen befand sich in der Pipette ein dünner Plastikschauch. Mit Hilfe von Mikromanipulatoren konnten die Pipetten in den drei Ebenen bewegt werden. Um einen optimalen (physiologischen) Perfusionsdruck zu ermitteln, wurden afferente Arteriolen mit steigenden Drücken perfundiert und das Gefäßlumen gemessen. Ein steigender Druck führte zu einer

Vergrößerung des Durchmessers der Gefäße. Die Beziehung ist nicht-linear. Die Gefäßweite änderte sich ab einem Druck von 80-100 mmHg im Druckbehälter weniger stark (Abbildung 2) (221). Dies lässt darauf schließen, dass bei diesen Drücken eine myogene Antwort einsetzt und das Gefäß nicht mehr nur passiv reagiert. Bei isolierten Gefäßen ist diese myogene Antwort unvollständig. Gefäße verringern nicht ihren Durchmesser, erhöhen aber den Tonus aktiv. Diese aktive Komponente als auch die Zunahme der Dehnungswiderstände (passiv) tragen zur Abflachung der Kurve bei. Unter Verwendung von Kalziumantagonisten wurde gezeigt, dass ein Teil der Druckantwort kalziumabhängig ist (222). Der Druckbereich der Abflachung der Kurve wurde als ein physiologischer Druckbereich der afferenten Arteriole interpretiert (221). Für die Perfusion der afferenten Arteriole wurde ein konstanter Druck von 100 mmHg im Druckbehälter gewählt.



**Abbildung 2:** Druck-Durchmesser-Kurve einer repräsentativen afferenten Arteriole bei schrittweiser Erhöhung und bei Senkung des Perfusionsdruckes (221).

Die efferenten Arteriolen wurden mit einem Druck von circa 40 mmHg perfundiert. Der niedrigere Wert resultiert aus der weitaus geringeren Wanddicke und fehlenden myogenen Antwort und orientiert sich an der Literatur (223).

Die Perfusionsrate des Versuchsaufbaus wurde mittels einer radioaktiv markierten Perfusionslösung ermittelt (221). Die Flussrate betrug bei einem Versuchsaufbau, der aus einer perfundierten Perfusionspipette mit einem Durchmesser von 5 µm bestand, circa 50 nl/min (224). Die Messungen wurden aus Gründen der besseren

Wiederholbarkeit ohne Arteriole und ohne Glomerulus durchgeführt. Da der lumenale Durchmesser der afferenten und efferenten Arteriole größer als 5  $\mu\text{m}$  und der Widerstand der glomerulären Kapillaren vergleichsweise gering ist, kann diese Messung als Schätzung des tatsächlichen Flusses während des hier verwendeten Versuchsaufbaus dienen (221). Die Perfusionsrate von 50 nl/min stimmt mit der Filtrationsrate für einzelne Nephrone (10nl/min) gut überein (224;225).

Bei erfolgreicher Perfusion wurde die Arteriole schrittweise auf 37 °C erwärmt. Die Adaptationszeit nach der Erwärmung betrug 20 Minuten. Die funktionelle Integrität der afferenten Arteriole konnte durch eine ausgeprägte, kurzfristige Vasokonstriktion mit vollständigem Verschluss des Gefäßes nach einer Druckerhöhung sowie nach Applikation von kaliumhaltiger Lösung (100 mmol/l) nachgewiesen werden. Nach Applikation der Kaliumlösung folgte eine zehninminütige Adaptationsperiode. Da efferente Arteriolen nach Gabe von Kaliumlösung keine Depolarisation zeigen, beurteilten wir deren Integrität anhand von Parametern wie die Struktur der Gefäßwand und erhaltenem Gefäßtonus. Hypoxische und Gefäße ohne basalen Tonus sowie anderweitig geschädigte Gefäße wurden nicht verwendet und der Versuch wurde abgebrochen. Der Versuch wurde auch abgebrochen, wenn eine Perfusion der Arteriolen innerhalb von 120 Minuten nach Tötung der Maus nicht gelang.

### **4.3 Kontraktionsmessungen der Arteriolen**

Die luminalen Durchmesser wurden zur Bestimmung der Effekte vasoaktiver Substanzen gemessen. Kontraktionsmessungen wurden auf *super video home system* (SVHS) Videobänder (Video Recorder AG MD 830, Panasonic, Japan) bzw. auf CD (DVD-RHDD Videorecorder JVC DR-MH50S, Victor Company of Japan) aufgezeichnet. Die endgültige Vergrößerung wurde durch ein Objektiv (x40, Carl Zeiss, Deutschland) und Projektion x1 auf eine 0,3" Chip Digitalkamera (VCAM 110-1, Phytex Technology Holding AG, Deutschland) erzielt. Die Videosequenzen wurden durch Verwendung einer Bilddigitalisierungskarte (Frame grabber card pci Grabber-4 plus, Phytex Techonolgy Holding AG, Deutschland) digitalisiert. Die Messung des Gefäßdurchmessers erfolgte mit einem eigens dafür hergestellten Programm (von Dr. H. Siegmund, Institut für Neurophysiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland). Die Auflösung betrug 0,2 $\mu\text{m}$ /Pixel. Der lumenale Ausgangsdurchmesser der Gefäße wurde am Ende der

Adaptationsperiode bzw. am Ende der Vorbehandlungsperiode bestimmt. Die Vorbehandlungsperioden hatten eine Dauer von 10 Minuten, die Behandlungsperioden hatten jeweils eine Dauer von 2 Minuten. Die luminalen Durchmesser der Arteriolen befanden sich in den letzten 10 Sekunden dieser Vor- und Behandlungsperioden im *steady state*. Dieser Zeitbereich wurde für die Messung verwendet. Entlang der Gefäße sahen wir keine systematischen Unterschiede der arteriolen Antwort auf Wirkstoffapplikation. Für die Messung wurde der Gefäßabschnitt mit der stärksten Kontraktion verwendet. Eine Arteriole wurde jeweils nur für ein Protokoll verwendet.

#### 4.4 Protokolle

##### 4.4.1 Afferente Arteriolen

###### Serie 1

In dieser Serie wurde die kumulative Dosis-Wirkungskurve der afferenten Arteriolen der WT (n=10) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=10) für ET-1 mit Konzentrationen von 10<sup>-12</sup> bis 10<sup>-7</sup> mol/l ermittelt.

###### Serie 2

Zur weiteren Untersuchung der differentiellen Funktion von ET<sub>A</sub>-Rezeptoren und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren wurden afferente Arteriolen mit BQ-123 (10<sup>-6</sup> mol/l, in der Badlösung, 10 Minuten) vorbehandelt. BQ-123 ist ein selektiver Blocker des ET<sub>A</sub>-R. Danach wurde eine kumulative ET-1-Dosis-Wirkungskurve mit Konzentrationen von 10<sup>-12</sup> mol/l bis 10<sup>-8</sup> mol/l unter Zugabe von BQ-123 (10<sup>-6</sup> mol/l) für die afferenten Arteriolen der WT (n=8) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=8) angefertigt.

###### Serie 3

Es wurde eine kumulative Dosis-Wirkungskurve für den selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten ALA-ET-1 mit Konzentrationen von 10<sup>-12</sup> bis 10<sup>-6</sup> mol/l für afferente Arteriolen der WT (n=7) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=6) erstellt.

###### Serie 4

Mit dem gebräuchlicherem, selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten IRL-1620 wurde eine kumulative Dosis-Wirkungskurve mit Konzentrationen von 10<sup>-12</sup> bis 10<sup>-6</sup> mol/l für afferente Arteriolen der WT (n=4) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=3) erstellt.

### Serie 5

Durch Vorbehandlung mit dem nicht NO-Synthase-Inhibitor L-NAME ( $10^{-4}$  mol/l, in der Badlösung, 10 Minuten) wurde ein potentieller NO-vermittelter dilatativer Effekt von ET-1 aufgehoben. Nach der Vorbehandlung wurde eine kumulative ET-1-Dosis-Wirkungskurve mit Konzentrationen von  $10^{-12}$  mol/l bis  $10^{-7}$  mol/l unter Zugabe von L-NAME ( $10^{-4}$  mol/l) für die afferenten Arteriolen der WT (n=6) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=7) angefertigt.

### **4.4.2 Efferente Arteriolen**

#### Serie 1

In dieser Serie wurde die kumulative ET-1-Dosis-Wirkungskurve der efferenten Arteriolen der WT (n=10) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=14) für Konzentrationen von  $10^{-12}$  bis  $10^{-7}$  mol/l ermittelt.

#### Serie 2

Zur weiteren Untersuchung der differentiellen Funktion von ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren wurde die efferente Arteriole mit BQ-123 ( $10^{-6}$  mol/l, in der Badlösung, 10 Minuten) vorbehandelt. Danach wurde eine kumulative ET-1-Dosis-Wirkungskurve mit Konzentrationen von  $10^{-12}$  mol/l bis  $10^{-8}$  mol/l unter Zugabe von BQ-123 ( $10^{-6}$  mol/l) für die efferenten Arteriolen der WT (n=6) und die efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=6) angefertigt.

#### Serie 3

Es wurde eine kumulative Dosis-Wirkungskurve für den selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten ALA-ET-1 mit Konzentrationen von  $10^{-12}$  bis  $10^{-6}$  mol/l für efferente Arteriolen der WT (n=6) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=6) erstellt.

#### Serie 4

Mit dem gebräuchlicherem, selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten IRL-1620 wurde eine kumulative Dosis-Wirkungskurve mit Konzentrationen von  $10^{-12}$  bis  $10^{-6}$  mol/l für efferente Arteriolen der WT (n=5) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=5) erstellt.

#### Serie 5

Durch Vorbehandlung mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME ( $10^{-4}$  mol/l, 10 Minuten in der Badlösung) wurde ein potentieller NO-vermittelter dilatativer Effekt von ET-1 aufgehoben. Nach der Vorbehandlung wurde eine kumulative ET-1-Dosis-Wirkungskurve mit Konzentrationen von  $10^{-12}$  mol/l bis  $10^{-7}$  mol/l unter

Zugabe von L-NAME ( $10^{-4}$  mol/l) für die efferenten Arteriolen der WT (n=8) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=10) angefertigt.

#### 4.5 Substanzen und Geräte

Die physiologische Kochsalzlösung (PSS) bestand aus 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub> und 5,5 mM Glucose. Als Badlösung war diese physiologische Kochsalzlösung mit 0,1% bovinem Serumalbumin, als Perfusionslösung mit 1% bovinem Serumalbumin, versetzt. Für die Präparation der Arteriolen aus den Nierenschnitten wurde mit 0,1% bovinem Serumalbumin versetztes *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) verwendet. Dem DMEM (1000ml) wurden 100 mg Streptomycin und 100 000 Einheiten Penicillin beigemischt. Die Kaliumlösung bestand aus 100 mM Kaliumchlorid. Alle Lösungen wurden mit Carbogen (5 % CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>) äquilibriert. Nach Zugabe von bovinem Serumalbumin wurde der pH auf 7,40 eingestellt.

##### Substanzen

*Dulbecco's modified eagle's medium*,

IRL-1620

Streptomycin, Penicillin, ET-1, BQ-123,

L-NAME

[Ala<sup>1,3,11,15</sup>]-Endothelin-1 (ALA-ET-1),

Bovines Serumalbumin (BSA)

##### Hersteller

Sigma-Aldrich, Deutschland

Alexis Biochemicals, Deutschland

SERVA Electrophoresis, Deutschland

##### Gebrauchsgegenstände

Pinzetten Nr. 5

Glasröhrchen

##### Hersteller

Dumont, Schweiz

Drummond Scientific Company, USA

##### Gerät

Perfusionssystem

Videorecorder Panasonic AG MD 830

Videorecorder DVD JVC DR-MH50S

0,3 " Chip Digitalkamera VCAM 110-1

##### Hersteller

Luigs & Neumann, Deutschland

Panasonic, Japan

Victor Company of Japan, Japan

Phytec Technology Holding AG,  
Deutschland

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Invertiertes Mikroskop AXIOVERT 100	Carl Zeiss, Deutschland
Thermoregulierte Kammer 1,5 ml	VETEC, Deutschland
<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
Software von Dr. H. Siegmund	Institut für Neurophysiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland
SAS System für Statistik	SAS Institute Inc., USA
Frame grabber card pci Grabber-4plus	Phytec Technology Holding AG, Deutschland
SPSS	SPSS Inc., an IBM Company Headquarters, 233 S. Wacker Drive, Chicago, Illinois 60606

#### 4.6 Statistik

In allen Serien wurde der luminale Durchmesser der Arteriolen gemessen. 5 Werte der letzten 10 Sekunden einer jeden Kontroll- und Behandlungsperiode wurden für die statistische Analyse des *steady state* 's gemittelt. Der Brunner-Test (Brunner & Langer 1999) für die nicht-parametrische Analyse longitudinaler Daten wurde zum Vergleich der dosis- oder zeitabhängigen Änderungen der Durchmesser (ANOVA) sowie zum Vergleich der Verläufe der Durchmesser zwischen zwei Gruppen verwendet. Bei Signifikanz des Brunner-Tests wurde der Mann-Whitney-U-Test (post-hoc) durchgeführt. Der Mann-Whitney-U-Test diente auch dem Vergleich der Ausgangsdurchmesser der verschiedenen Gruppen. Die Daten sind als Mittelwerte mit den Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) dargestellt. Für alle statistischen Tests ist die Irrtumswahrscheinlichkeit mit 5% festgelegt ( $p=0,05$ ).

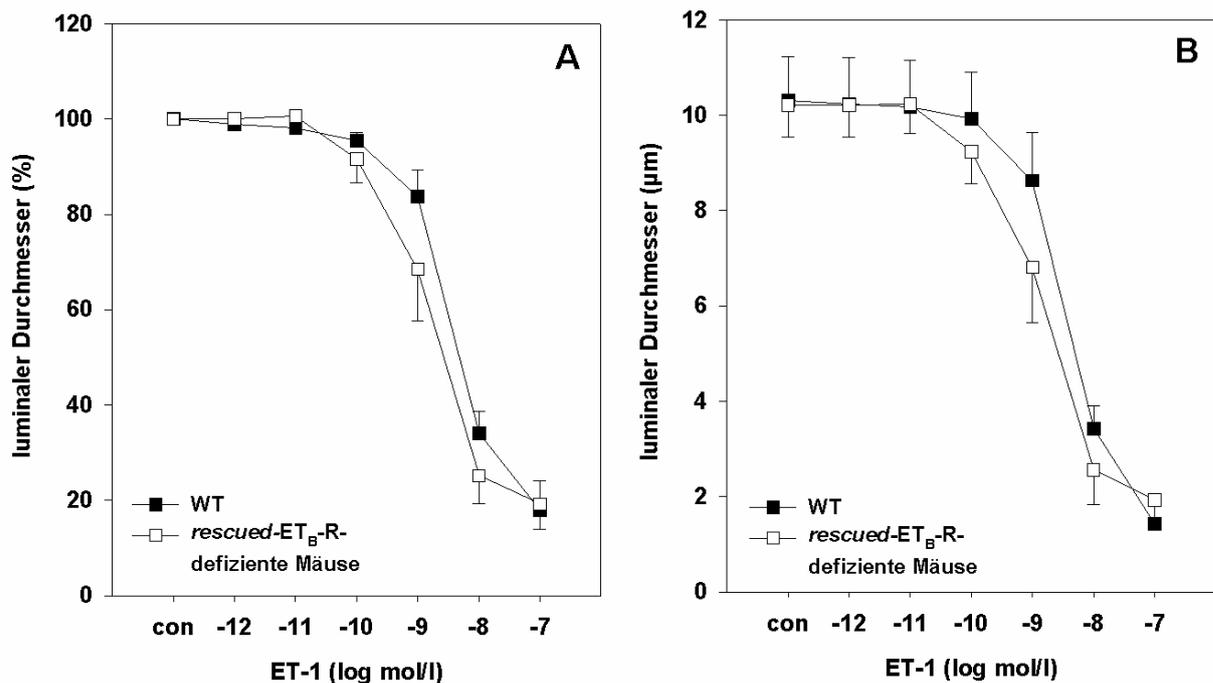
Die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ wurden beachtet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kontraktionsmessungen an afferenten Arteriolen

#### 5.1.1 ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurven

ET-1 (in Konzentrationen von  $10^{-12}$  bis  $10^{-7}$  mol/l) verringerte die luminalen Durchmesser der afferenten Arteriolen dosisabhängig. Bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l betrug der Durchmesser der afferenten Arteriolen der WT (n=10)  $17,9 \pm 6,21\%$  und der Durchmesser der afferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=10)  $19,26 \pm 5,26\%$  des Ausgangswertes (Abbildung 3 A und B).



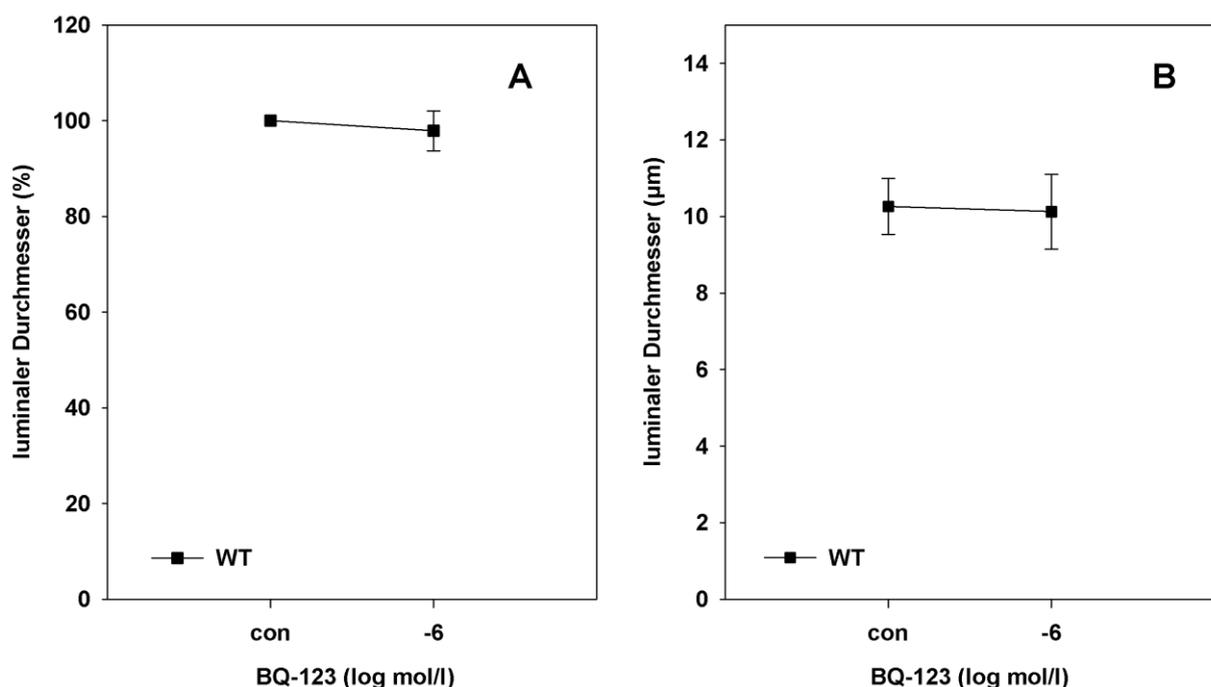
**Abbildung 3:** ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) der afferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, n=10) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=10). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser.

Hauptbefunde: Kumulative ET-1-Applikation verringerte die luminalen Durchmesser dosisabhängig und ähnlich stark in afferenten Arteriolen der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse.

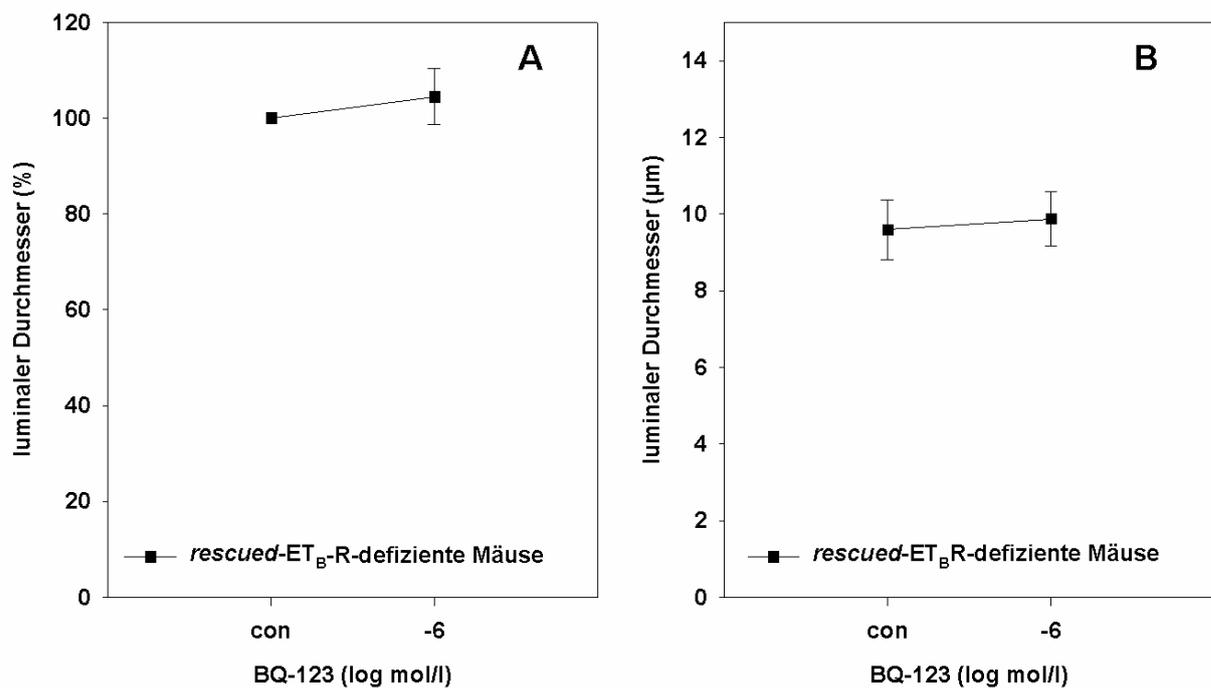
### 5.1.2 Einfluss der ET<sub>A</sub>-R-Inhibition auf die ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurve

Die selektive Inhibition des ET<sub>A</sub>-R mit BQ-123 ermöglichte es, die Funktion des ET<sub>B</sub>-R bei der ET-1 induzierten vaskulären Antwort zu bewerten.

Vorbehandlung mit dem selektiven ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten BQ-123 ( $10^{-6}$  mol/l, 10 min in der Badlösung) änderte den Ausgangsdurchmesser der afferenten Arteriolen nicht signifikant. Er betrug bei den WT  $10,26 \pm 0,73$   $\mu$ m ohne und  $10,12 \pm 0,97$   $\mu$ m mit BQ-123-Vorbehandlung und bei den afferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse  $9,59 \pm 0,78$   $\mu$ m ohne und  $9,87 \pm 0,71$   $\mu$ m mit BQ-123-Vorbehandlung (Abbildung 4 A und B und 5 A und B).

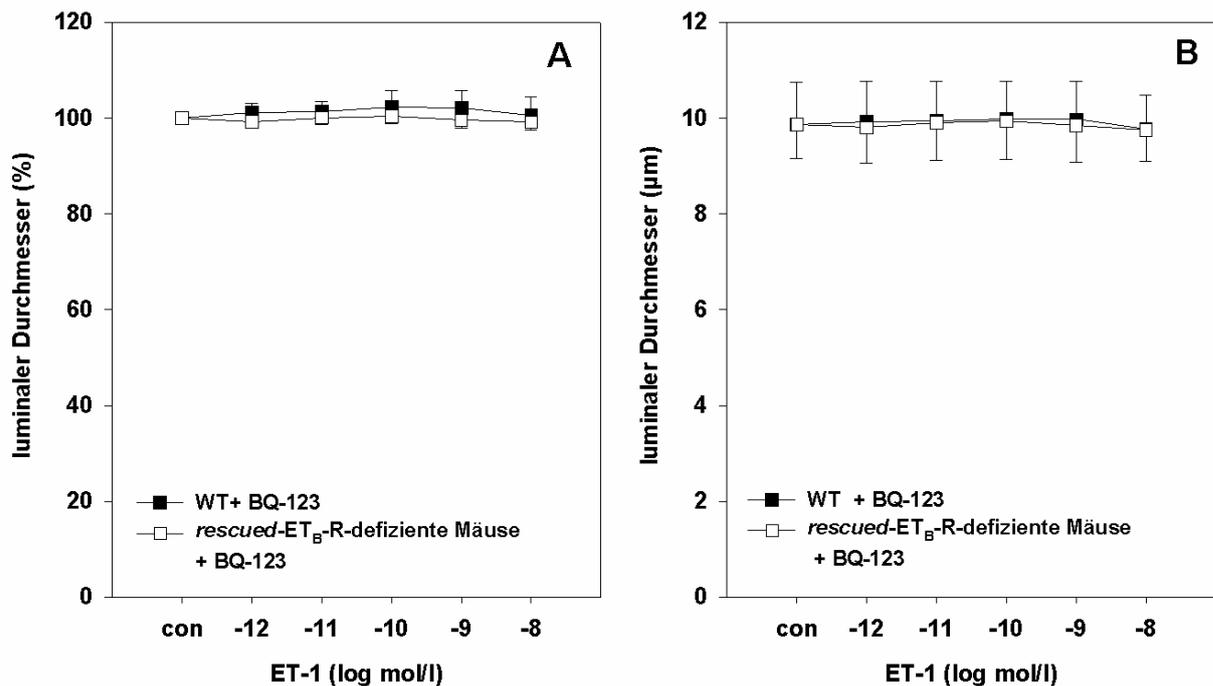


**Abbildung 4:** BQ-123 Wirkung in afferenten Arteriolen der Wildtypen (n=8). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con= Ausgangsdurchmesser.



**Abbildung 5:** BQ-123-Wirkung in afferenten Arteriolen der *rescued-ET<sub>B</sub>R*-defizienten Mäuse (n=8). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con= Ausgangsdurchmesser.

Unter selektiver ET<sub>A</sub>-R-Blockade zeigte sich keine signifikante Veränderung der luminalen Ausgangsdurchmesser bei kumulativer ET-1-Applikation (10<sup>-12</sup>-10<sup>-8</sup> mol/l). Bei einer ET-1-Konzentration von 10<sup>-8</sup> mol/l betrug der Durchmesser der afferenten Arteriolen der WT (n=8) 100,58 ± 3,84% und der *rescued-ET<sub>B</sub>R*-defizienten Mäuse (n=8) 99,13 ± 1,53% des Ausgangsdurchmessers. Die Kurven der WT und der *rescued-ET<sub>B</sub>R*-defizienten Mäuse unterscheiden sich nicht signifikant (Abbildung 6 A und B).



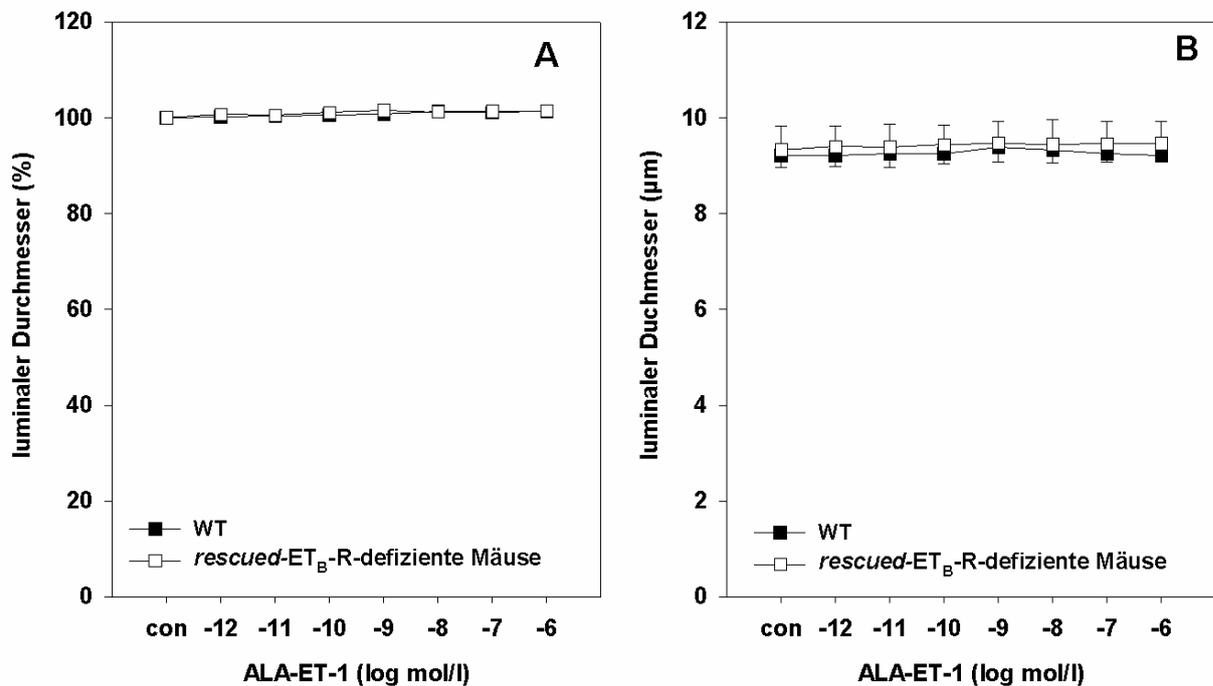
**Abbildung 6:** ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-8}$  mol/l) in afferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, n=8) und der *rescuend*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=8) während selektiver ET<sub>A</sub>-R-Blockade mit BQ-123. A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser.

Hauptbefunde: Selektive ET<sub>A</sub>-R-Blockade veränderte den basalen Ausgangsdurchmesser in afferenten Arteriolen der WT und der *rescuend*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse nicht signifikant. Selektive ET<sub>A</sub>-R-Blockade hebt den vasokonstriktischen ET-1-Effekt in afferenten Arteriolen der WT und der *rescuend*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse auf.

### 5.1.3 Wirkung der ET<sub>B</sub>-R-Agonisten ALA-ET-1 und IRL-1620

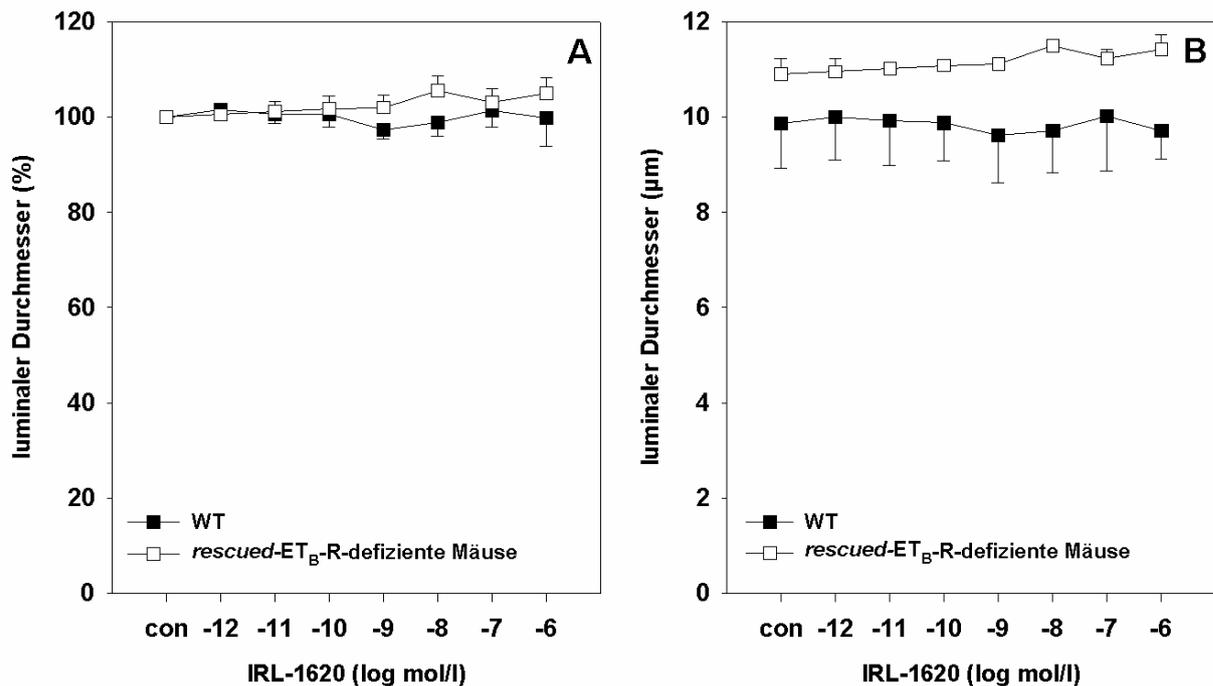
Zur weiteren Untersuchung der ET<sub>B</sub>-R-vermittelten ET-1-Wirkung erstellten wir kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven für den ET<sub>B</sub>-R-Agonisten ALA-ET-1 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  mol/l). Die Ausgangsdurchmesser der afferenten Arteriolen der WT und der *rescuend*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse änderten sich unter kumulativer ALA-ET-1-Applikation nicht signifikant: Bei einer ALA-ET-1-Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l betrug der Durchmesser der WT (n=7)  $101,35 \pm 0,84\%$  und der Durchmesser der *rescuend*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen (n=6)  $101,41 \pm 0,57\%$  des

Ausgangsdurchmessers. Die Kurven der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse unterscheiden sich nicht signifikant (Abbildung 7 A und B).



**Abbildung 7:** ALA-ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  mol/l) in afferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, n=7) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=6). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser.

Zur weiteren Untersuchung der ET<sub>B</sub>-R-vermittelten ET-1-Wirkung erstellten wir kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven für den selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten IRL-1620 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  mol/l). Die Ausgangsdurchmesser der afferenten Arteriolen der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse änderten sich unter kumulativer IRL-1620-Applikation nicht signifikant: Bei einer IRL-1620 Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l betrug der Durchmesser der WT (n=4)  $99,79 \pm 5,99\%$  und der Durchmesser der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=3)  $104,97 \pm 3,33\%$  des Ausgangsdurchmessers. Die Kurven der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse unterscheiden sich nicht signifikant (Abbildung 8 A und B).

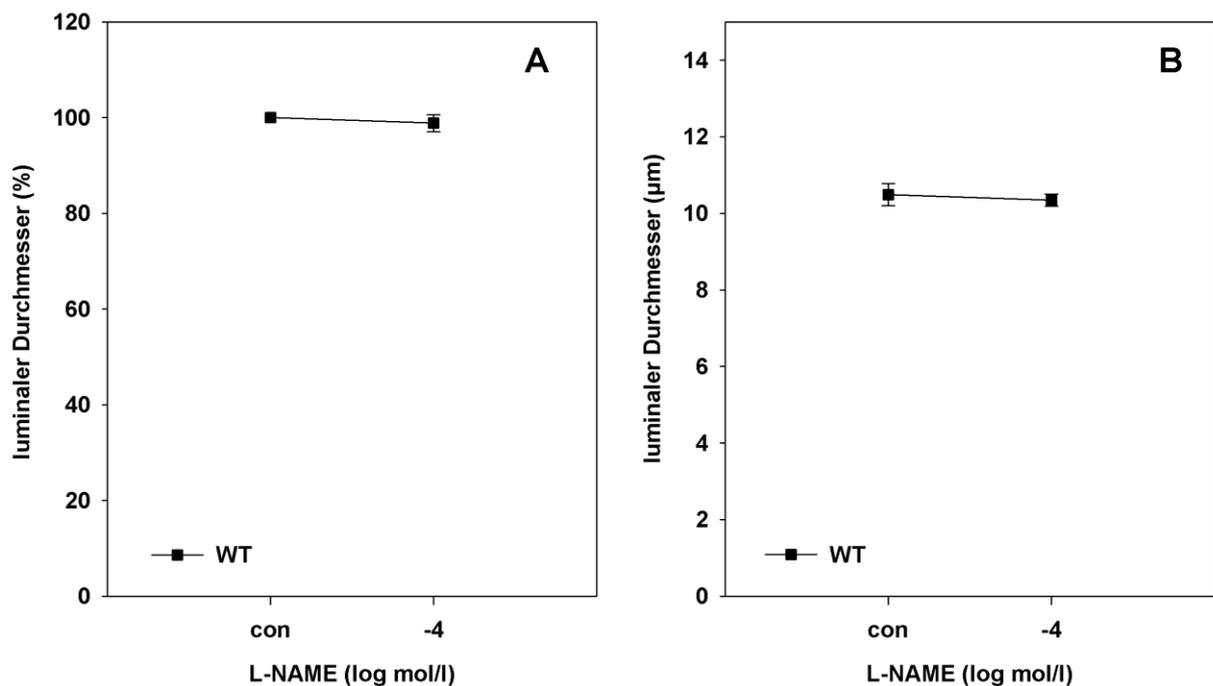


**Abbildung 8:** IRL-1620-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  mol/l) in afferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, n=4) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=3). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser.

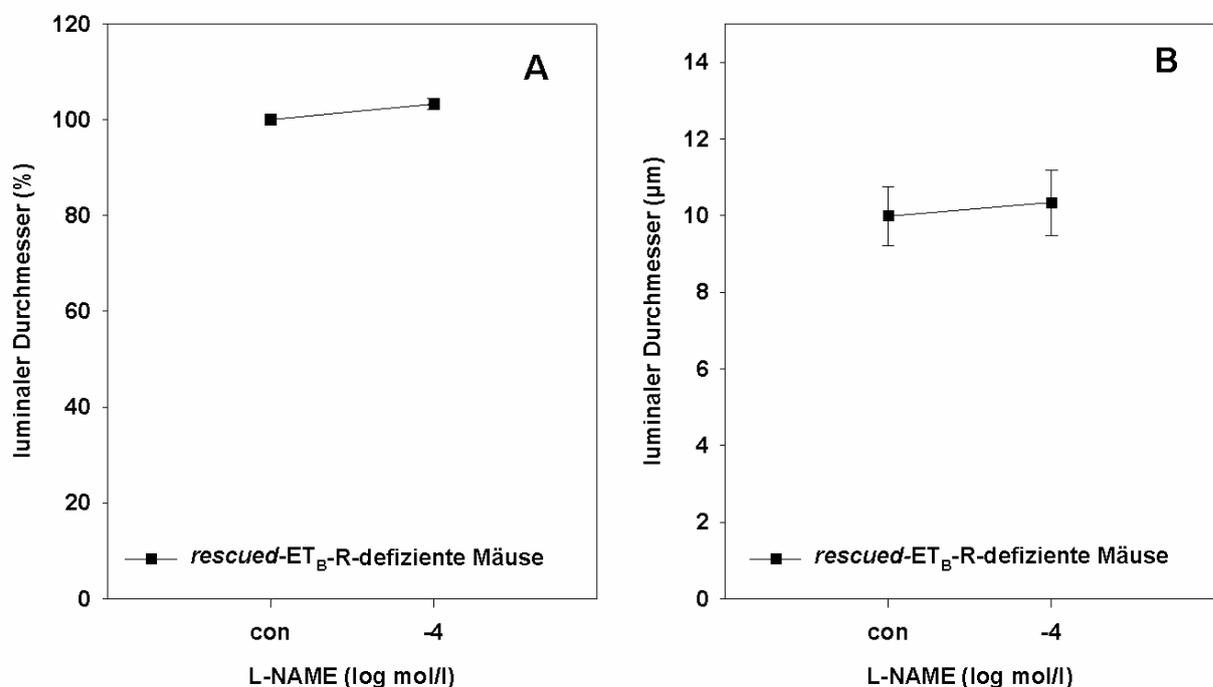
Hauptbefunde: Kumulative ET<sub>B</sub>-R-Stimulation führte zu keiner Änderung der luminalen Durchmesser der afferenten Arteriolen der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse.

#### 5.1.4 Einfluss der NOS-Inhibition auf die ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurve

Um den Einfluss des NO-Systems auf die ET-1 vermittelte vaskuläre Antwort zu ermitteln, blockierten wir die NOS mit L-NAME. Eine Vorbehandlung mit L-NAME ( $10^{-4}$  mol/l, 10 min in der Badlösung) veränderte die Lumina nicht signifikant. Vor L-NAME-Behandlung betrug der Ausgangsdurchmesser der WT  $10,49 \pm 0,29$  µm und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse  $9,99 \pm 0,77$  µm, nach L-NAME-Behandlung betrug der Ausgangsdurchmesser der WT  $10,34 \pm 0,15$  µm und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse  $10,32 \pm 0,84$  µm (Abbildung 9 A und B und 10 A und B).

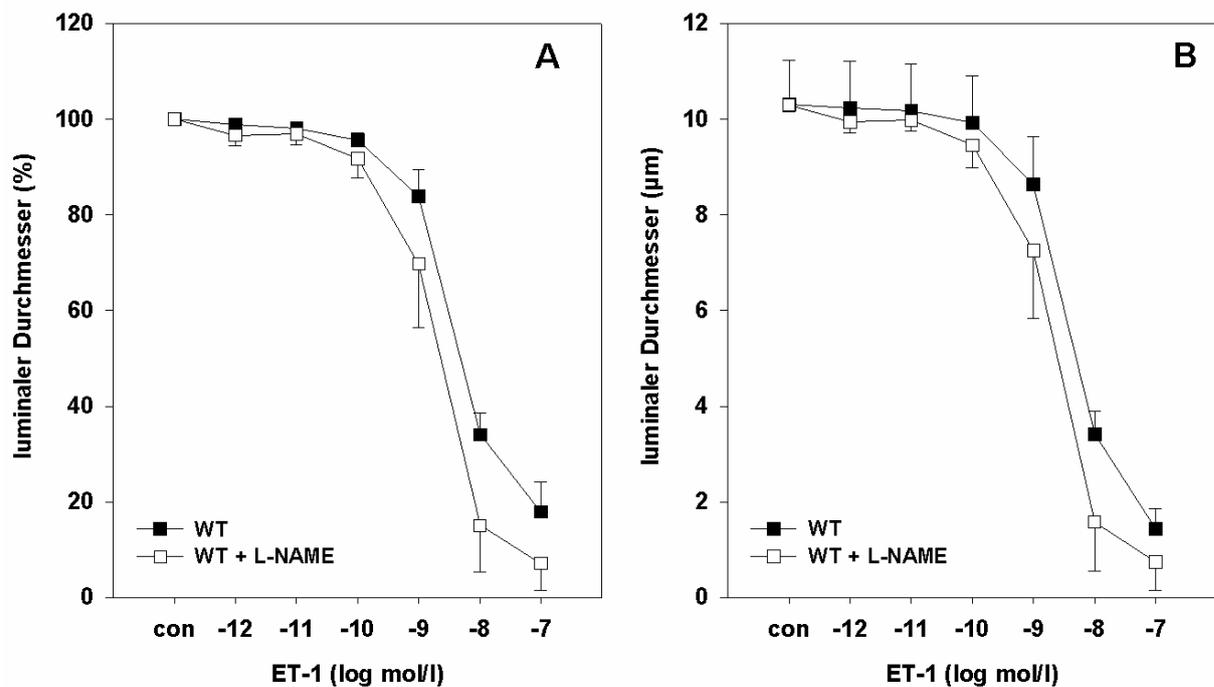


**Abbildung 9:** L-NAME Wirkung in afferenten Arteriolen der WT (n=6). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con= Ausgangsdurchmesser.



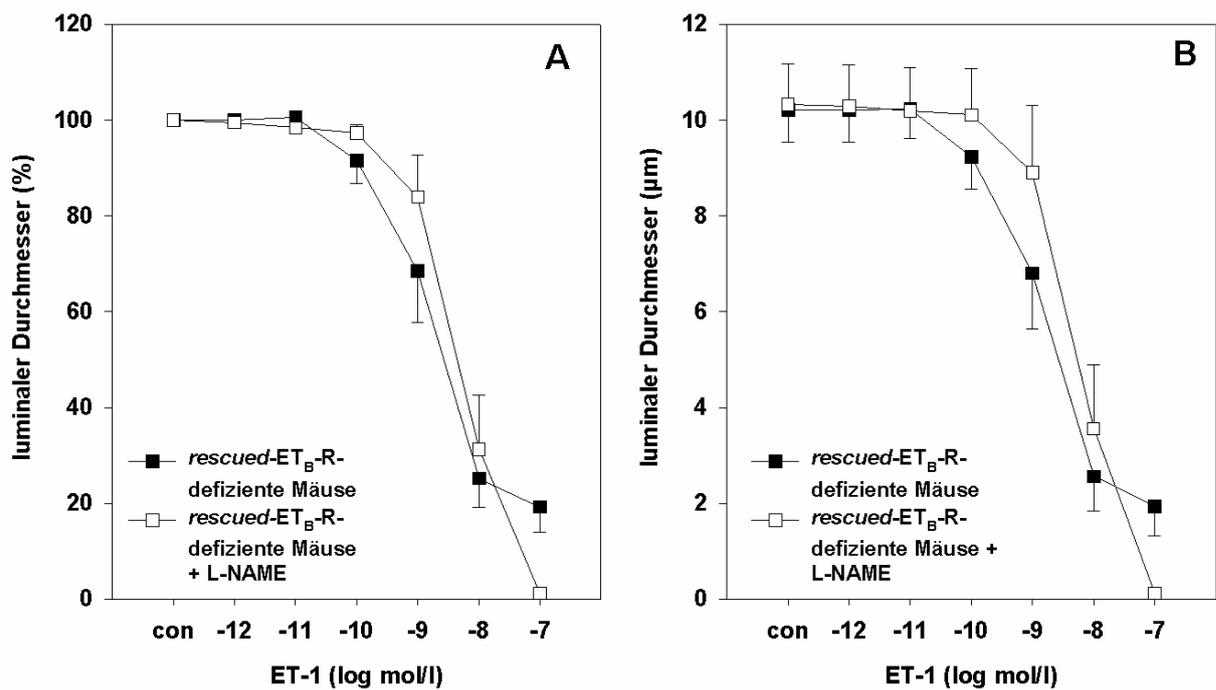
**Abbildung 10:** L-NAME Wirkung in afferenten Arteriolen der *rescued-ET<sub>B</sub>-R-defizienten* Mäuse (n=7). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con= Ausgangsdurchmesser.

NOS-Blockade hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurve der WT. Der luminale Durchmesser der afferenten Arteriolen mit L-NAME-Behandlung (n=6) betrug bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l  $7,13 \pm 5,72\%$  und der WT ohne L-NAME-Behandlung (n=10)  $17,9 \pm 6,21\%$  des Ausgangswertes (Abbildung 11 A und B).



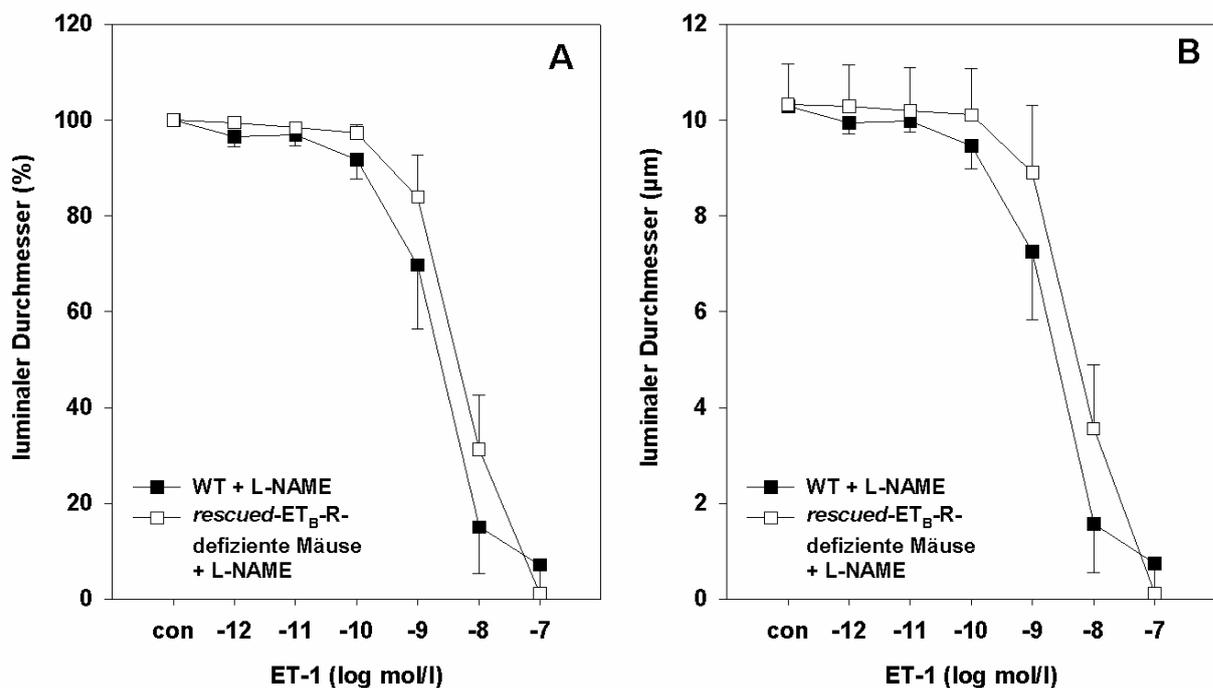
**Abbildung 11:** L-NAME Effekt auf die ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) in afferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, ohne L-NAME (n=10), mit L-NAME (n=6)). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser.

Die ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurve der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse wurde durch NOS-Blockade nicht signifikant verändert. Die afferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse kontrahierten auch während NOS-Blockade dosisabhängig auf ET-1-Applikation. Der luminale Durchmesser betrug bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l unter NOS-Blockade (n=7)  $1,17 \pm 0,72\%$  und ohne NOS-Blockade (n=10)  $19,26 \pm 5,26\%$  des Ausgangswertes (Abbildung 12 A und B).



**Abbildung 12:** L-NAME-Effekt auf die ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) in afferenten Arteriolen der *rescuend*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (ohne L-NAME (n=10), mit L-NAME (n=7)). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser.

Die afferenten Arteriolen der WT (n=6) und der *rescuend*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=7) zeigten unter NOS-Blockade ähnliche Kontraktionen auf kumulative ET-1-Applikation (Abbildung 13 A und B).



**Abbildung 13:** L-NAME Effekt auf die ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) in afferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, n=6) und in afferenten Arteriolen der *rescued-ET<sub>B</sub>-R*-defizienten Mäuse (n=7) A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser.

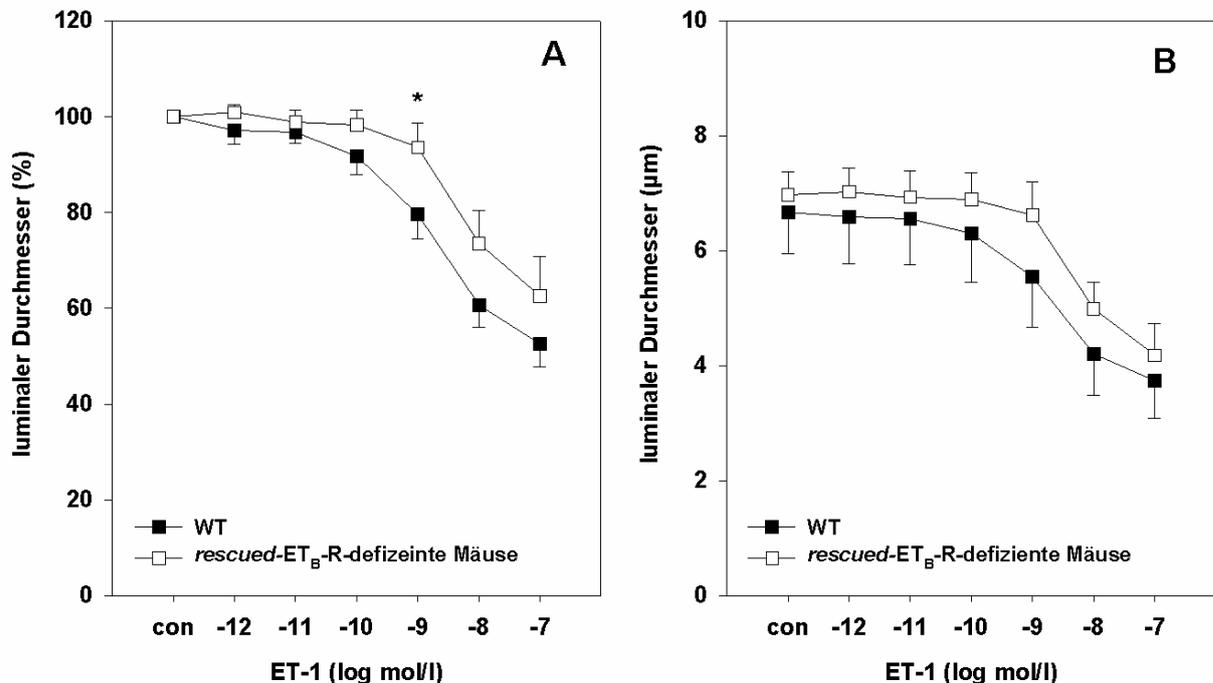
Hauptbefunde: Der basale Durchmesser änderte sich bei L-NAME-Applikation nicht. NOS-Blockade änderte die arterioläre Antwort der afferenten Arteriolen der WT und der *rescued-ET<sub>B</sub>-R*-defizienten Mäuse auf ET-1-Applikation nicht signifikant.

## 5.2 Kontraktionsmessungen an efferenten Arteriolen

### 5.2.1 ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurven

ET-1 (in Konzentrationen von  $10^{-12}$  bis  $10^{-7}$  mol/l) verringerte den luminalen Durchmesser der efferenten Arteriolen dosisabhängig. Bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l war der Durchmesser der efferenten Arteriolen der WT (n=10) auf  $52,51 \pm 4,79\%$  und der *rescued-ET<sub>B</sub>-R*-defizienten Mäuse (n=14) auf  $62,54 \pm 8,21\%$  des Ausgangswertes reduziert. Die ET-1 vermittelte Kontraktion war in efferenten Arteriolen der WT signifikant stärker als in efferenten Arteriolen der *rescued-ET<sub>B</sub>-R*-defizienten Mäuse. Bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l

betrug der luminale Durchmesser der WT  $93,58 \pm 5,14\%$  und der Durchmesser der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse  $79,71 \pm 5,14\%$  des Ausgangsdurchmessers (Mann-Whitney-U-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 14 A und B).



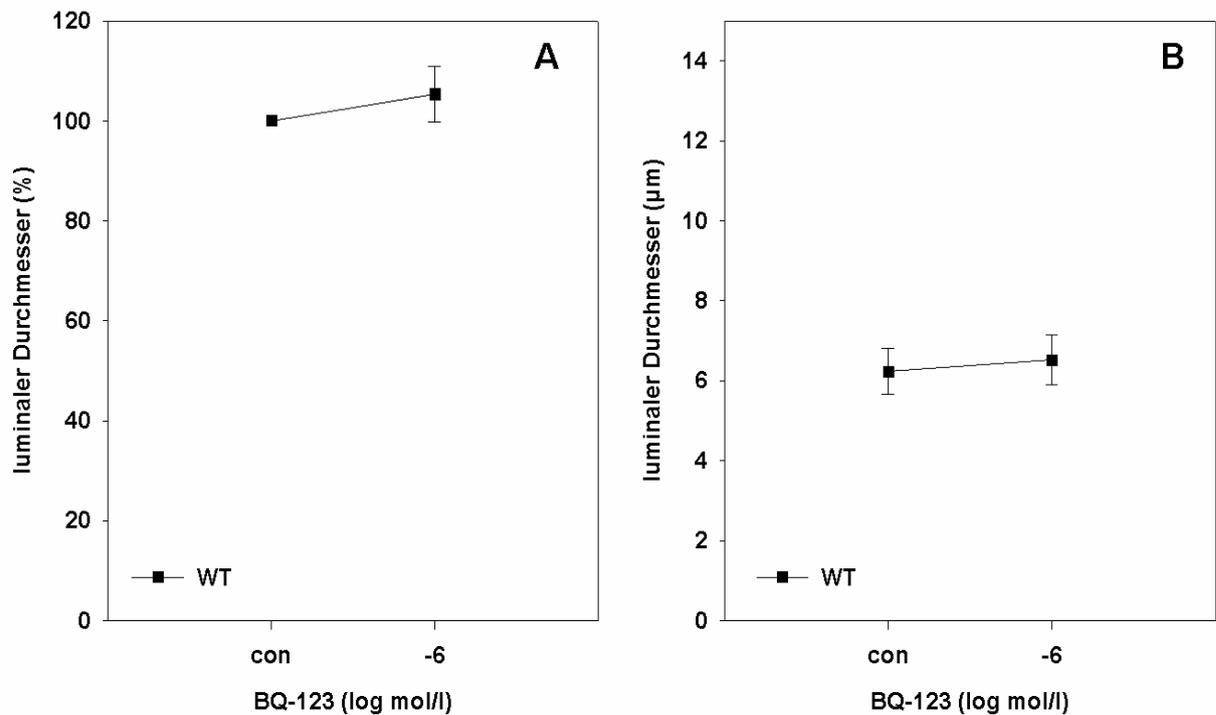
**Abbildung 14:** ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) in efferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, n=10) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=14). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser, \*  $p < 0,05$ .

Hauptbefunde: Kumulative ET-1-Applikation führte zu einer konzentrationsabhängigen Konstriktion in efferenten Arteriolen der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse. Diese Konstriktion war in den efferenten Arteriolen der WT signifikant stärker als in den efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse.

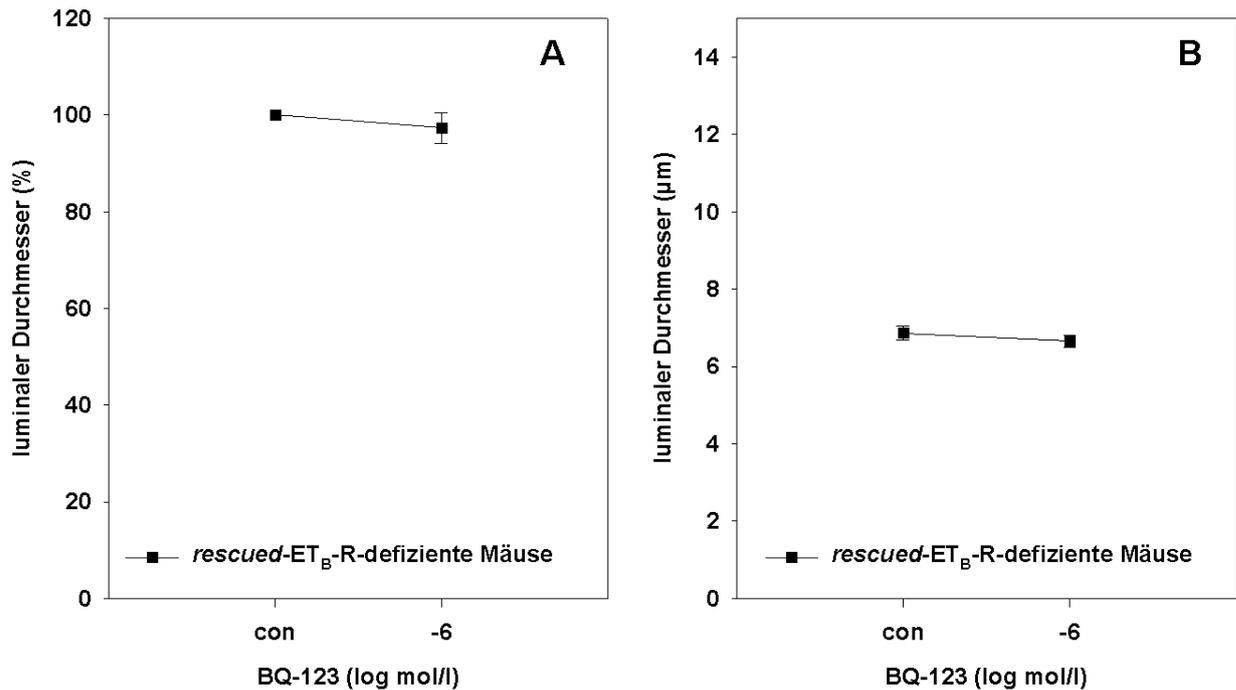
### 5.2.2 Einfluss der ET<sub>A</sub>-R-Inhibition auf die ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurve

Die selektive Inhibition des ET<sub>A</sub>-R mit BQ-123 ermöglichte es, die Funktion des ET<sub>B</sub>-R bei der ET-1 induzierten vaskulären Antwort zu betrachten. Vorbehandlung mit dem selektiven ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten BQ-123 ( $10^{-6}$  mol/l, 10 min in der Badlösung) änderte den Ausgangsdurchmesser der efferenten Arteriolen nicht signifikant. Er

betrug bei den WT  $6,23 \pm 0,58 \mu\text{m}$  ohne und  $6,52 \pm 0,63 \mu\text{m}$  mit BQ-123-Vorbehandlung und bei den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse  $6,86 \pm 0,18 \mu\text{m}$  ohne und  $6,66 \pm 0,16 \mu\text{m}$  mit BQ-123 Vorbehandlung (Abbildung 15 A und B und 16A und B).



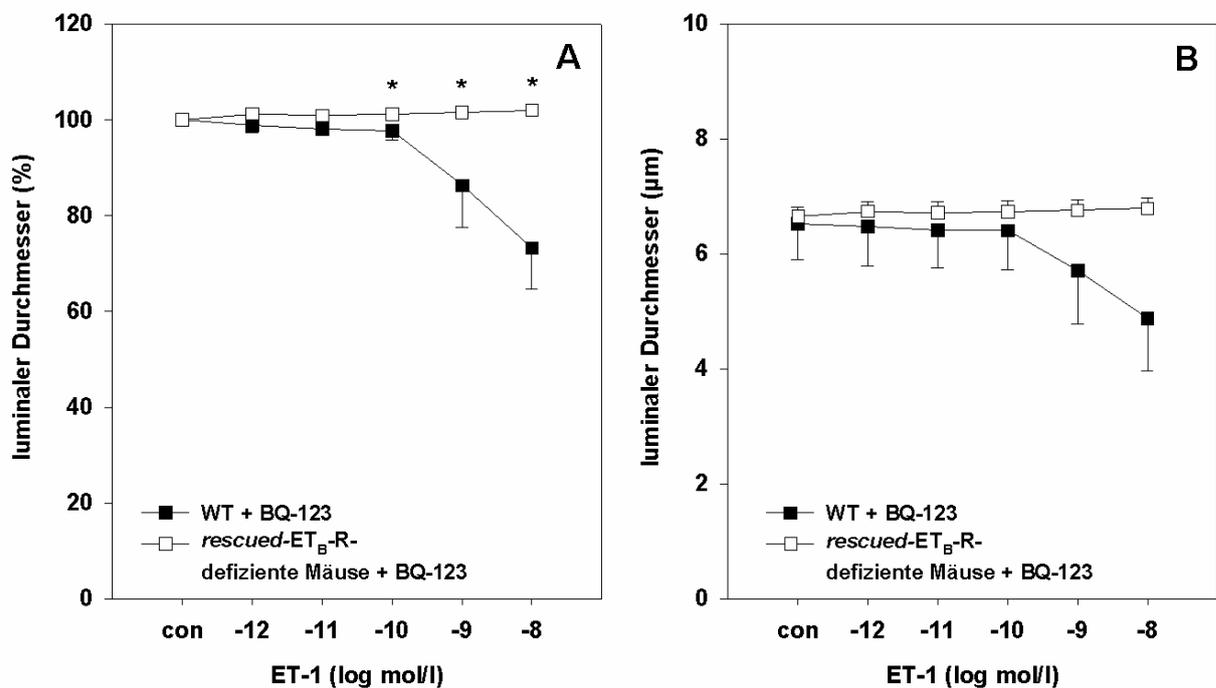
**Abbildung 15:** BQ-123 Wirkung in efferenten Arteriolen der Wildtypen (n=6). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con= Ausgangsdurchmesser.



**Abbildung 16:** BQ-123 Wirkung in efferenten Arteriolen der *rescued-ET<sub>B</sub>-R-defizienten* Mäuse (n=6). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con= Ausgangsdurchmesser.

Unter selektiver ET<sub>A</sub>-R-Blockade zeigten nur die efferenten Arteriolen der WT (n=6) eine signifikante Kontraktion auf ET-1 (Abbildung 17). Der luminaler Durchmesser betrug  $73,23 \pm 8,52\%$  des Ausgangsdurchmessers bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l. Die efferenten Arteriolen der *rescued-ET<sub>B</sub>-R-defizienten* Mäuse (n=6) zeigten während ET<sub>A</sub>-R-Blockade keine signifikante Reaktion auf kumulative ET-1-Applikation. Der luminaler Durchmesser betrug bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l  $101,98 \pm 0,62\%$  des Ausgangsdurchmessers. Beide Kurven unterscheiden sich signifikant. Bei einer ET-1-Dosis von  $10^{-10}$  mol/l (luminaler Durchmesser der WT  $97,7 \pm 1,9\%$  und der *rescued-ET<sub>B</sub>-R-defizienten* Mäuse  $101,12 \pm 0,48\%$  der jeweiligen Ausgangsdurchmesser), bei einer ET-1-Dosis von  $10^{-9}$  mol/l (luminaler Durchmesser der WT  $86,29 \pm 8,77\%$  und der *rescued-ET<sub>B</sub>-R-defizienten* Mäuse  $101,56 \pm 0,45\%$  der jeweiligen Ausgangsdurchmesser) und bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l (luminaler Durchmesser der WT  $73,23 \pm 8,5\%$  und der *rescued-ET<sub>B</sub>-R-defizienten* Mäuse

101,98 ± 0,62% der jeweiligen Ausgangsdurchmesser) unterscheiden sich die Kurven signifikant (Mann-Whitney-U-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 17 A und B).



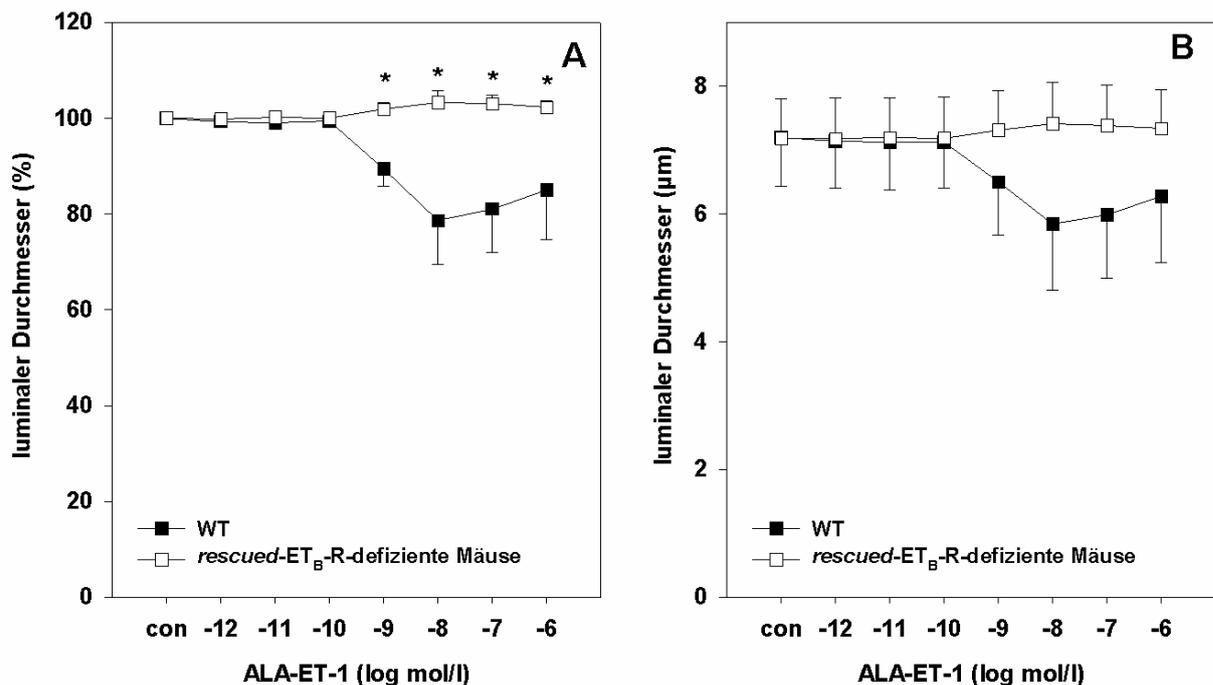
**Abbildung 17:** ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-8}$  mol/l) in efferenten Arteriolen der Wildtypen (WT,  $n=6$ ) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse ( $n=6$ ) während selektiver ET<sub>A</sub>-R-Inhibition mit BQ-123. A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser, \* $p < 0,05$ .

Hauptbefunde: Selektive ET<sub>A</sub>-R-Blockade veränderte den basal arteriolen Durchmesser der efferenten Arteriolen nicht. Während selektiver ET<sub>A</sub>-R-Blockade war die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in den efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse vollständig aufgehoben und in den efferenten Arteriolen der WT reduziert.

### 5.2.3 Wirkung der ET<sub>B</sub>-R-Agonisten ALA-ET-1 und IRL-1620

Zur weiteren Untersuchung der ET<sub>B</sub>-R-vermittelten ET-1-Wirkung erstellten wir kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven für den spezifischen ET<sub>B</sub>-R-Agonisten ALA-ET-1 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  mol/l). Efferente Arteriolen der WT ( $n=6$ ) kontrahierten auf ALA-ET-1-Applikation. Die maximale Kontraktion zeigte sich bei einer

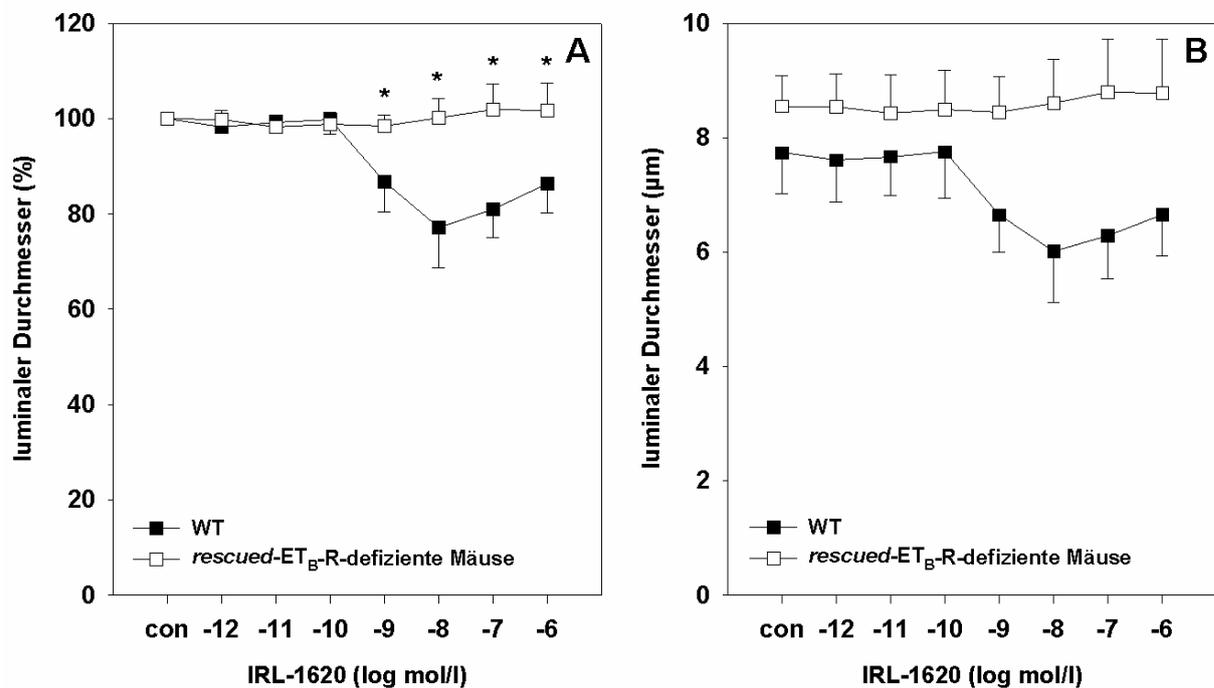
ALA-ET-1-Dosis von  $10^{-8}$  mol/l. Bei dieser Dosis betrug der lumenale Durchmesser der WT  $78,62 \pm 9,24\%$  des Ausgangsdurchmessers. Die efferenten Arteriolen der *rescued-ET<sub>B</sub>-R*-defizienten Mäuse (n=6) reagierten nicht signifikant auf kumulative ALA-ET-1-Applikation. Hier betrug der lumenale Durchmesser bei einer ALA-ET-1-Dosis von  $10^{-6}$  mol/l  $102,24 \pm 1,33\%$  des Ausgangsdurchmessers und unterschied sich nicht signifikant vom Ausgangswert (Abbildung 18 A und B).



**Abbildung 18:** ALA-ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  mol/l) in efferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, n=6) und der *rescued-ET<sub>B</sub>-R*-defizienten Mäuse (n=6). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser, \* p<0,05.

Zur weiteren Untersuchung der ET<sub>B</sub>-R vermittelten ET-1-Wirkung erstellten wir kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven für den selektiven ET<sub>B</sub>-R-Agonisten IRL-1620 ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  mol/l). Efferente Arteriolen der WT (n=5) kontrahierten auf IRL-1620-Applikation. Die maximale Kontraktion zeigte sich bei einer IRL-1620-Dosis von  $10^{-8}$  mol/l. Bei dieser Dosis betrug der lumenale Durchmesser der WT  $77,13 \pm 8,34\%$  des Ausgangsdurchmessers. Die efferenten Arteriolen der *rescued-ET<sub>B</sub>-R*-defizienten Mäuse (n=5) reagierten nicht signifikant auf kumulative IRL-1620-Applikation. Hier betrug der lumenale Durchmesser bei einer

IRL-1620-Dosis von  $10^{-6}$  mol/l  $101,8 \pm 5,7\%$  des Ausgangsdurchmessers und unterschied sich nicht signifikant vom Ausgangswert (Abbildung 19 A und B).

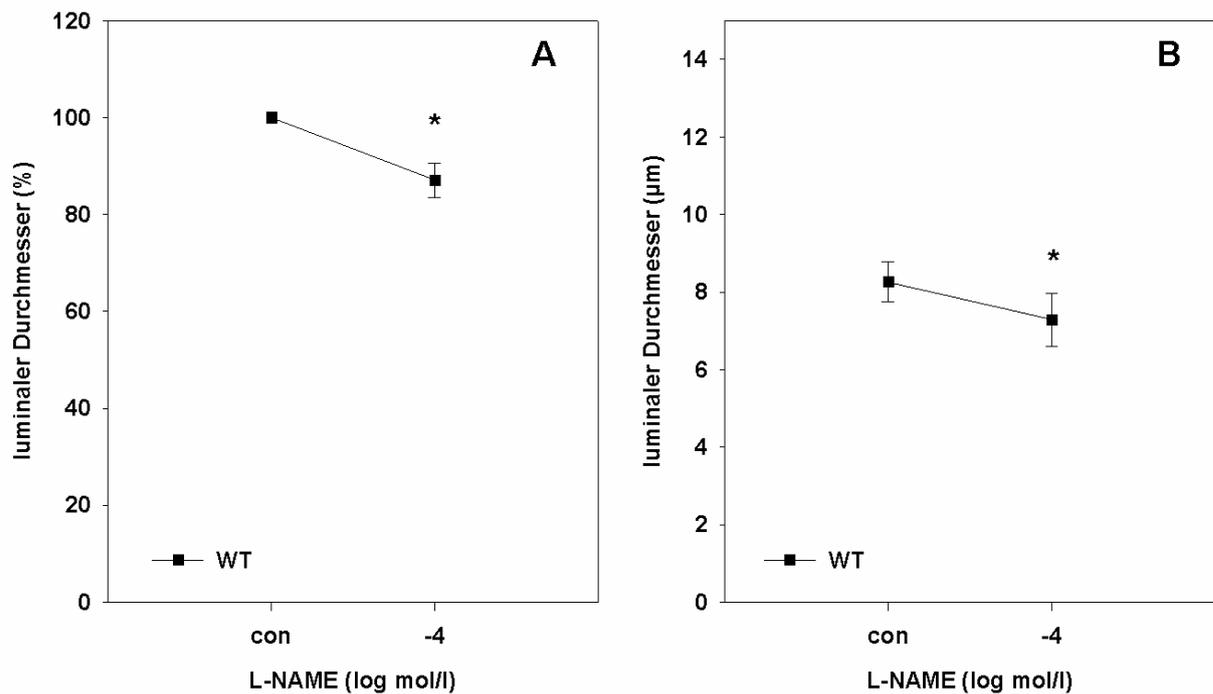


**Abbildung 19:** IRL-1620-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  mol/l) in efferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, n=5) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=5). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser, \* p<0,05.

Hauptbefunde: Kumulative ET<sub>B</sub>-R-Aktivierung führte zu einer Vasokonstriktion in efferenten Arteriolen der WT. Efferente Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse reagierten nicht signifikant auf kumulative ET<sub>B</sub>-R-Aktivierung.

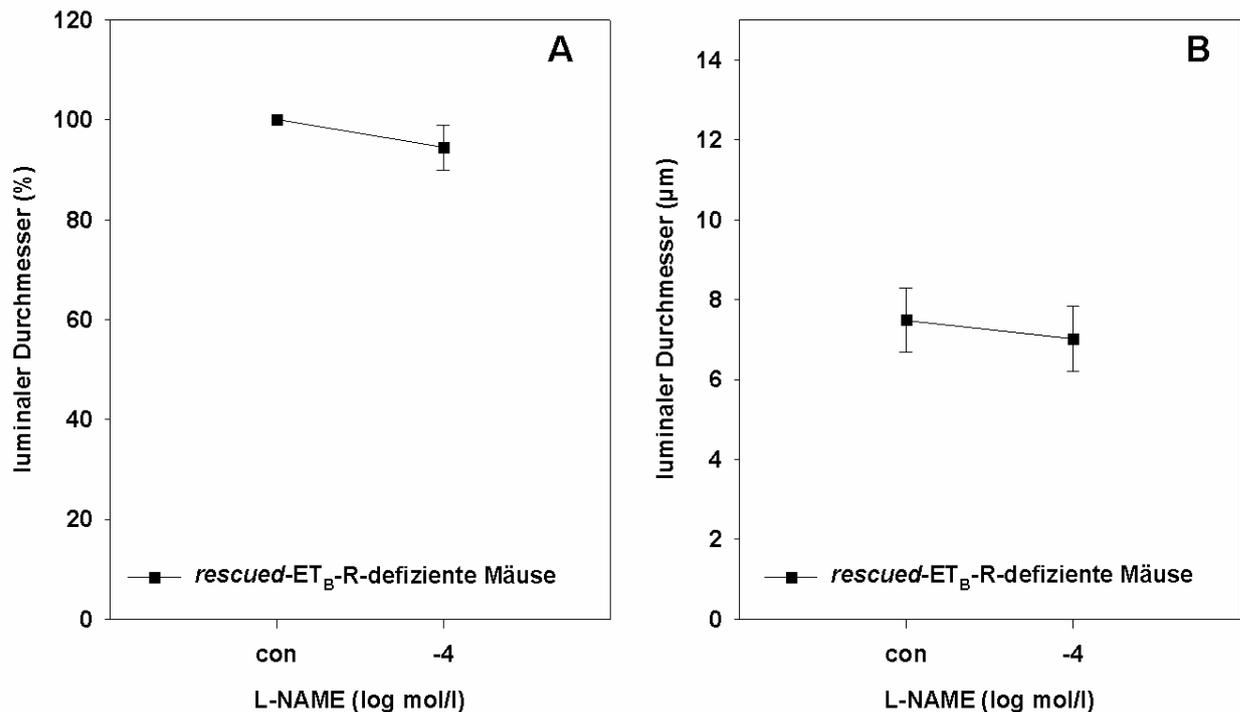
#### 5.2.4 Einfluss der NOS-Inhibition auf die ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurve

Um den Einfluss des NO-Systems auf die ET-1 vermittelte vasculäre Antwort zu ermitteln, blockierten wir die NOS mit L-NAME. In den efferenten Arteriolen der WT führte eine Vorbehandlung mit L-NAME ( $10^{-4}$  mol/l, 10 min in der Badlösung) zu einer signifikanten Reduktion des luminalen Durchmessers von  $8,26 \pm 0,5$  µm auf  $7,23 \pm 0,69$  µm (Mann-Whitney-U-Test, p<0,05) (Abbildung 20 A und B).



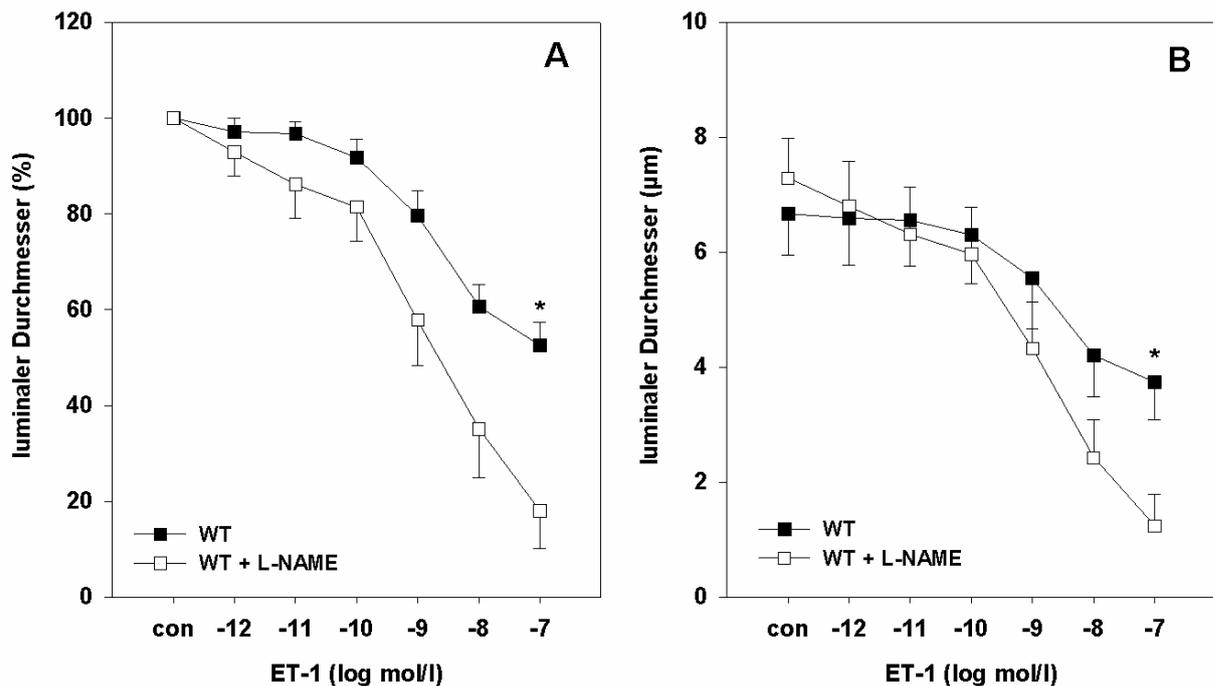
**Abbildung 20:** L-NAME Wirkung in efferenten Arteriolen der WT (n=8). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con= Ausgangsdurchmesser, \* p<0,05.

L-NAME-Vorbehandlung der efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten-Mäuse (10<sup>-4</sup> mol/l, 10 min in der Badlösung) veränderte den luminalen Durchmesser nicht signifikant: Er betrug 7,48 ± 0,82 µm vor und 7,02±0,82 µm nach L-NAME-Behandlung (Abbildung 21 A und B).



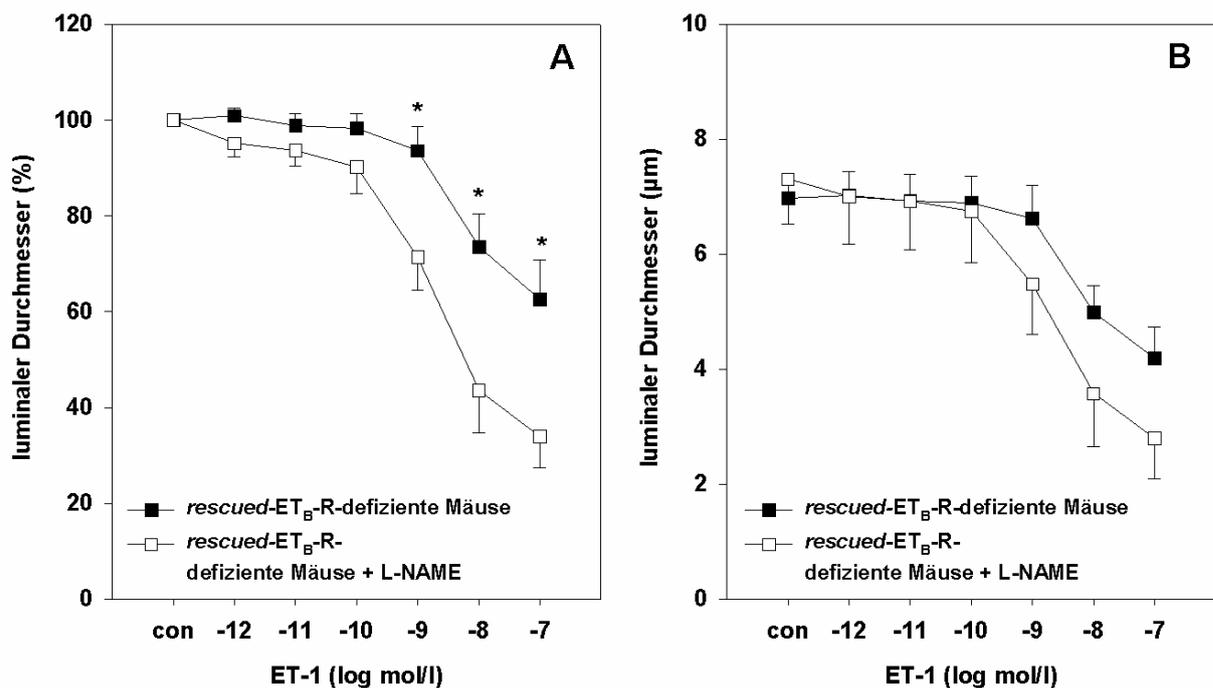
**Abbildung 21:** L-NAME Wirkung in efferenten Arteriolen der *rescued-ET<sub>B</sub>-R-defizienten* Mäuse (n=10). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con= Ausgangsdurchmesser.

NOS-Blockade führte zu einer Verstärkung der vasokonstriktorisches ET-1-Antwort in den efferenten Arteriolen der WT. Der luminaler Durchmesser der efferenten Arteriolen der WT unter L-NAME-Behandlung (n=8) betrug bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l  $18,01 \pm 7,88\%$  des Ausgangsdurchmessers und der efferenten Arteriolen ohne L-NAME-Behandlung (n=10)  $52,51 \pm 4,79\%$  des Ausgangsdurchmessers. Beide Kurven unterscheiden sich signifikant (Mann-Whitney-U-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 22 A und B).



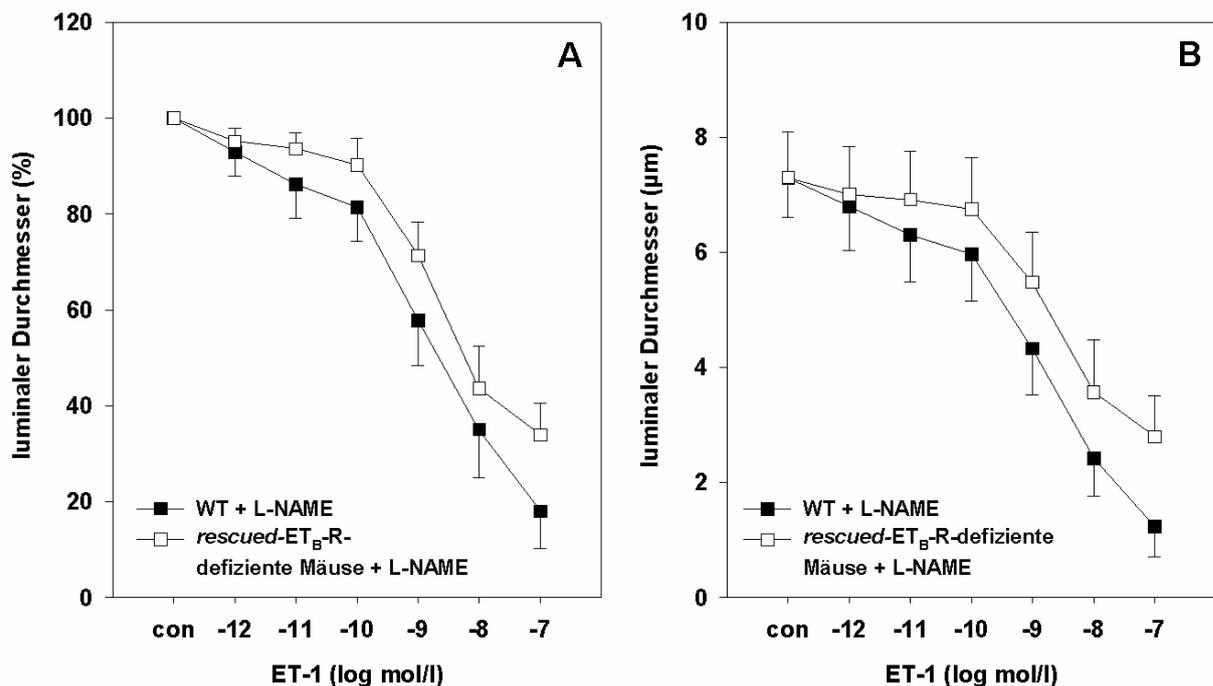
**Abbildung 22:** L-NAME-Effekt auf die ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) in efferenten Arteriolen der Wildtypen (WT, ohne L-NAME (n=10), mit L-NAME (n=8)). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser, \*  $p < 0,05$ .

NOS-Inhibition verstärkte die ET-1 induzierte Vasokonstriktion in den efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse. Der luminaler Durchmesser der efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse unter L-NAME-Behandlung (n=10) betrug bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l  $90,23 \pm 5,59\%$ , bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l  $43,57 \pm 8,93\%$  und bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l  $33,96 \pm 6,52\%$  des Ausgangsdurchmessers. Im Vergleich dazu: Die luminalen Durchmesser der efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse ohne L-NAME-Behandlung (n=14) betragen bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l  $93,24 \pm 3,06\%$ , bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l  $73,45 \pm 6,92\%$  und bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l  $62,54 \pm 8,21\%$  des Ausgangsdurchmessers (Mann-Whitney-U-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 23 A und B).



**Abbildung 23:** L-NAME-Effekt auf die ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) in efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (ohne L-NAME (n=14), mit L-NAME (n=10)). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser, \*  $p < 0,05$ .

Die efferenten Arteriolen der WT (n=8) und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (n=10) zeigten unter NOS-Blockade ähnliche Kontraktionen auf kumulative ET-1-Applikation (Abbildung 24 A und B).



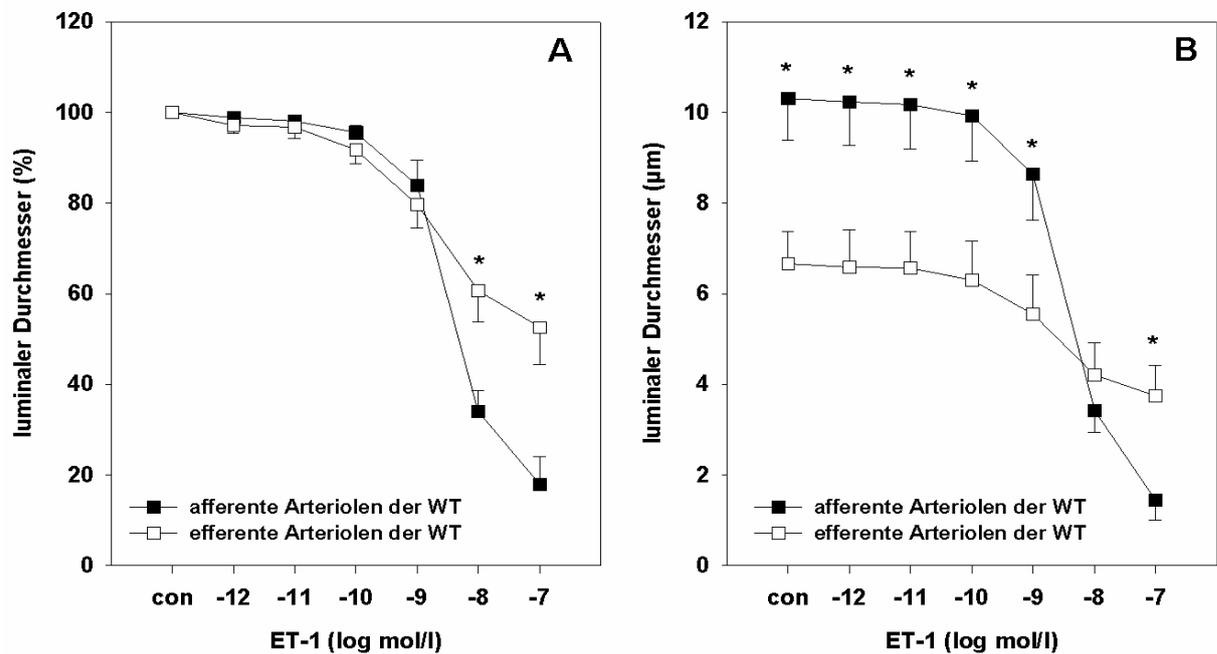
**Abbildung 24:** L-NAME-Effekt auf die ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) in efferenten Arteriolen der Wildtypen (WT mit L-NAME (n=8)) und in efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (*rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse mit L-NAME (n=10)). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser.

Hauptbefunde: Blockade der NOS reduzierte den basalen Durchmesser der efferenten Arteriolen der WT. Während NOS-Blockade war die vasokonstriktorische Antwort auf kumulative ET-1-Applikation in efferenten Arteriolen der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse signifikant stärker.

### 5.3 Vergleich der ET-1-Antwort in afferenten und efferenten Arteriolen

Afferente Arteriolen der WT kontrahierten signifikant stärker auf kumulative ET-1-Gabe ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) als efferente Arteriolen der WT. Bei einer ET-1-Dosis von  $10^{-8}$  mol/l betrug der luminaire Durchmesser der afferenten Arteriolen  $34,1 \pm 4,55\%$  und der Durchmesser der efferenten Arteriolen  $60,62 \pm 6,92\%$  des Ausgangsdurchmessers. Bei einer ET-1-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l betrug der luminaire Durchmesser der afferenten Arteriolen  $17,9 \pm 6,21\%$  und der Durchmesser

der efferenten Arteriolen  $52,51 \pm 8,21\%$  des Ausgangsdurchmessers (Mann-Whitney-U-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 25 A und B).



**Abbildung 25:** ET-1-Dosis-Wirkungskurve ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$  mol/l) in afferenten Arteriolen ( $n=10$ ) und in efferenten Arteriolen der Wildtypen (WT,  $n=10$ ). A: Prozentuale Werte der Ausgangsdurchmesser, B: Absolute Durchmesser, con=Ausgangsdurchmesser,  $*p < 0,05$ .

Hauptaussage: Auf kumulative ET-1-Applikation kontrahierten afferente Arteriolen stärker als efferente Arteriolen der WT.

## 6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die differentielle Beteiligung der Endothelin-Rezeptortypen an der ET-1-Wirkung auf die isoliert perfundierten afferenten und efferenten Arteriolen der Maus. Unter Verwendung des *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusemodells zeigten wir, dass a) in den afferenten Arteriolen ET-1-Applikation zu einer Vasokonstriktion durch Aktivierung des ET<sub>A</sub>-R führt, während ET<sub>B</sub>-R-Aktivierung keinen Effekt hat, b) in den efferenten Arteriolen sowohl ET<sub>A</sub>-R-Aktivierung als auch ET<sub>B</sub>-R-Aktivierung eine Vasokonstriktion vermitteln und c) in den efferenten Arteriolen eine ET<sub>B</sub>-R vermittelte Vasodilatation zur Aufrechterhaltung des basalen Tonus beiträgt. Die Ergebnisse deuten außerdem auf einen ET-1 induzierten vasodilatatorischen ET<sub>A</sub>-R Effekt in den efferenten Arteriolen hin.

### 6.1 Methoden

#### 6.1.1 Modell der isoliert perfundierten Arteriolen

In der vorliegenden Studie verwendeten wir *in vitro* isoliert perfundierte afferente und efferente Arteriolen des äußeren Kortex mit zugehörigem Glomerulus und Macula densa. Die Gefäße wurden mit Haltepipetten fixiert, die afferente Arteriole wurde mit einer intraluminalen Pipette orthograd, die efferente Arteriole retrograd perfundiert.

#### *Isolations- und Untersuchungstechniken*

Die kontraktile Funktion der renalen Arteriolen kann in verschiedenen anderen Modellen untersucht werden:

Die juxtamedulläre Nephronpräparation ermöglicht die videomikroskopische Betrachtung der afferenten und efferenten Arteriole *in situ*. Hierbei werden die Nieren isoliert, longitudinal zweigeteilt, der Großteil des Kortex und die Mukosa des Nierenbeckens werden entfernt, die venösen Gefäße werden eröffnet und die Nephrone werden über die Arkuataarterien mit Blut oder einer artifiziellen Lösung perfundiert. Andere, während der Präparation eröffnete, größere arterielle Gefäße werden abgebunden. Die Nierenpapille bleibt intakt. Der Perfusionsdruck kann mit

einem Drucksystem eingestellt werden. Somit werden juxtamedulläre Nephrone einer Papille sichtbar (221;226). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Tubulus-Gefäß-Interaktion intakt bleibt (221).

Ein weiteres häufig verwendetes Modell zur Untersuchung glomerulärer Gefäßfunktion ist das der isoliert perfundierten hydronephrotischen Niere. Durch wochenlange unilaterale Ligation des Ureters wird eine Hydronephrose erzeugt. Das renale tubuläre System und die Nierenrinde sind atrophisch, so dass die Nierenrinde pergamentartig dünn vorliegt. Die hydronephrotische Niere wird entlang der großen Krümmung geschnitten und in einer Badlösung gelagert. Die Betrachtung der Mikrozirkulation mittels Videomikroskopie ist möglich. Das hydronephrotische Nierenmodell kann für Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* verwendet werden (221;227). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass das Gefäßbett inaktiv ist. Eine Tubulus-Gefäß-Interaktion ist jedoch nicht vorhanden. Die Niere ist in ihrer gesamten Anatomie stark verändert (221).

Die Methode der Mikropunktion der glomerulären Kapillaren erlaubt eine indirekte Beurteilung der Kontraktilität der Arteriolen *in vivo*. Dabei werden unter dem Stereomikroskop Mikropipetten in das glomeruläre Kapillarsystem eingeführt. Der hydrostatische Druck wird in den glomerulären Kapillaren gemessen. Durch direkte Messung des Druckabfalles entlang der einzelnen afferenten und efferenten Gefäße sowie Schätzungen des Blutflusses in der Arteriole berechnet sich der Widerstand der einzelnen Arteriole (228) und damit kann man Schlussfolgerungen auf deren Kontraktilität ziehen.

Durch diese kurze Darstellung verschiedener Methoden zur Messung der kontraktilen Funktion renaler Arteriolen wird die eingeschränkte Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse deutlich. Bei den dargestellten Methoden können vasoaktive Substanzen tubulären, interstitiellen oder systemischen Ursprungs auf die afferente und efferente Arteriole einwirken (221). Dagegen sind diese Einflüsse bei isoliert perfundierten Arteriolen deutlich reduziert (221). Zudem unterscheiden sich die juxtamedullären Arteriolen von Arteriolen anderer Nierenabschnitte, zum Beispiel von superfizialen Arteriolen oder von Arteriolen aus dem mittleren Bereich der Rinde, in Struktur und Funktion. Der basale lumenale Durchmesser der juxtamedullären afferenten und efferenten Arteriole ist größer als der der superfizialen afferenten und efferenten Arteriole (221;229). Die superfizialen afferenten Arteriolen kontrahieren stärker als die juxtamedullären afferenten Arteriolen auf Noradrenalin- und

Ang-II-Applikation (221;230), während es in der Ang-II-Antwort der efferenten Arteriolen keinen deutlichen Unterschied zwischen den superfizialen und juxtamedullären Arteriolen gibt (229). Exogen appliziertes ET-1 vermittelt in der Niere eine kortikale Vasokonstriktion und eine medulläre Vasodilatation (231;232), was die regionalen Unterschiede der ET-1 Wirkung in der Niere nur noch einmal verdeutlicht. *Sanchez-Ferrer et al.* zeigten, dass die myogene Antwort in afferenten Arteriolen in juxtamedullärer Präparation von einem intaktem tubuloglomerulären-*Feedback* abhängig ist (221;233). Im Modell der isoliert perfundierten Arteriolen gibt es keinen tubuloglomerulären Rückkopplungsmechanismus (221).

In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir ausschließlich afferente und efferente Arteriolen der äußeren Nierenrinde. Wir zogen die Methode der isoliert perfundierten Arteriolen der Maus als stark reduziertes Modell ohne systemischen Einfluss zur Bearbeitung der Fragestellungen heran.

#### *NaCl-Konzentration an der Macula densa*

In der hier verwendeten Methode präparierten wir die afferenten und efferenten Arteriolen so, dass der zugehörige Glomerulus und die Macula densa intakt blieben. Die verwendeten Perfusions- und Badlösungen hatten eine der physiologischen Plasmakonzentration entsprechende NaCl-Konzentration von 115 mM. Die physiologische NaCl-Konzentration an der Macula densa liegt zwischen etwa 20 mM und 60 mM (221;234). Dies bedeutet, dass in der hier verwendeten Methode die Macula densa einer unphysiologisch hohen NaCl-Konzentration ausgesetzt war (221). Doppelperfusionsstudien zeigten, dass eine Änderung der NaCl-Konzentration von 10 mM auf 80 mM zu einer Tonuserhöhung der afferenten Arteriole führte (221;235). In den präkontrahierten orthograd oder retrograd perfundierten efferenten Arteriolen führte eine Erhöhung der NaCl-Konzentration von 10 mM auf 80 mM zu einer Vasodilatation (236;237).

#### *Retrograde versus orthograde Perfusion der efferenten Arteriolen*

Die efferenten Arteriolen wurden retrograd perfundiert. Die Einflüsse der afferenten Arteriole und des Glomerulus sind unter Verwendung dieser Technik deutlich reduziert. *Ito et al.* untersuchten die efferenten Arteriolen von Kaninchen in retrograder und orthograder Perfusion. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede. Während retrograder Perfusion war die Ang-II-induzierte Vasokonstriktion stärker als

während orthograder Perfusion (223). Auch *Patzak et al.* zeigten Unterschiede während retrograder und orthograder Perfusion der efferenten Arteriolen. In orthograd perfundierten efferenten Arteriolen der Mäuse war die Ang-II-Antwort bei niedrigen Ang-II-Konzentrationen stärker und bei hohen Ang-II-Konzentrationen schwächer als in retrograd perfundierten Arteriolen (238).

#### *Perfusionsdruck und Perfusionsrate*

Im Unterschied zu Arteriolen in juxtamedullärer Präparation (233) ist bei isoliert perfundierten Arteriolen die autoregulative Antwort unvollständig. Ein steigender Druck führte zu einer nicht-linearen Vergrößerung des Durchmessers der Gefäße. Die Gefäßweite änderte sich ab einem Druck von 80-100 mmHg im Druckbehälter weniger stark (221). Ein ähnlicher Verlauf wurde an isolierten Rattenarteriolen beobachtet (221;239). Wir wählten den Druck für die Perfusion der afferenten Arteriole anhand der Druck-Volumen-Kurven. Der Beginn der Abflachung der Kurve wurde als physiologischer Druckbereich der afferenten Arteriole interpretiert. In diesem Druckbereich ist das Lumen vollständig entfaltet und die afferente Arteriole weist einen basalen Tonus auf (221). Für die Perfusion der afferenten Arteriole wurde ein Druck von circa 100 mmHg im Druckbehälter gewählt. Die efferenten Arteriolen wurden mit einem Druck von circa 40 mmHg im Druckbehälter perfundiert. Der niedrigere Wert resultiert aus der weitaus geringeren Wanddicke und der fehlenden Autoregulation und orientiert sich an der Literatur (223).

Neben dem Druck beeinflusst auch der Fluss die Gefäßreaktivität. Die Perfusionsrate des Systems wurde für Drücke im Bereich von 80-100 mmHg und für Perfusionspipetten mit einem Durchmesser von 5  $\mu$ m mittels radioaktiv markierter Lösungen bestimmt (221;240). Sie betrug 50 nl/min (221;240). Dies passt gut zur physiologischen Filtrationsrate einzelner Nephrone in Mäusen, welche 10 nl/min beträgt (221;225). Druck und Perfusionsrate befinden sich demnach in dem in dieser Studie verwendeten Versuchsaufbau im physiologischen Bereich.

#### **6.1.2 Tiermodell**

ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Mäuse entwickeln eine kongenitale intestinale Aganglionose (218) ähnlich dem humanen M. Hirschsprung (219) und versterben kurz nach der Geburt (218). ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Ratten haben eine Deletion von 301 Basenpaaren im Bereich der Exon-1-Intron-1-Junktion des ET<sub>B</sub>-R-Gens (241). Diese Deletion führt zur

Produktion einer aberrant gespleißten ET<sub>B</sub>-R-mRNA (241). In dieser fehlt die Kodierungssequenz für die erste und die zweite transmembrane Domäne des G-Protein gekoppelten Rezeptors (241). Die ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Tiere verfügen über keinen funktionsfähigen ET<sub>B</sub>-R (241).

*Garipey et al.* züchteten einen Stamm von transgenen Ratten: In die DNA der ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Tiere wurde ein Transgen eingefügt, durch welches der ET<sub>B</sub>-R unter Kontrolle eines humanen Dopamin-β-Hydroxylase-Promotors ausgebildet wird (220). Gewebe, welche die Dopamin-β-Hydroxylase exprimieren (dies sind vor allem Nerven), können damit in diesen *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Tieren auch den funktionsfähigen ET<sub>B</sub>-R exprimieren. Die Kompensation des fehlenden ET<sub>B</sub>-R durch das Transgen führt zu einer normalen intestinalen Entwicklung (220). Die ausgewachsenen Mäuse exprimieren keinen funktionsfähigen renal vaskulären ET<sub>B</sub>-R (33).

Die ET<sub>B</sub>-R-Expression im sympathischen Nervensystem (220) der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse könnte die Ergebnisse dieser Studie beeinflusst haben. ET<sub>B</sub>-R der autonomen Nerven konnten Kontraktionen der vaskulären glatten Muskelzelle induzieren (242). Eine andere Studie zeigte, dass ET<sub>B</sub>-R-Hemmung die Noradrenalin-Freisetzung im Herzen steigert (243). Ein Endothelin-Effekt auf die autonomen Nerven in der Niere wurde bisher noch nicht berichtet. ET<sub>B</sub>-R-mRNA wurde in den Nieren der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Ratten nicht gefunden (33). Wir können dennoch nicht vollständig ausschließen, dass die ET<sub>B</sub>-R der autonomen Nerven der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse die Ergebnisse der Studie beeinflussen, da in der Präparation der isolierten Arteriolen auch autonome Nervenendigungen enthalten sein können.

In diesem Tiermodell der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse und Ratten ist nicht ausschließlich die Expression des ET<sub>B</sub>-R verändert. Auch andere Systeme sind im Vergleich zu den Wildtypen modifiziert: Wir zeigten, dass in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen die ET-1-Protein-Konzentration im Nierengewebe erhöht ist (244). Andere Studien fanden erhöhte ET-1-Plasmaspiegel in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Ratten (33;245). ET<sub>B</sub>-R sind entscheidend für die Clearance von Endothelin aus der Blutbahn (170). Dies stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus für die ET-1-Plasma-Konzentration dar. Die erhöhte ET-1-Menge im Plasma und im Nierengewebe beruht vermutlich auf eine verminderte Clearance von ET-1 durch den ET<sub>B</sub>-R in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-defizienten

Mäusen. Wir können nicht ausschließen, dass diese chronisch erhöhten ET-1-Plasma- und Gewebsspiegel die vaskuläre Funktion modulieren.

Wir beobachteten, dass in den isolierten präglomerulären Gefäßen und in der Gesamtniere der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse die ET<sub>A</sub>-R-mRNA reduziert ist. Im Nierengewebe war auch die ET<sub>A</sub>-R-Proteinexpression vermindert (244). In einer Studie in ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Mäusen zeigte sich eine geringere ET<sub>A</sub>-R-Dichte im peripheren Gewebe, in Gefäßen sowie im ZNS (246). Das Verteilungsmuster der ET<sub>A</sub>-R unterschied sich nicht zu dem in den Wildtypen (246). Eine weitere Studie in ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Mäusen bestätigte diese Ergebnisse (247). Auch in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Ratten wurde eine verminderte Expression des ET<sub>A</sub>-R im Nierenkortex und in der äußeren Medulla aufgezeigt (248). In der inneren Medulla jedoch war der ET<sub>A</sub>-R nicht vermindert (248). Diese Befunde weisen auf einen Zusammenhang zwischen ET<sub>B</sub>-R-Defizit und Verminderung der ET<sub>A</sub>-R-Dichte/Menge hin. Die verminderte ET<sub>A</sub>-R-Expression könnte einen Kompensationsmechanismus der erhöhten ET-1-Plasmaspiegel darstellen: Dafür spricht, dass in menschlichen Blutgefäßen, welche von Patienten mit erhöhtem ET-1-Plasmaspiegel isoliert wurden, eine signifikante Reduktion der ET<sub>A</sub>-R-Dichte messbar war (249). Ein weiteres Indiz zur Unterstützung dieser Hypothese ist, dass in einem Rattenmodell der akuten Hypertension, in welchem Adenovirus-Transfer des Pre-Pro-ET-1-Gens zu einem signifikant erhöhtem ET-1-Plasmaspiegel führte, eine signifikante Verringerung der ET<sub>A</sub>-R-Dichte im Herzen und in der Leber jedoch nicht in der Niere und im Gehirn messbar war (250). Die Befunde könnten auch auf einen Zusammenhang von ET<sub>A</sub>-R-Bildung- und Expression und der Expression eines funktionsfähigen ET<sub>B</sub>-R hinweisen: Dafür spricht, dass in Geweben, in denen hauptsächlich der ET<sub>A</sub>-R exprimiert wird (Herz und Leber), die ET<sub>A</sub>-R-Dichte in den ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Mäusen nicht verändert war (247). Im Lungenparenchym jedoch, wo das quantitative Verhältnis von ET<sub>A</sub>-R zu ET<sub>B</sub>-R annähernd gleich ist, war die ET<sub>A</sub>-R-Dichte signifikant reduziert (247).

Die verminderte ET<sub>A</sub>-R-Expression in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen stellt einen wichtigen Befund in Bezug auf die Verwendung des Modells für die Untersuchung der Endothelin-Rezeptor-Funktionen im renalen Gefäßsystem dar. *Perry et al.* wiesen in den kleinen Mesenterialgefäßen der ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Ratten eine erhöhte ET<sub>A</sub>-R-Proteinexpression nach. Dennoch war die ET-1-Antwort

verringert. Die Autoren vermuteten eine durch erhöhte ET-1-Plasmakonzentration verursachte Entkopplung der ET<sub>A</sub>-R von nachgeschalteten Signalwegen (245).

Unsere Arbeitsgruppe fand, dass die eNOS-mRNA in den präglomerulären Gefäßen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse erniedrigt ist (244). Dies weist auf eine beeinträchtigte endotheliale NO-Produktion in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen hin. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Studie, welche darauf hinweist, dass die endothel-abhängige Relaxation der präkontrahierten Aortenringe in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen beeinträchtigt ist (32). Im Gegensatz dazu fanden wir eine signifikante vasodilatatorische NO-Funktion in den efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse. Eine weitere Studie untersuchte den Effekt einer akuten NOS-Blockade auf den Blutdruck in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Ratten und Kontrolltieren (33). Es gab keinen Unterschied in den auf akute NOS-Blockade eingetretenen Blutdruckveränderungen (33). Dies lässt vermuten, dass in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Tieren die basale Aktivität der NOS nicht verändert ist.

Bei einer beeinträchtigten endothelialen Funktion wäre ein verstärktes Remodelling und eventuell eine Fibrose in den Geweben der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Tiere zu erwarten gewesen. Histologische Untersuchungen der Gewebe der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse und Ratten unterstützen diese Hypothese jedoch nicht (32;33;174).

*Rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defiziente Ratten entwickeln eine salzsensitive Hypertension. Während einer normalen (0,8% NaCl) oder salzhaltigen (8% NaCl) Diät entwickelten die *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Ratten einen signifikant erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruck. Die Autoren führten diese salzsensitive arterielle Hypertonie der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Ratten auf eine hohe EnaC-Aktivität in den Epithelzellen der Sammelrohre zurück (33). Auch andere Studien konnten die Entwicklung einer salzsensitiven Hypertonie in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Tieren belegen (32;174). Dagegen war der mittlere arterielle Druck der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse, welche Standardfutter erhielten (0,2% NaCl), unverändert (32). Auch *Perry et al.* stellten dar, dass sich der mittlere arterielle Druck zwischen den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Ratten und den heterozygoten Kontrolltieren nicht unterschied (245). Es lässt sich daher vermuten, dass die in dieser Studie verwendeten *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse, welche stets freien Zugang zu Standardfutter hatten, einen normalen Blutdruck aufwiesen.

Zudem könnte eine möglicherweise vorhandene  $ET_A$ -R/ $ET_B$ -R-Interaktion in den *rescued*- $ET_B$ -R-defizienten Mäusen verändert sein (182). Genaue Aussagen hierzu sind jedoch bei der aktuellen Datenlage noch nicht möglich.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in diesem Modell der *rescued*- $ET_B$ -R-defizienten Mäuse zahlreiche Schwierigkeiten vermieden werden, wie sie aus zu geringer Spezifität von Rezeptoragonisten- und antagonistischen resultieren können. Als Besonderheit führt die chronische  $ET_B$ -R-Defizienz zu Veränderungen des Endothelinsystems selbst, die zum Teil kompensatorischer Natur sind.

## 6.2 $ET$ -1 Wirkungen auf die afferente Arteriole

Der  $ET_A$ -R vermittelte in den afferenten Mäusearteriolen eine Vasokonstriktion, während der  $ET_B$ -R weder einen vasodilatatorischen noch einen vasokonstriktorischen  $ET$ -1-Effekt auf die afferenten Mäusearteriolen zeigte.

*Wendel et al.* stellten unter Verwendung der Immunofluoreszenzmikroskopie das Vorhandensein sowohl des  $ET_A$ -R als auch des  $ET_B$ -R in afferenten Rattenarteriolen dar (155). Auch andere Studien zeigten das Vorhandensein sowohl von  $ET_A$ -R als auch von  $ET_B$ -R in afferenten Ratten- und Kaninchenarteriolen (202;211;212;251). In Ratten wurden  $ET_A$ -R und  $ET_B$ -R in den glatten Muskelzellen gezeigt, was einen vasokonstriktorischen Effekt dieser beiden Rezeptoren nahelegt. Ergebnisse weiterer Studien weisen auf einen synergistischen vasokonstriktorischen Effekt des  $ET_A$ -R und  $ET_B$ -R in den afferenten Arteriolen hin (189;202;206). In afferenten Arteriolen der präglomerulären Gefäße aus Rattennieren und aus hydronephrotischen Rattennieren führten die selektiven  $ET_B$ -R-Agonisten S6c und IRL-1620 zur Konstriktion (163;188;202;206). In einer Studie war durch Blockade des  $ET_B$ -R die Vasokonstriktion bei niedrigen  $ET$ -1-Dosen weitestgehend aufgehoben. Erst hohe  $ET$ -1-Dosen führten unter  $ET_B$ -R-Blockade zur Vasokonstriktion. Ohne  $ET_B$ -R-Blockade induzierte  $ET$ -1 schon in deutlich niedrigeren Dosen eine signifikante Vasokonstriktion (206). In einer weiteren Studie war unter  $ET_B$ -R-Blockade die  $ET$ -1 vermittelte Vasokonstriktion präglomerulärer Gefäße antagonisiert, jedoch nicht vollständig aufgehoben (188).

Im Unterschied zu den o.g. Studien in Gefäßbetten von Ratten, hydronephrotischen Ratten- und Kaninchennieren, in welchen sowohl  $ET_A$ -R als auch  $ET_B$ -R eine Vasokonstriktion vermitteln, legt unsere Studie dar, dass in afferenten Arteriolen in Mäusen nur der  $ET_A$ -R an einer  $ET$ -1 vermittelten Vasokonstriktion beteiligt ist: Die

ET<sub>A</sub>-R-Blockade hob die ET-1-Antwort in WT und in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen vollständig auf, die ET-1-Dosis-Wirkungskurve unterschied sich nicht signifikant in WT und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen und kumulative ET<sub>B</sub>-R-Stimulation führte zu keiner Änderung der luminalen Durchmesser. (213). In Übereinstimmung damit war die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in einer Studie durch BQ-123 vollständig aufgehoben (214).

*Wendel et al.* zeigten, dass eine ET<sub>B</sub>-R-Immunoreaktivität auch in der Endothelzelle der präglomerulären Rattengefäße vorhanden ist. Dies suggeriert einen vasodilatatorischen ET<sub>B</sub>-R-Effekt (155). In einer Studie in afferenten Kaninchenarteriolen verstärkte eine Inhibition der NO-Synthase die ET-1 induzierte Vasokonstriktion (201), was mit dem Hintergrund der Kopplung eines endothelialen ET<sub>B</sub>-R an das NO-System auf einen vasodilatatorischen ET<sub>B</sub>-R-Effekt hinweisen kann. Jedoch beeinflusste die Hemmung der NO-Synthase die ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurve in afferenten Arteriolen der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse in unserer Studie nicht.

Die Annahme einer Balance einer konstriktiven und dilatativen ET<sub>B</sub>-R-Wirkung ohne Nettoeffekt ist unwahrscheinlich, da wir keinen L-NAME-Effekt auf die ET-1-Dosis-Wirkungs-Kurve zeigen konnten.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass der ET<sub>B</sub>-R in afferenten Mäusearteriolen nicht an der ET-1 vermittelten Vasokonstriktion- oder dilatation beteiligt ist.

In unserer Studie führte eine Vorbehandlung mit dem selektiven ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten BQ-123 oder eine NO-Synthase-Inhibition mit L-NAME zu keiner Änderung der Ausgangslumina der afferenten Arteriolen der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse. Der basale arterioläre Durchmesser der afferenten Arteriolen der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse unterschied sich nicht signifikant. Es legt nahe, dass weder der ET<sub>A</sub>-R noch der ET<sub>B</sub>-R einen Einfluss auf den basalen Tonus der afferenten Arteriolen in Mäusen in diesem experimentellen Modell hat. Gleichermäßen hatte der selektive ET<sub>A</sub>-R-Antagonist BQ-123 in Rattennieren keinen Einfluss auf den basalen präglomerulären Widerstand (196). Die Infusion eines selektiven ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten führte nicht zur Veränderung des renalen Blutflusses oder der GFR in Ratten (98;252). Dies impliziert, dass es keinen ET<sub>A</sub>-R vermittelten ET-1-Effekt auf den basalen Tonus der afferenten Arteriolen gibt. In einer Mikroperfusionstudie führte eine kombinierte ET<sub>A</sub>-R- und ET<sub>B</sub>-R-Blockade mit Bosentan zu einem Anstieg des präglomerulären

Widerstandes (196). Die Autoren dieser Studie vermuteten einen tonischen  $ET_B$ -R vermittelten vasodilatatorischen ET-1-Effekt (196). Eine weitere Studie in Gefäßen hydronephrotischer Rattennieren zeigte, dass ET-1 an der Aufrechterhaltung des basal arteriolen Tonus der präglomerulären Gefäße beteiligt ist (253).

### 6.3 ET-1 Wirkungen auf die efferente Arteriole

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den efferenten Mäusearteriolen sowohl  $ET_A$ -R als auch  $ET_B$ -R an der ET-1 vermittelten Vasokonstriktion beteiligt sind: Auf kumulative ET-1-Applikation konstringierten die efferenten Arteriolen der *rescued*- $ET_B$ -R-defizienten Mäuse, was einen vasokonstriktorisch wirkenden  $ET_A$ -R impliziert. Die Expression von  $ET_A$ -R in den glatten Muskelzellen der efferenten Arteriolen wurde gezeigt (155). Auch in efferenten Arteriolen der Ratten vermittelte der  $ET_A$ -R eine Vasokonstriktion (206). Eine Studie an hydronephrotischen Rattennieren mit Verwendung des selektiven  $ET_A$ -R-Blocker BQ-123 kam zu dem Ergebnis, dass der  $ET_A$ -R nur teilweise an der ET-1-Antwort efferenter Arteriolen beteiligt ist (188).

In efferenten Arteriolen war die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in den Wildtypen stärker als in den efferenten Arteriolen der *rescued*- $ET_B$ -R-defizienten Mäuse. Die selektive  $ET_A$ -R-Blockade verhinderte die Vasokonstriktion nur in den efferenten Arteriolen der *rescued*- $ET_B$ -R-defizienten Mäuse. Die selektiven  $ET_B$ -Rezeptor-Agonisten ALA-ET-1 und IRL-1620 induzierten eine Vasokonstriktion in den WT. Diese Beobachtungen legen nahe, dass der  $ET_B$ -R in den efferenten Arteriolen eine Vasokonstriktion vermittelt.

$ET_B$ -R sind in den glatten Muskelzellen der efferenten Arteriolen von Ratten exprimiert (155). Es liegen keine Daten für Mäuse vor. Diese glattmuskulären  $ET_B$ -R vermitteln wahrscheinlich eine Vasokonstriktion: In hydronephrotischen Rattennieren führte die Applikation des selektiven  $ET_B$ -R-Agonisten IRL-1620 zur konzentrationsabhängigen Vasokonstriktion (163;188). Gleichermäßen konstringierte IRL-1620 auch die efferenten Arteriolen der Rattennieren in einer Studie von *Inscho et al.*: Höhere ET-1-Dosen von 1 und 10 nM vermittelten unter  $ET_A$ -R-Blockade eine signifikante Vasokonstriktion der efferenten Arteriolen (206). Die selektiven  $ET_B$ -R-Antagonisten BQ-788 und IRL-1038 schwächten in efferenten Arteriolen der hydronephrotischen Rattennieren die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion ab (188).

ET<sub>B</sub>-R wurden auf den Endothelzellen der efferenten Arteriolen von Ratten mittels Immunofluoreszenz nicht gesehen (155). Das deutet auf eine fehlende dilatative Funktion dieses Rezeptors hin. Allerdings weisen funktionelle Studien auf einen vasodilatatorischen Effekt des ET<sub>B</sub>-Rezeptors in efferenten Arteriolen hin: Der selektive ET<sub>B</sub>-R-Agonist S6c induzierte in efferenten Rattenarteriolen eine konzentrationsabhängige Vasodilatation (206). ET<sub>A</sub>-R-Blockade in efferenten Arteriolen erzeugte eine Vasodilatation bei niedrigen ET-1 Dosen (0,01-0,1nM), während die Vasokonstriktion bei höheren ET-1 Dosen (1-10 nM) überwog. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre eine höhere ET-1-Affinität des endothelialen im Vergleich zum glattmuskulären ET<sub>B</sub>-R (206). Die Studie legt nahe, dass in efferenten Arteriolen der Ratten der endotheliale vasodilatatorische ET<sub>B</sub>-R einen Gegenpart zu den glattmuskulären vasokonstriktorisches ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren darstellt. Der selektive ET<sub>B</sub>-R-Antagonist A-192621 verstärkte die ET-1 induzierte Konstriktion in dieser Studie von *Inscho et al.*, was ebenso für einen vasodilatatorischen ET<sub>B</sub>-R-Effekt spricht (206). In unserer Studie konnten wir jedoch keinen vasodilatatorischen ET<sub>B</sub>-R-Effekt in Antwort auf akute ET<sub>B</sub>-R-Stimulation zeigen. Dies deutet auf einen rein vasokonstriktorisches wirkenden ET<sub>B</sub>-R in den efferenten Arteriolen der Maus hin.

In efferenten Arteriolen der WT und der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse, welche mit L-NAME vorbehandelt wurden, war die vasokonstriktorisches Antwort auf kumulative ET-1-Applikation signifikant stärker als ohne L-NAME-Vorbehandlung. Dabei unterschied sich der vasokonstriktorisches ET-1-Effekt nicht im Vergleich von WT und *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen. Dies spricht gegen einen vasodilatatorischen ET<sub>B</sub>-R-Effekt. Die verstärkte ET-1-Antwort unter NOS-Inhibition weist auf eine ET<sub>A</sub>-R vermittelte NO-Freisetzung hin. In der Literatur finden sich keine Hinweise auf eine solche ET<sub>A</sub>-R-Wirkung. Bisher wurde eine Expression des ET<sub>A</sub>-R auch nur in den glatten Muskelzellen, jedoch nicht in Endothelzellen gezeigt (155;213). Daten für renale Gefäße der Maus sind nicht vorhanden.

Die Vorbehandlung mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME reduzierte den basalen Durchmesser der efferenten Arteriolen der Wildtypen, nicht aber den der efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse. Die Ergebnisse zeigen, dass es einen tonisch vasodilatatorischen Effekt des endogenen ET-1 gibt, welcher über den ET<sub>B</sub>-R und NO-Freisetzung vermittelt wird. Der ET<sub>B</sub>-R wäre damit an der Regulation des basalen Tonus der efferenten Arteriole beteiligt. Die Autoren einer anderen

Studie vermuten jedoch einen tonisch vasokonstriktorisches Effekt des ET<sub>A</sub>-R, welcher an der Aufrechterhaltung des basal efferenten arteriolen Tonus beteiligt zu sein scheint (195). Weitere Studien zeigten, dass das Endothelinsystem nicht an der Aufrechterhaltung des basal arteriolen Tonus beteiligt ist (196;253).

#### 6.4 Vergleich der ET-1 Antwort in afferenten und efferenten Arteriolen

In unserer Studie kontrahierten auf kumulative ET-1-Applikation die afferenten Arteriolen stärker als die efferenten Arteriolen der Wildtypen.

Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die zeigen, dass die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion in den afferenten Arteriolen stärker ist als in den efferenten Arteriolen (149;203;206;208). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass ET-1 den renal vaskulären Widerstand steigert und die GFR senkt. Solch eine Reduktion des renalen Blutflusses in Antwort auf appliziertes ET-1 wurde in zahlreichen *in vivo* Tiermodellen gezeigt (149;190;193;252;254-259). Andere *in vitro* Studien unterstützen die Idee einer im Vergleich zur efferenten Arteriole stärkeren ET-1-Antwort der afferenten Arteriole in Ratten (19;21;149;206;260).

Es muss erwähnt werden, dass es Studien gibt, in denen kein Unterschied in der ET-1-Antwort der efferenten und der afferenten Arteriole (215) oder gar eine stärkere ET-1 induzierte Vasokonstriktion oder ein größerer Anstieg des arteriolen Widerstandes in efferenten als in afferenten Arteriolen gefunden wurde (185;190;205;216).

Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse können methodische und biologische Ursachen haben: Zum einen gibt es bisher wenige Untersuchungen in afferenten Arteriolen der Maus, vorherige Untersuchungen beziehen sich auf afferente Arteriolen vornehmlich in Ratten, aber auch in Kaninchen und Hunden. Zudem sind zum Teil andere Gefäßbetten, wie zum Beispiel juxtaglomeruläre prä- und postglomeruläre Gefäße, untersucht worden. Juxtaglomeruläre Gefäße haben andere funktionelle Eigenschaften als kortikale Arteriolen. Die Untersuchungstechnik der isoliert perfundierten Arteriole ohne Einfluss von z.B. Tubuli unterscheidet sich von anderen, häufig verwendeten Präparationen. Wir verwendeten *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defiziente-Mäuse, was einige pharmakologische Schwierigkeiten bezüglich limitierter Rezeptorspezifität umgehen kann. Im Modell der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten-Maus kommt es zu, teils kompensatorischen,

Veränderungen im Endothelinsystem. Zusammenfassend kann man sagen, dass ein direkter Vergleich der Ergebnisse unserer Studie mit anderen Studien nur bedingt möglich ist.

## 6.5 Limitationen der Studie

ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Defizienz führt zu einer Veränderung im neuronalen System, woraus ein kongenitaler Megacolon resultiert. Daher sterben ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Tiere kurz nach ihrer Geburt (218). Wir verwendeten Mäuse mit einem genetischen *Rescue* des letalen ET<sub>B</sub>-R *knockouts*. Der *Rescue*-Mechanismus entsteht durch ein Dopamin-Beta-Hydroxylase-ET<sub>B</sub>-R-Transgen (32). Dieses Transgen wird vorübergehend in den von der Neuralleiste abstammenden Vorstufen des autonomen Nervensystems exprimiert und fördert so die normale intestinale Entwicklung der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse (220). Chronische ET<sub>B</sub>-R-Defizienz kann zu, z.T. kompensatorischen, Veränderungen in der Gefäßstruktur- und funktion führen. Wir konnten eine Downregulation der ET<sub>A</sub>-R-mRNA in präglomerulären Gefäßen (afferente Arteriolen und Interlobulararterien) sowie eine Downregulation der ET<sub>A</sub>-R-mRNA und des ET<sub>A</sub>-R-Proteins in der gesamten Niere in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen darstellen (244). Dieses Ergebniss wird von einer Studie von *Davenport et al.* unterstützt, welche eine Downregulation des ET<sub>A</sub>-R in peripheren und zentralen Geweben, wie z.B. im Herzen, in Gefäßen und im Kleinhirn der ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Mäuse zeigte (246). Diese Downregulation der ET<sub>A</sub>-R könnte man als eine Adaptation an die in ET<sub>B</sub>-R-defizienten Ratten und in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse erhöhten ET-1-Gewebsspiegel (244) und Plasmaspiegel deuten (33). Die erhöhten renalen ET-1-Gewebsspiegel könnten durch die fehlende Clearance-Funktion des renalen ET<sub>B</sub>-R in den *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen erklärt werden (170). Eine Studie von *Perry et al.* zeigte eine Steigerung der ET<sub>A</sub>-R-Expression in den Mesenterialgefäßen der ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Ratten (245). Funktionelle Konsequenzen der Veränderung der ET<sub>A</sub>-R-Expression in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen sind schwer einzuschätzen. Wir konnten zeigen, dass die eNOS-mRNA in den isolierten präglomerulären Gefäßen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen reduziert war (244). Auch wenn diese Beobachtung eine beeinträchtigte endotheliale Funktion in *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäusen (32) und in

endothelzell-spezifischen-ET<sub>B</sub>-R-*knockout* Mäusen (261) nahelegt, sei betont, dass wir eine signifikante vasodilatatorische NO-Funktion in den efferenten Arteriolen der *rescued*-ET<sub>B</sub>-R-defizienten Mäuse zeigten.

Da eine nervenendigungsfreie Präparation der afferenten und efferenten Mäusearteriolen nicht möglich ist, könnte eine Endothelin-Rezeptor-Expression im sympathischen Nervensystem die Ergebnisse dieser Studie beeinflusst haben. *Takimoto et al.* zeigten *in vitro*, dass Endothelin-Rezeptoren auf den Endigungen autonomer Nerven eine glattmuskuläre Kontraktion vermitteln können (242). Endothelin-Rezeptoren auf sympathischen Nerven können die Noradrenalinfreisetzung im Meerschweinchenmyokard modulieren (243). Ein Einfluss der ET<sub>B</sub>-R im autonomen Nervensystem auf die Ergebnisse unserer Studie kann nicht ausgeschlossen werden, da in der Präparation der afferenten und efferenten Arteriolen durchaus auch Endigungen des autonomen Nervensystems vorkommen können.

In unserer Studie wurden die efferenten Arteriolen retrograd perfundiert. Dies hat den Vorteil, dass es keine Beeinflussung der Ergebnisse durch glomeruläre vasoaktive Substanzen oder durch vasoaktive Substanzen der afferenten Arteriole gibt. Ang-II hatte einen stärkeren vasokonstriktorisches Effekt auf die efferente Arteriole während retrograder Perfusion versus orthograder Perfusion. Dies hängt mit Cyclooxygenase-Produkten zusammen, welche während orthograder Perfusion von dem Glomerulus freigesetzt werden und die efferent arterioläre Ang-II-Antwort modulieren (262). Es wurde eine stärkere Ang-II- und Noradrenalin- induzierte Vasokonstriktion auf efferente Arteriolen während retrograder Perfusion versus orthograder Perfusion beobachtet (223).

## 7 Literatur

- (1) Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:851-876.
- (2) Davenport AP, Maguire JJ. Endothelin. *Handb Exp Pharmacol* 2006;(176 Pt 1):295-329.
- (3) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332(6163):411-415.
- (4) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(8):2863-2867.
- (5) Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch* 1988; 413(1):108-110.
- (6) Garjani A, Wainwright CL, Zeitlin IJ, Wilson C, Slee SJ. Effects of endothelin-1 and the ETA-receptor antagonist, BQ123, on ischemic arrhythmias in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25(4):634-642.
- (7) Baydoun AR, Peers SH, Cirino G, Woodward B. Effects of endothelin-1 on the rat isolated heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S193-S196.
- (8) Sakai S, Kimura T, Wang Z, Shimojo N, Maruyama H, Homma S et al. Endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy is partly regulated by transcription factor II-F interacting C-terminal domain phosphatase of RNA polymerase II. *Life Sci* 2012; 91(13-14):572-577.
- (9) Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Yamaoki K, Nagai R, Takaku F et al. The possible role of endothelin-1 in the pathogenesis of coronary vasospasm. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S132-S137.
- (10) Lerman A, Kubo SH, Tschumperlin LK, Burnett JC, Jr. Plasma endothelin concentrations in humans with end-stage heart failure and after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20(4):849-853.
- (11) Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996; 384(6607):353-355.

- (12) Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Detection of endothelin receptors in human coronary artery vascular smooth muscle cells but not endothelial cells by using electron microscope autoradiography. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29(6):820-826.
- (13) Ninomiya H, Uchida Y, Saotome M, Nomura A, Ohse H, Matsumoto H et al. Endothelins constrict guinea pig tracheas by multiple mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262(2):570-576.
- (14) Uchida Y, Ninomiya H, Saotome M, Nomura A, Ohtsuka M, Yanagisawa M et al. Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol* 1988; 154(2):227-228.
- (15) Yoshibayashi M, Nishioka K, Nakao K, Saito Y, Matsumura M, Ueda T et al. Plasma endothelin concentrations in patients with pulmonary hypertension associated with congenital heart defects. Evidence for increased production of endothelin in pulmonary circulation. *Circulation* 1991; 84(6):2280-2285.
- (16) Takabatake T, Ise T, Ohta K, Kobayashi K. Effects of endothelin on renal hemodynamics and tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 1992; 263(1 Pt 2):F103-F108.
- (17) Hirata Y, Matsuoka H, Kimura K, Fukui K, Hayakawa H, Suzuki E et al. Renal vasoconstriction by the endothelial cell-derived peptide endothelin in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1989; 65(5):1370-1379.
- (18) Cairns HS, Rogerson ME, Fairbanks LD, Neild GH, Westwick J. Endothelin induces an increase in renal vascular resistance and a fall in glomerular filtration rate in the rabbit isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol* 1989; 98(1):155-160.
- (19) Denton KM, Shweta A, Finkelstein L, Flower RL, Evans RG. Effect of endothelin-1 on regional kidney blood flow and renal arteriole calibre in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31(8):494-501.
- (20) Bugaj V, Pochynyuk O, Mironova E, Vandewalle A, Medina JL, Stockand JD. Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by endothelin-1 in rat collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295(4):F1063-F1070.
- (21) Kon V, Yoshioka T, Fogo A, Ichikawa I. Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest* 1989; 83(5):1762-1767.
- (22) Pernow J, Franco-Cereceda A, Matran R, Lundberg JM. Effect of endothelin-1 on regional vascular resistances in the pig. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S205-S206.
- (23) Oyekan A, Balazy M, McGiff JC. Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by ET-1 and ANG II. *Am J Physiol* 1997; 273(1 Pt 2):R293-R300.

- (24) Karet FE, Kuc RE, Davenport AP. Novel ligands BQ123 and BQ3020 characterize endothelin receptor subtypes ETA and ETB in human kidney. *Kidney Int* 1993; 44(1):36-42.
- (25) Just A, Olson AJ, Falck JR, Arendshorst WJ. NO and NO-independent mechanisms mediate ETB receptor buffering of ET-1-induced renal vasoconstriction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288(5):R1168-R1177.
- (26) Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, Cannon RO, III, Panza JA. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33(2):753-758.
- (27) Orisio S, Benigni A, Bruzzi I, Corna D, Perico N, Zoja C et al. Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *Kidney Int* 1993; 43(2):354-358.
- (28) Tomita K, Ujiie K, Nakanishi T, Tomura S, Matsuda O, Ando K et al. Plasma endothelin levels in patients with acute renal failure. *N Engl J Med* 1989; 321(16):1127.
- (29) Seccia TM, Maniero C, Belloni AS, Guidolin D, Pothén P, Pessina AC et al. Role of angiotensin II, endothelin-1 and L-type calcium channel in the development of glomerular, tubulointerstitial and perivascular fibrosis. *J Hypertens* 2008; 26(10):2022-2029.
- (30) Amiri F, Virdis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM et al. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110(15):2233-2240.
- (31) Noshad H, Argani H, Nezami N, Ghojzadeh M, Zomorodi A, Bohlouli A et al. Arterial atherosclerosis in patients with chronic kidney disease and its relationship with serum and tissue. *Iran J Kidney Dis* 2009; 3(4):203-209.
- (32) Quaschnig T, Rebhan B, Wunderlich C, Wanner C, Richter CM, Pfab T et al. Endothelin B receptor-deficient mice develop endothelial dysfunction independently of salt loading. *J Hypertens* 2005; 23(5):979-985.
- (33) Gariépy CE, Ohuchi T, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest* 2000; 105(7):925-933.
- (34) Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem* 1989; 264(25):14613-14616.
- (35) Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol* 1997; 159(4):1987-1992.

- (36) Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics* 1991; 10(1):236-242.
- (37) Shiba R, Sakurai T, Yamada G, Morimoto H, Saito A, Masaki T et al. Cloning and expression of rat preproendothelin-3 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186(1):588-594.
- (38) Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164(1):74-80.
- (39) Firth JD, Ratcliffe PJ. Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest* 1992; 90(3):1023-1031.
- (40) Imai T, Hirata Y, Eguchi S, Kanno K, Ohta K, Emori T et al. Concomitant expression of receptor subtype and isopeptide of endothelin by human adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182(3):1115-1121.
- (41) Plumpton C, Champeney R, Ashby MJ, Kuc RE, Davenport AP. Characterization of endothelin isoforms in human heart: endothelin-2 demonstrated. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S26-S28.
- (42) Suzuki N, Matsumoto H, Miyauchi T, Kitada C, Tsuda M, Goto K et al. Sandwich-enzyme immunoassays for endothelin family peptides. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7:S420-S422.
- (43) Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):730-732.
- (44) Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):732-735.
- (45) Chou SY, Porush JG. Renal actions of endothelin-1 and endothelin-3: interactions with the prostaglandin system and nitric oxide. *Am J Kidney Dis* 1995; 26(1):116-123.
- (46) Trybulec M, Dudek RR, Gryglewski RJ. Effects of endothelin-1 and endothelin-3 on the release of prostanoids from isolated perfused rat kidney. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7:S229-S232.
- (47) Pons F, Loquet I, Touvay C, Roubert P, Chabrier PE, Mencia-Huerta JM et al. Comparison of the bronchopulmonary and pressor activities of endothelin isoforms ET-1, ET-2, and ET-3 and characterization of their binding sites in guinea pig lung. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143(2):294-300.
- (48) Saito A, Shiba R, Yanagisawa M, Masaki T, Kimura S, Yamada K et al. Characterization of the effect of endothelins in canine cerebral arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7:S219-S221.

- (49) O'Reilly G, Charnock-Jones DS, Cameron IT, Smith SK, Davenport AP. Endothelin-2 mRNA splice variants detected by RT-PCR in cultured human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S18-S21.
- (50) Ko C, Gieske MC, Al Alem L, Hahn Y, Su W, Gong MC et al. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology* 2006; 147(4):1770-1779.
- (51) Karet FE, Davenport AP. Localization of endothelin peptides in human kidney. *Kidney Int* 1996; 49(2):382-387.
- (52) Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M et al. Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156(3):1182-1186.
- (53) Endo S, Inooka H, Ishibashi Y, Kitada C, Mizuta E, Fujino M. Solution conformation of endothelin determined by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *FEBS Lett* 1989; 257(1):149-154.
- (54) Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinimi O, Sugita Y, Yanagisawa M et al. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S5-S7.
- (55) Ikeda K, Emoto N, Raharjo SB, Nurhantari Y, Saiki K, Yokoyama M et al. Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J Biol Chem* 1999; 274(45):32469-32477.
- (56) Sanchez R, MacKenzie A, Farhat N, Nguyen TD, Stewart DJ, Mercier I et al. Endothelin B receptor-mediated regulation of endothelin-1 content and release in cultured porcine aorta endothelial cell. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39(5):652-659.
- (57) Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31(3):424-430.
- (58) Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circ Res* 1998; 83(3):314-321.
- (59) Kanse SM, Takahashi K, Warren JB, Perera T, Porta M, Ghatei M et al. Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7:S113-S116.
- (60) Shima H, Yamanouchi M, Omori K, Sugiura M, Kawashima K, Sato T. Endothelin-1 production and endothelin converting enzyme expression by guinea pig airway epithelial cells. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 37(5):1001-1010.

- (61) Zeballos GA, An SJ, Wu JM. Endothelin-1 secretion by human fibroblasts in culture: effects of cell density and IFN-beta. *Biochem Int* 1991; 25(5):845-852.
- (62) Giaid A, Gibson SJ, Ibrahim BN, Legon S, Bloom SR, Yanagisawa M et al. Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(19):7634-7638.
- (63) Lee ME, de la Monte SM, Ng SC, Bloch KD, Quertermous T. Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest* 1990; 86(1):141-147.
- (64) Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y. Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191(3):823-830.
- (65) Sessa WC, Kaw S, Hecker M, Vane JR. The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174(2):613-618.
- (66) Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD et al. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med* 1990; 172(6):1741-1748.
- (67) Takahashi K, Jones PM, Kanse SM, Lam HC, Spokes RA, Ghatei MA et al. Endothelin in the gastrointestinal tract. Presence of endothelinlike immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology* 1990; 99(6):1660-1667.
- (68) Sakamoto H, Sasaki S, Hirata Y, Imai T, Ando K, Ida T et al. Production of endothelin-1 by rat cultured mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169(2):462-468.
- (69) Wilkes BM, Susin M, Mento PF, Macica CM, Girardi EP, Boss E et al. Localization of endothelin-like immunoreactivity in rat kidneys. *Am J Physiol* 1991; 260(6 Pt 2):F913-F920.
- (70) Kitamura K, Tanaka T, Kato J, Ogawa T, Eto T, Tanaka K. Immunoreactive endothelin in rat kidney inner medulla: marked decrease in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162(1):38-44.
- (71) Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1990; 1(9):649-659.
- (72) Emori T, Hirata Y, Ohta K, Shichiri M, Marumo F. Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160(1):93-100.

- (73) Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Regulation of endothelin-1 production by a thromboxane A2 mimetic in rat heart smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1313(1):1-5.
- (74) Yoshizumi M, Kurihara H, Morita T, Yamashita T, Oh-hashii Y, Sugiyama T et al. Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 166(1):324-329.
- (75) Maemura K, Kurihara H, Morita T, Oh-hashii Y, Yazaki Y. Production of endothelin-1 in vascular endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology* 1992; 38 Suppl 1:29-35.
- (76) Salh B, Hoefflick K, Kwan W, Pelech S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 potentiate interferon-gamma-mediated endothelin production by human monocytes: role of protein kinase C. *Immunology* 1998; 95(3):473-479.
- (77) Lamas S, Michel T, Collins T, Brenner BM, Marsden PA. Effects of interferon-gamma on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90(3):879-887.
- (78) Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T et al. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159(3):1435-1440.
- (79) Wang DL, Wung BS, Peng YC, Wang JJ. Mechanical strain increases endothelin-1 gene expression via protein kinase C pathway in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1995; 163(2):400-406.
- (80) Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Pressure enhances endothelin-1 release from cultured human endothelial cells. *Hypertension* 1995; 25(3):449-452.
- (81) Elton TS, Oparil S, Taylor GR, Hicks PH, Yang RH, Jin H et al. Normobaric hypoxia stimulates endothelin-1 gene expression in the rat. *Am J Physiol* 1992; 263(6 Pt 2):R1260-R1264.
- (82) Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T et al. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161(2):859-864.
- (83) Hu RM, Levin ER, Pedram A, Frank HJ. Insulin stimulates production and secretion of endothelin from bovine endothelial cells. *Diabetes* 1993; 42(2):351-358.
- (84) Borcsok I, Schairer HU, Sommer U, Wakley GK, Schneider U, Geiger F et al. Glucocorticoids regulate the expression of the human osteoblastic endothelin A receptor gene. *J Exp Med* 1998; 188(9):1563-1573.

- (85) Yu WJ, Tomlinson B, Cheng JT. Regulation of endothelin-1 production in deoxycorticosterone acetate- salt-treated endothelial cells. *Pharmacology* 2002; 64(4):169-175.
- (86) Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85(2):587-590.
- (87) Prins BA, Hu RM, Nazario B, Pedram A, Frank HJ, Weber MA et al. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269(16):11938-11944.
- (88) Malek A, Izumo S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* 1992; 263(2 Pt 1):C389-C396.
- (89) Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER. Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochem J* 1998; 330 ( Pt 3):1097-1105.
- (90) Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, Wood E, Corder R, Vane JR. Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(14):6344-6348.
- (91) Saito Y, Nakao K, Shirakami G, Jougasaki M, Yamada T, Itoh H et al. Detection and characterization of endothelin-1-like immunoreactivity in rat plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163(3):1512-1516.
- (92) Battistini B, D'Orleans-Juste P, Sirois P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 1993; 68(6):600-628.
- (93) Xuan YT, Whorton AR, Shearer-Poor E, Boyd J, Watkins WD. Determination of immunoreactive endothelin in medium from cultured endothelial cells and human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164(1):326-332.
- (94) Naruse M, Naruse K, Kurimoto F, Horiuchi J, Tsuchiya K, Kawana M et al. Radioimmunoassay for endothelin and immunoreactive endothelin in culture medium of bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160(2):662-668.
- (95) Edwards RM, Trizna W, Ohlstein EH. Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol* 1990; 259(2 Pt 2):F217-F221.
- (96) Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ et al. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267(23):16066-16068.
- (97) Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S. Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke* 1991; 22(3):378-383.

- (98) Matsuura T, Miura K, Ebara T, Yukimura T, Yamanaka S, Kim S et al. Renal vascular effects of the selective endothelin receptor antagonists in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 1997; 122(1):81-86.
- (99) Lundberg JM, Ahlborg G, Hemsén A, Nisell H, Lunell NO, Pernow J et al. Evidence for release of endothelin-1 in pigs and humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7:S350-S353.
- (100) Rimar S, Gillis CN. Differential uptake of endothelin-1 by the coronary and pulmonary circulations. *J Appl Physiol* 1992; 73(2):557-562.
- (101) Anggard E, Galton S, Rae G, Thomas R, McLoughlin L, de Nucci G et al. The fate of radioiodinated endothelin-1 and endothelin-3 in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S46-S49.
- (102) Sirvio ML, Metsarinne K, Saijonmaa O, Fyhrquist F. Tissue distribution and half-life of <sup>125</sup>I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 167(3):1191-1195.
- (103) Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000; 275(23):17596-17604.
- (104) Kelland NF, Kuc RE, McLean DL, Azfer A, Bagnall AJ, Gray GA et al. Endothelial cell-specific ETB receptor knockout: autoradiographic and histological characterisation and crucial role in the clearance of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88(6):644-651.
- (105) Chun M, Lin HY, Henis YI, Lodish HF. Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. Endothelin remains intact and bound to the ETA receptor. *J Biol Chem* 1995; 270(18):10855-10860.
- (106) Bermek H, Peng KC, Angelova K, Ergul A, Puett D. Endothelin degradation by vascular smooth muscle cells. *Regul Pept* 1996; 66(3):155-162.
- (107) Masaki T, Vane JR, Vanhoutte PM. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46(2):137-142.
- (108) Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54(2):219-226.
- (109) Davenport AP, D'Orleans-Juste P, Godfraind T, Maguire JJ, Ohlstein EH, Ruffolo R.R. Endothelin receptors, introductory chapter. <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=21> . 20-11-2008. IUPHAR database (IUPHAR-DB). 31-3-2011. Ref Type: Electronic Citation
- (110) Douglas SA, Beck GR, Jr., Elliott JD, Ohlstein EH. Pharmacologic evidence for the presence of three functional endothelin receptor subtypes in rabbit saphenous vein. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 Suppl 3:S163-S168.

- (111) Mizuguchi T, Nishiyama M, Moroi K, Tanaka H, Saito T, Masuda Y et al. Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br J Pharmacol* 1997; 120(8):1427-1430.
- (112) Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993; 268(25):19126-19133.
- (113) Kumar CS, Nuthulaganti P, Pullen M, Nambi P. Novel endothelin receptors in the follicular membranes of *Xenopus laevis* oocytes mediate calcium responses by signal transduction through gap junctions. *Mol Pharmacol* 1993; 44(1):153-157.
- (114) Braasch I, Volf JN, Scharl M. The endothelin system: evolution of vertebrate-specific ligand-receptor interactions by three rounds of genome duplication. *Mol Biol Evol* 2009; 26(4):783-799.
- (115) Hyndman KA, Miyamoto MM, Evans DH. Phylogeny, taxonomy, and evolution of the endothelin receptor gene family. *Mol Phylogenet Evol* 2009; 52(3):677-687.
- (116) Adachi M, Yang YY, Furuichi Y, Miyamoto C. Cloning and characterization of cDNA encoding human A-type endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180(3):1265-1272.
- (117) Saito Y, Mizuno T, Itakura M, Suzuki Y, Ito T, Hagiwara H et al. Primary structure of bovine endothelin ETB receptor and identification of signal peptidase and metal proteinase cleavage sites. *J Biol Chem* 1991; 266(34):23433-23437.
- (118) Mizuno T, Saito Y, Itakura M, Ito F, Ito T, Moriyama EN et al. Structure of the bovine ETB endothelin receptor gene. *Biochem J* 1992; 287 ( Pt 1):305-309.
- (119) Nakamuta M, Takayanagi R, Sakai Y, Sakamoto S, Hagiwara H, Mizuno T et al. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177(1):34-39.
- (120) Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S et al. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 1993; 268(5):3463-3470.
- (121) Hayzer DJ, Rose PM, Lynch JS, Webb ML, Kienzle BK, Liu EC et al. Cloning and expression of a human endothelin receptor: subtype A. *Am J Med Sci* 1992; 304(4):231-238.
- (122) Hagiwara H, Kozuka M, Sakaguchi H, Eguchi S, Ito T, Hirose S. Separation and purification of 34- and 52-kDa species of bovine lung endothelin receptors and identification of the 34-kDa species as a degradation product. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7:S117-S118.

- (123) Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takawa Y, Yanagisawa H, Masaki T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178(2):656-663.
- (124) Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F. Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* 1993; 132(2):524-529.
- (125) Mattoli S, Soloperto M, Mezzetti M, Fasoli A. Mechanisms of calcium mobilization and phosphoinositide hydrolysis in human bronchial smooth muscle cells by endothelin 1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5(5):424-430.
- (126) Hashido K, Gamou T, Adachi M, Tabuchi H, Watanabe T, Furuichi Y et al. Truncation of N-terminal extracellular or C-terminal intracellular domains of human ETA receptor abrogated the binding activity to ET-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187(3):1241-1248.
- (127) Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Nakao K, Toyo-oka T, Yano M et al. The ligand-receptor interactions of the endothelin systems are mediated by distinct "message" and "address" domains. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S113-S116.
- (128) Maguire JJ, Davenport AP. ETA receptor-mediated constrictor responses to endothelin peptides in human blood vessels in vitro. *Br J Pharmacol* 1995; 115(1):191-197.
- (129) Panek RL, Major TC, Hingorani GP, Doherty AM, Taylor DG, Rapundalo ST. Endothelin and structurally related analogs distinguish between endothelin receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183(2):566-571.
- (130) de Oliveira AM, Viswanathan M, Capsoni S, Heemskerk FM, Correa FM, Saavedra JM. Characterization of endothelinA receptors in cerebral and peripheral arteries of the rat. *Peptides* 1995; 16(1):139-144.
- (131) Russell A, Watts S. Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294(2):598-604.
- (132) Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994; 344(8926):852-854.
- (133) Gardiner SM, Compton AM, Bennett T. Regional hemodynamic effects of endothelin-1 in conscious, unrestrained, Wistar rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S202-S204.
- (134) Wu-Wong JR, Chiou WJ, Dickinson R, Opgenorth TJ. Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells. *Biochem J* 1997; 328 ( Pt 3):733-737.
- (135) Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, Abe Y, Masaki T, Goto K. Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem* 1995; 228(1):102-108.

- (136) Aramori I, Nakanishi S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1992; 267(18):12468-12474.
- (137) Gohla A, Offermanns S, Wilkie TM, Schultz G. Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 1999; 274(25):17901-17907.
- (138) Resink TJ, Scott-Burden T, Buhler FR. Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157(3):1360-1368.
- (139) Schramek H, Wang Y, Konieczkowski M, Rose PM, Sedor JR, Dunn MJ. Endothelin-1 stimulates cytosolic phospholipase A2 in Chinese hamster ovary cells stably expressing the human ETA or ETB receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199(2):992-997.
- (140) Wilkes LC, Patel V, Purkiss JR, Boarder MR. Endothelin-1 stimulated phospholipase D in A10 vascular smooth muscle derived cells is dependent on tyrosine kinase. Evidence for involvement in stimulation of mitogenesis. *FEBS Lett* 1993; 322(2):147-150.
- (141) Meyer M, Lehnart S, Pieske B, Schlottauer K, Munk S, Holubarsch C et al. Influence of endothelin 1 on human atrial myocardium--myocardial function and subcellular pathways. *Basic Res Cardiol* 1996; 91(1):86-93.
- (142) Van Renterghem C, Vigne P, Barhanin J, Schmid-Alliana A, Frelin C, Lazdunski M. Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157(3):977-985.
- (143) Thai TL, Arendshorst WJ. ADP-ribosyl cyclase and ryanodine receptors mediate endothelin ETA and ETB receptor-induced renal vasoconstriction in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295(2):F360-F368.
- (144) Curtis TM, Scholfield CN. Transient Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> currents with endothelin in isolated arteriolar smooth muscle cells of the choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(8):2279-2285.
- (145) Lonchamp MO, Pinelis S, Goulin J, Chabrier PE, Braquet P. Proliferation and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activation by endothelin in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 1991; 4(9):776-779.
- (146) Shimoda LA, Sylvester JT, Sham JS. Inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> current in rat intrapulmonary arterial myocytes by endothelin-1. *Am J Physiol* 1998; 274(5 Pt 1):L842-L853.
- (147) Imig JD, Pham BT, LeBlanc EA, Reddy KM, Falck JR, Inscho EW. Cytochrome P450 and cyclooxygenase metabolites contribute to the endothelin-1 afferent arteriolar vasoconstrictor and calcium responses. *Hypertension* 2000; 35(1 Pt 2):307-312.

- (148) Just A, Whitten CL, Arendshorst WJ. Reactive oxygen species participate in acute renal vasoconstrictor responses induced by ETA and ETB receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(4):F719-F728.
- (149) Loutzenhiser R, Epstein M, Hayashi K, Horton C. Direct visualization of effects of endothelin on the renal microvasculature. *Am J Physiol* 1990; 258(1 Pt 2):F61-F68.
- (150) Takenaka T, Forster H, Epstein M. Protein kinase C and calcium channel activation as determinants of renal vasoconstriction by angiotensin II and endothelin. *Circ Res* 1993; 73(4):743-750.
- (151) Pollock DM, Jenkins JM, Cook AK, Imig JD, Inscho EW. L-type calcium channels in the renal microcirculatory response to endothelin. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288(4):F771-F777.
- (152) Fretschner M, Endlich K, Gulbins E, Lang RE, Schlottmann K, Steinhausen M. Effects of endothelin on the renal microcirculation of the split hydronephrotic rat kidney. *Ren Physiol Biochem* 1991; 14(3):112-127.
- (153) Haynes WG, Ferro CE, Webb DJ. Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 Suppl 3:S183-S185.
- (154) Hori S, Komatsu Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology* 1992; 130(4):1885-1895.
- (155) Wendel M, Knels L, Kummer W, Koch T. Distribution of Endothelin Receptor Subtypes ETA and ETB in the Rat Kidney. *J Histochem Cytochem* 2006.
- (156) Ninomiya H, Yu XY, Uchida Y, Hasegawa S, Spannhake EW. Specific binding of endothelin-1 to canine tracheal epithelial cells in culture. *Am J Physiol* 1995; 268(3 Pt 1):L424-L431.
- (157) Plant TD, Zollner C, Kepura F, Mousa SS, Eichhorst J, Schaefer M et al. Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. *Mol Pain* 2007; 3:35.
- (158) Irons CE, Murray SF, Glembotski CC. Identification of the receptor subtype responsible for endothelin-mediated protein kinase C activation and atrial natriuretic factor secretion from atrial myocytes. *J Biol Chem* 1993; 268(31):23417-23421.
- (159) Sarri E, Picatoste F, Claro E. Histamine H1 and endothelin ETB receptors mediate phospholipase D stimulation in rat brain hippocampal slices. *J Neurochem* 1995; 65(2):837-841.

- (160) Tirapelli CR, Casolari DA, Yogi A, Montezano AC, Tostes RC, Legros E et al. Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K<sup>+</sup> channels in ETB-induced relaxation. *Br J Pharmacol* 2005; 146(6):903-912.
- (161) Hong SJ, Fong JC, Hwang JH. Possible mechanism of endothelin-induced Ca<sup>2+</sup> mobility in A7r5 cultured vascular smooth muscle cells. *Kaohsiung J Med Sci* 2002; 18(9):435-442.
- (162) Hyvelin JM, Guibert C, Marthan R, Savineau JP. Cellular mechanisms and role of endothelin-1-induced calcium oscillations in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol* 1998; 275(2 Pt 1):L269-L282.
- (163) Cavarape A, Endlich N, Assaloni R, Bartoli E, Steinhausen M, Parekh N et al. Rho-kinase inhibition blunts renal vasoconstriction induced by distinct signaling pathways in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(1):37-45.
- (164) Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou WF, Goligorsky MS. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269(34):21778-21785.
- (165) Gellai M, De Wolf R, Fletcher T, Nambi P. Contribution of endogenous endothelin-1 to the maintenance of vascular tone: role of nitric oxide. *Pharmacology* 1997; 55(6):299-308.
- (166) Lal H, Woodward B, Williams KI. Investigation of the contributions of nitric oxide and prostaglandins to the actions of endothelins and sarafotoxin 6c in rat isolated perfused lungs. *Br J Pharmacol* 1996; 118(8):1931-1938.
- (167) Strachan FE, Spratt JC, Wilkinson IB, Johnston NR, Gray GA, Webb DJ. Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men. *Hypertension* 1999; 33(1 Pt 2):581-585.
- (168) Hirata Y, Matsuoka H, Kimura K, Sugimoto T, Hayakawa H, Suzuki E et al. Role of endothelium-derived relaxing factor in endothelin-induced renal vasoconstriction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7:S169-S171.
- (169) Cao LQ, Banks RO. Cardiorenal actions of endothelin, Part II: Effects of cyclooxygenase inhibitors. *Life Sci* 1990; 46(8):585-590.
- (170) Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199(3):1461-1465.
- (171) Morbidelli L, Orlando C, Maggi CA, Ledda F, Ziche M. Proliferation and migration of endothelial cells is promoted by endothelins via activation of ETB receptors. *Am J Physiol* 1995; 269(2 Pt 2):H686-H695.

- (172) Wang Y, Rose PM, Webb ML, Dunn MJ. Endothelins stimulate mitogen-activated protein kinase cascade through either ETA or ETB. *Am J Physiol* 1994; 267(4 Pt 1):C1130-C1135.
- (173) Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* 1997; 272(27):17097-17103.
- (174) Murakoshi N, Miyauchi T, Kakinuma Y, Ohuchi T, Goto K, Yanagisawa M et al. Vascular endothelin-B receptor system in vivo plays a favorable inhibitory role in vascular remodeling after injury revealed by endothelin-B receptor-knockout mice. *Circulation* 2002; 106(15):1991-1998.
- (175) Durham SK, Goller NL, Lynch JS, Fisher SM, Rose PM. Endothelin receptor B expression in the rat and rabbit lung as determined by in situ hybridization using nonisotopic probes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S1-S3.
- (176) Nagase T, Aoki T, Oka T, Fukuchi Y, Ouchi Y. ET-1-induced bronchoconstriction is mediated via ETB receptor in mice. *J Appl Physiol* 1997; 83(1):46-51.
- (177) Vikman P, Beg S, Khurana TS, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. Gene expression and molecular changes in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage in the rat. *J Neurosurg* 2006; 105(3):438-444.
- (178) Bacon CR, Davenport AP. Endothelin receptors in human coronary artery and aorta. *Br J Pharmacol* 1996; 117(5):986-992.
- (179) Lysko PG, Elshourbagy NA, Pullen M, Nambi P. Developmental expression of endothelin receptors in cerebellar neurons differentiating in culture. *Brain Res Dev Brain Res* 1995; 88(1):96-101.
- (180) Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Jensen N, Schilling L, Kratzin H, Siren AL et al. ETA and ETB receptor antagonists synergistically increase extracellular endothelin-1 levels in primary rat astrocyte cultures. *Brain Res* 1998; 785(2):253-261.
- (181) Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol* 2002; 22(2):207-226.
- (182) Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M et al. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* 2004; 279(26):27679-27687.
- (183) Evans NJ, Walker JW. Endothelin receptor dimers evaluated by FRET, ligand binding, and calcium mobilization. *Biophys J* 2008; 95(1):483-492.

- (184) Zeng C, Asico LD, Yu C, Villar VA, Shi W, Luo Y et al. Renal D3 dopamine receptor stimulation induces natriuresis by endothelin B receptor interactions. *Kidney Int* 2008; 74(6):750-759.
- (185) Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC. Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest* 1989; 83(1):336-342.
- (186) Thai TL, Arendshorst WJ. Mice lacking the ADP ribosyl cyclase CD38 exhibit attenuated renal vasoconstriction to angiotensin II, endothelin-1, and norepinephrine. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(1):F169-F176.
- (187) Hofman C, Rosenthal T, Winaver J, Rubinstein I, Ramadan R, Stern N et al. Renal and systemic effects of endothelin-1 in diabetic-hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2011; 33(7):444-454.
- (188) Endlich K, Hoffend J, Steinhausen M. Localization of endothelin ETA and ETB receptor-mediated constriction in the renal microcirculation of rats. *J Physiol* 1996; 497 ( Pt 1):211-218.
- (189) Cavarape A, Bartoli E. Effects of BQ-123 on systemic and renal hemodynamic responses to endothelin-1 in the rat split hydronephrotic kidney. *J Hypertens* 1998; 16(10):1449-1458.
- (190) King AJ, Brenner BM, Anderson S. Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am J Physiol* 1989; 256(6 Pt 2):F1051-F1058.
- (191) Munger KA, Takahashi K, Awazu M, Frazer M, Falk SA, Conger JD et al. Maintenance of endothelin-induced renal arteriolar constriction in rats is cyclooxygenase dependent. *Am J Physiol* 1993; 264(4 Pt 2):F637-F644.
- (192) Stacy DL, Scott JW, Granger JP. Control of renal function during intrarenal infusion of endothelin. *Am J Physiol* 1990; 258(5 Pt 2):F1232-F1236.
- (193) Just A, Olson AJ, Arendshorst WJ. Dual constrictor and dilator actions of ET(B) receptors in the rat renal microcirculation: interactions with ET(A) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(4):F660-F668.
- (194) Wellings RP, Corder R, Warner TD, Cristol JP, Thiemermann C, Vane JR. Evidence from receptor antagonists of an important role for ETB receptor-mediated vasoconstrictor effects of endothelin-1 in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 1994; 111(2):515-520.
- (195) Goddard J, Johnston NR, Hand MF, Cumming AD, Rabelink TJ, Rankin AJ et al. Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation* 2004; 109(9):1186-1193.
- (196) Qiu C, Samsell L, Baylis C. Actions of endogenous endothelin on glomerular hemodynamics in the rat. *Am J Physiol* 1995; 269(2 Pt 2):R469-R473.

- (197) Montanari A, Biggi A, Carra N, Fasoli E, Calzolari M, Corsini F et al. Endothelin-A blockade attenuates systemic and renal hemodynamic effects of L-NAME in humans. *Hypertension* 2000; 35(1 Pt 2):518-523.
- (198) Bohm F, Pernow J, Lindstrom J, Ahlborg G. ETA receptors mediate vasoconstriction, whereas ETB receptors clear endothelin-1 in the splanchnic and renal circulation of healthy men. *Clin Sci (Lond)* 2003; 104(2):143-151.
- (199) Pollock DM. Contrasting pharmacological ETB receptor blockade with genetic ETB deficiency in renal responses to big ET-1. *Physiol Genomics* 2001; 6(1):39-43.
- (200) Simonson MS. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev* 1993; 73(2):375-411.
- (201) Ito S, Juncos LA, Nushiro N, Johnson CS, Carretero OA. Endothelium-derived relaxing factor modulates endothelin action in afferent arterioles. *Hypertension* 1991; 17(6 Pt 2):1052-1056.
- (202) Schneider MP, Inscho EW, Pollock DM. Attenuated vasoconstrictor responses to endothelin in afferent arterioles during a high-salt diet. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(4):F1208-F1214.
- (203) Saito M, Homma S, Yamatsu I, Sato M, Ohshima N. Visualization of renal microcirculation in isolated Munich-Wistar rat kidneys: effects of endothelin-1 on renal hemodynamic activity. *Jpn J Pharmacol* 1994; 66(2):221-229.
- (204) Gonzalez MR, Villa E, Garcia-Robles R, Angulo J, Peiro C, Marin J et al. Effects of indomethacin and iloprost on contraction of the afferent arterioles by endothelin-1 in juxtamedullary nephron preparations from normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28(6):809-816.
- (205) Lanese DM, Yuan BH, McMurtry IF, Conger JD. Comparative sensitivities of isolated rat renal arterioles to endothelin. *Am J Physiol* 1992; 263(5 Pt 2):F894-F899.
- (206) Inscho EW, Imig JD, Cook AK, Pollock DM. ETA and ETB receptors differentially modulate afferent and efferent arteriolar responses to endothelin. *Br J Pharmacol* 2005; 146(7):1019-1026.
- (207) Takenaka T, Epstein M, Forster H, Landry DW, Iijima K, Goligorsky MS. Attenuation of endothelin effects by a chloride channel inhibitor, indanyloxyacetic acid. *Am J Physiol* 1992; 262(5 Pt 2):F799-F806.
- (208) Bloom IT, Bentley FR, Wilson MA, Garrison RN. In vivo effects of endothelin on the renal microcirculation. *J Surg Res* 1993; 54(4):274-280.
- (209) Imig JD, Breyer MD, Breyer RM. Contribution of prostaglandin EP(2) receptors to renal microvascular reactivity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(3):F415-F422.

- (210) Kirton CA, Loutzenhiser R. Alterations in basal protein kinase C activity modulate renal afferent arteriolar myogenic reactivity. *Am J Physiol* 1998; 275(2 Pt 2):H467-H475.
- (211) De Leon H, Garcia R. Characterization of endothelin receptor subtypes in isolated rat renal preglomerular microvessels. *Regul Pept* 1995; 60(1):1-8.
- (212) Edwards RM, Trizna W. Characterization of <sup>125</sup>I-endothelin-1 binding to rat and rabbit renal microvasculature. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274(3):1084-1089.
- (213) Kuc R, Davenport AP. Comparison of endothelin-A and endothelin-B receptor distribution visualized by radioligand binding versus immunocytochemical localization using subtype selective antisera. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44 Suppl 1:S224-S226.
- (214) Lanese DM, Conger JD. Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. *J Clin Invest* 1993; 91(5):2144-2149.
- (215) Denton KM, Anderson WP. Vascular actions of endothelin in the rabbit kidney. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1990; 17(12):861-872.
- (216) Heller J, Kramer HJ, Horacek V. Action of endothelin-1 on glomerular haemodynamics in the dog: lack of direct effects on glomerular ultrafiltration coefficient. *Clin Sci (Lond)* 1996; 90(5):385-391.
- (217) Gariépy CE, Cass DT, Yanagisawa M. Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(2):867-872.
- (218) Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A et al. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994; 79(7):1267-1276.
- (219) Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, Dewit D, Yanagisawa M et al. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 1994; 79(7):1257-1266.
- (220) Gariépy CE, Williams SC, Richardson JA, Hammer RE, Yanagisawa M. Transgenic expression of the endothelin-B receptor prevents congenital intestinal aganglionosis in a rat model of Hirschsprung disease. *J Clin Invest* 1998; 102(6):1092-1101.
- (221) Bontscho J. Angiotensin-II-induzierte Stickstoffmonoxid-Freisetzung in afferenten Arteriolen der Maus. Johannes-Müller-Centrum für Physiologie, Medizinische Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin, 2006. Ref Type: Thesis/Dissertation

- (222) Lai EY, Onozato ML, Solis G, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Myogenic responses of mouse isolated perfused renal afferent arterioles: effects of salt intake and reduced renal mass. *Hypertension* 2010; 55(4):983-989.
- (223) Ito S, Arima S, Ren YL, Juncos LA, Carretero OA. Endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide modulates angiotensin II action in the isolated microperfused rabbit afferent but not efferent arteriole. *J Clin Invest* 1993; 91(5):2012-2019.
- (224) Patzak A, Lai EY, Mrowka R, Steege A, Persson PB, Persson AE. AT1 receptors mediate angiotensin II-induced release of nitric oxide in afferent arterioles. *Kidney Int* 2004; 66(5):1949-1958.
- (225) Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, Schnermann J. Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(3):F339-F351.
- (226) Casellas D, Navar LG. In vitro perfusion of juxtamedullary nephrons in rats. *Am J Physiol* 1984; 246(3 Pt 2):F349-F358.
- (227) Steinhausen M, Snoei H, Parekh N, Baker R, Johnson PC. Hydronephrosis: a new method to visualize vas afferens, efferens, and glomerular network. *Kidney Int* 1983; 23(6):794-806.
- (228) Deen WM, Troy JL, Robertson CR, Brenner BM. Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. IV. Determination of the ultrafiltration coefficient. *J Clin Invest* 1973; 52(6):1500-1508.
- (229) Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Kubota E, Honda M, Tokuyama H et al. Distinct modulation of superficial and juxtamedullary arterioles by prostaglandin in vivo. *Hypertens Res* 2002; 25(6):901-910.
- (230) Steinhausen M, Ballantyne D, Fretschner M, Hoffend J, Parekh N. Different responses of cortical and juxtamedullary arterioles to norepinephrine and angiotensin II. *Kidney Int Suppl* 1990; 30:S55-S59.
- (231) Rubinstein I, Gurbanov K, Hoffman A, Better OS, Winaver J. Differential effect of endothelin-1 on renal regional blood flow: role of nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 Suppl 3:S208-S210.
- (232) Gurbanov K, Rubinstein I, Hoffman A, Abassi Z, Better OS, Winaver J. Differential regulation of renal regional blood flow by endothelin-1. *Am J Physiol* 1996; 271(6 Pt 2):F1166-F1172.
- (233) Sanchez-Ferrer CF, Roman RJ, Harder DR. Pressure-dependent contraction of rat juxtamedullary afferent arterioles. *Circ Res* 1989; 64(4):790-798.
- (234) Komlosi P, Peti-Peterdi J, Fuson AL, Fintha A, Rosivall L, Bell PD. Macula densa basolateral ATP release is regulated by luminal [NaCl] and dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(6):F1054-F1058.

- (235) Ren Y, Garvin JL, Liu R, Carretero OA. Role of macula densa adenosine triphosphate (ATP) in tubuloglomerular feedback. *Kidney Int* 2004; 66(4):1479-1485.
- (236) Ren Y, Garvin JL, Liu R, Carretero OA. Possible mechanism of efferent arteriole (Ef-Art) tubuloglomerular feedback. *Kidney Int* 2007; 71(9):861-866.
- (237) Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Efferent arteriole tubuloglomerular feedback in the renal nephron. *Kidney Int* 2001; 59(1):222-229.
- (238) Patzak A, Kleinmann F, Lai EY, Kupsch E, Skelweit A, Mrowka R. Nitric oxide counteracts angiotensin II induced contraction in efferent arterioles in mice. *Acta Physiol Scand* 2004; 181(4):439-444.
- (239) Yuan BH, Robinette JB, Conger JD. Effect of angiotensin II and norepinephrine on isolated rat afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol* 1990; 258(3 Pt 2):F741-F750.
- (240) Patzak A, Bontscho J, Lai E, Kupsch E, Skelweit A, Richter CM et al. Angiotensin II sensitivity of afferent glomerular arterioles in endothelin-1 transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(12):2681-2689.
- (241) Garipey CE, Cass DT, Yanagisawa M. Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(2):867-872.
- (242) Takimoto M, Inui T, Okada T, Urade Y. Contraction of smooth muscle by activation of endothelin receptors on autonomic neurons. *FEBS Lett* 1993; 324(3):277-282.
- (243) Isaka M, Kudo A, Imamura M, Kawakami H, Yasuda K. Endothelin receptors, localized in sympathetic nerve terminals of the heart, modulate norepinephrine release and reperfusion arrhythmias. *Basic Res Cardiol* 2007; 102(2):154-162.
- (244) Schildroth J, Rettig-Zimmermann J, Kalk P, Steege A, Fahling M, Sendeski M et al. Endothelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2010.
- (245) Perry MG, Molero MM, Giulumian AD, Katakam PV, Pollock JS, Pollock DM et al. ET(B) receptor-deficient rats exhibit reduced contraction to ET-1 despite an increase in ET(A) receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(6):H2680-H2686.
- (246) Davenport AP, Kuc RE. Down-regulation of ETA Receptors in ETB Receptor-deficient Mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44 Suppl 1:S276-S278.
- (247) Kuc RE, Maguire JJ, Davenport AP. Quantification of endothelin receptor subtypes in peripheral tissues reveals downregulation of ET(A) receptors in ET(B)-deficient mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231(6):741-745.

- (248) Taylor TA, Garipey CE, Pollock DM, Pollock JS. Unique endothelin receptor binding in kidneys of ETB receptor deficient rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284(3):R674-R681.
- (249) Kuc RE, Davenport AP. Endothelin-A-receptors in human aorta and pulmonary arteries are downregulated in patients with cardiovascular disease: an adaptive response to increased levels of endothelin-1? *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36(5 Suppl 1):S377-S379.
- (250) Telemaque-Potts S, Kuc RE, Yanagisawa M, Davenport AP. Tissue-specific modulation of endothelin receptors in a rat model of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36(5 Suppl 1):S122-S123.
- (251) Davenport AP, Kuc RE, Maguire JJ, Harland SP. ETA receptors predominate in the human vasculature and mediate constriction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 Suppl 3:S265-S267.
- (252) Pollock DM, Opgenorth TJ. Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ETA receptor activation. *Am J Physiol* 1993; 264(1 Pt 2):R222-R226.
- (253) Gulbins E, Hoffend J, Zou AP, Dietrich MS, Schlottmann K, Cavarape A et al. Endothelin and endothelium-derived relaxing factor control of basal renovascular tone in hydronephrotic rat kidneys. *J Physiol* 1993; 469:571-582.
- (254) Brooks DP, DePalma PD, Pullen M, Elliott JD, Ohlstein EH, Nambi P. SB 234551, a novel endothelin--A receptor antagonist, unmasks endothelin-induced renal vasodilatation in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1:S339-S341.
- (255) Kaasjager KA, Shaw S, Koomans HA, Rabelink TJ. Role of endothelin receptor subtypes in the systemic and renal responses to endothelin-1 in humans. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8(1):32-39.
- (256) Harris PJ, Zhuo J, Mendelsohn FA, Skinner SL. Haemodynamic and renal tubular effects of low doses of endothelin in anaesthetized rats. *J Physiol* 1991; 433:25-39.
- (257) Ono N, Matsui T, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Satoh S. Renal effects of endothelin in anesthetized rabbits. *Eur J Pharmacol* 1998; 359(2-3):177-184.
- (258) Brooks DP, DePalma PD, Pullen M, Nambi P. Characterization of canine renal endothelin receptor subtypes and their function. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268(3):1091-1097.
- (259) Evans RG, Bergstrom G, Cotterill E, Anderson WP. Renal haemodynamic effects of endothelin-1 and the ETA/ETB antagonist TAK-044 in anaesthetized rabbits. *J Hypertens* 1998; 16(12 Pt 2):1897-1905.

- (260) Cavarape A, Endlich K, Feletto F, Parekh N, Bartoli E, Steinhausen M. Contribution of endothelin receptors in renal microvessels in acute cyclosporine-mediated vasoconstriction in rats. *Kidney Int* 1998; 53(4):963-969.
- (261) Bagnall AJ, Kelland NF, Gulliver-Sloan F, Davenport AP, Gray GA, Yanagisawa M et al. Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *Hypertension* 2006; 48(2):286-293.
- (262) Arima S, Ren Y, Juncos LA, Carretero OA, Ito S. Glomerular prostaglandins modulate vascular reactivity of the downstream efferent arterioles. *Kidney Int* 1994; 45(3):650-658.

## 8 Anhang

### 8.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Janice Schildroth, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktion von Endothelin-A – und Endothelin-B-Rezeptoren bei der Endothelin-1 induzierten Antwort glomerulärer Arteriolen der Maus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Bochum, 14.10.2013

Janice Schildroth

## **8.2 Lebenslauf**

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

## 8.3 Publikationen

### 8.3.1 Publikation

**J. Schildroth**, J. Rettig-Zimmermann, P. Kalk, A. Steege, M. Föhling, M. Sendeski, A. Paliege, E. Y. Lai, S. Bachmann, P.B. Persson, B. Hoher and A. Patzak: Endothelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010

### 8.3.2 Vorträge, Poster

**J. Schildroth**, J. Rettig, A. Steege, P. Kalk, B. Hoher, P.B. Persson, A. Patzak: Effect of ET-1 on afferent and efferent renal arterioles in ET<sub>B</sub>-receptor knockout mice. 86. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Hannover 2007; Abstract in *Eur.J.Physiol. (Pflüger Arch., Suppl.)*, 2007, Vortrag

**J. Schildroth**, J.Rettig, A. Steege, P. Kalk, P.B. Persson, B. Hoher, A. Patzak: Effect of ET-1 in renal arterioles of ET<sub>B</sub>-receptor deficient mice. Rostocker Gespräche, Rostock 2007; Vortrag

**J. Schildroth**, A. Steege, P. Kalk, B. Hoher, P.B. Persson, A. Patzak: Effect of ET-1 on afferent and efferent renal arterioles in ET<sub>B</sub>-receptor knockout mice. FASEB Summer Research Conference, Vermont, USA 2007, Poster

**J. Schildroth**, M. Sendeski, J. Rettig, A. Steege, P. Kalk, P.B. Persson, B. Hoher, A. Patzak: Effect of ET-1 on afferent arterioles of ET<sub>B</sub>-receptor deficient mice. *Experimental Biology*, San Diego, USA 2008, Poster

J. Rettig-Zimmermann, **J. Schildroth**, P. Kalk, A. Steege, M. Föhling, P.B. Persson, B. Hoher and A. Patzak: Expression of endothelin, endothelin type A receptor, isoforms of nitric oxide synthase, and angiotensin receptors in endothelin type B receptor deficient mice. *Experimental Biology*, New Orleans, 2009, Poster

**Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

**J. Schildroth**, J. Rettig-Zimmermann, P. Kalk, A. Steege, M. Fähling, M. Sendeski, A. Paliege, E. Y. Lai, S. Bachmann, P.B. Persson, B. Hoher and A. Patzak: Enodthelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. Nephrology Dialysis Transplantation 2010.

Experimente, Analyse, Statistik, Textentwurf, Gesamtbeitrag: 70%.

Berlin, 15.10.2013

Prof. Dr. med. Andreas Patzak  
Betreuender Hochschullehrer

Stempel

Janice Schildroth  
Doktorandin

#### 8.4 Danksagung

Insbesondere gilt meine Dankbarkeit Herrn Prof. Dr. **Andreas Patzak**, der mir umfassende Einblicke in die wissenschaftliche Praxis ermöglichte. Besonders möchte ich mich für die anregenden Denkanstöße, die Möglichkeit des Gedankenaustausches mit anerkannten Wissenschaftlern auf diesem Forschungsgebiet und für die Geduld bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. **Berthold Hocher** und Herrn PD. Dr. **Philipp Kalk** für die konstruktiven Experimentvorschläge und die Züchtung der *rescued-ET<sub>B</sub>-R*-defizienten Mäuse bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. **Pontus B. Persson** für die Möglichkeit, im Institut Versuche durchzuführen.

Dr. **Andreas Steege** für die nachvollziehbaren Erklärungen und kritischen Äußerungen.

Ein riesengroßer Dank geht an **meine Eltern**, für die vielen aufmunternden Worte, die moralische Unterstützung, das Verständnis, die Geduld und nicht zuletzt ihre Beharrlichkeit.