

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Differentielle Expression von adrenergen Rezeptoren in
arteriellen Gefäßen von Mausnieren und ihr Einfluss auf den
Gefäßtonus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Olivia Moede

aus Anklam

Datum der Promotion: 13.12.2019

Vorwort

Ein Teil der in der vorliegenden Dissertationsschrift dargestellten Ergebnisse wurde 2015 im Artikel „Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/re-oxygenation in renal interlobar arteries“ von J. Kaufmann, P. Martinka, O. Moede, M. Sendeski, A. Steege, M. Föhling, M. Hultström, M. Gaestel, I. C. Moraes-Silva, T. Nikitina, Z. Z. Liu, O. Zavaritskaya und A. Patzak in der *Acta Physiologica (Oxf.)* 213: 920-932, 2015, veröffentlicht. Dies betrifft die Expressionsdaten für die adrenergen Rezeptoren der Interlobararterien sowie die funktionelle Antwort auf Noradrenalin.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Zusammenfassung	7
1.1 Abstrakt	
1.2 Abstract	
2. Einleitung	10
2.1 Einführung in die Thematik.....	10
2.2 Literaturüberblick	10
2.2.1 Das sympathische Nervensystem und die Niere	10
2.2.2 Beeinflussung der Nierendurchblutung durch das sympathische Nervensystem.....	13
2.2.3 Pathophysiologische Mechanismen	13
2.2.3.1 Das akute Nierenversagen.....	14
2.2.3.2 Die chronische Niereninsuffizienz	18
2.2.4 Noradrenalin – Synthese, Vorkommen und Funktion	20
2.2.5 Die adrenergen Rezeptoren – Einteilung, Aufbau und Signalwege	20
2.2.5.1 Die α_1 -Rezeptoren.....	22
2.2.5.2 Die α_2 -Rezeptoren.....	24
2.2.5.3 Die β -Rezeptoren	25
2.2.6 Einfluss der verschiedenen adrenergen Rezeptoren auf den Gefäßtonus der Nierengefäße.....	28
2.3 Herleitung der Fragestellung	28
3. Material und Methoden	31
3.1 Versuchstiere.....	31
3.2 Isolierung und Lagerung der Gefäße für die Expressionsanalysen	31
3.2.1 Präparation der großen Nierenarterien.....	31
3.2.2 Präparation präglomerulärer Arteriolen zur RNA-Gewinnung.....	32
3.2.3 Präparation efferenter Arteriolen	33
3.3 Funktionelle Untersuchungen.....	33

3.3.1	Präparation, Perfusion und isotonische Untersuchung afferenter und efferenter Arteriolen.....	33
3.3.2	Kraftmessung an den großen Nierenarterien	36
3.4	RNA-Isolierung und Vervielfältigung der cDNA	37
3.4.1	Gewinnung und Quantifizierung der RNA.....	37
3.4.2	Synthese der cDNA.....	38
3.4.3	Real-time PCR.....	38
3.5	Erstellen der Standardkurven	42
3.5.1	PCR.....	42
3.5.2	Gel-Elektrophorese.....	43
3.5.3	Gel-Elution.....	44
3.5.4	Einbau der Templates in Plasmide (Ligation)	45
3.5.5	Transformation und Klonierung	45
3.5.6	PCR und Gel-Elektrophorese	46
3.5.7	Pelletieren der Kolonien	47
3.5.8	Miniprep.....	47
3.5.9	Überprüfung der Miniprep mit PCR und Gel-Elektrophorese.....	48
3.5.10	Real-time PCR und Erstellen der Standardkurven	48
3.6	Darstellung der Daten und statistische Auswertung	50
4.	Ergebnisse.....	52
4.1	Relative Expression der adrenergen Rezeptoren in den verschiedenen Gefäßabschnitten	52
4.1.1	Expression der adrenergen Rezeptoren in der Arteria interlobaris	52
4.1.2	Expression der adrenergen Rezeptoren in der Arteria arcuata	54
4.1.3	Expression der adrenergen Rezeptoren in den afferenten Arteriolen.....	55
4.1.4	Expression der adrenergen Rezeptoren in den efferenten Arteriolen.....	57
4.2	Expression der adrenergen Rezeptoren nach Hypoxie/Reoxygenierung	58
4.3	Funktionelle Untersuchungen der NierengefäÙe zur Ermittlung der Auswirkungen von Noradrenalin auf den GefäÙtonus	59
4.3.1	Einfluss von Noradrenalin auf den GefäÙtonus der Arteria interlobaris..	59
4.3.2	Einfluss von Noradrenalin auf den GefäÙtonus der afferenten Arteriolen.....	60
4.3.3	Einfluss von Noradrenalin auf den GefäÙtonus der efferenten Arteriolen.....	61

4.3.4	Vergleich der afferenten und efferenten Arteriolen	62
5.	Diskussion	64
5.1	Expression der adrenergen Rezeptoren in renalen Gefäßen	64
5.2	Vergleichende Darstellung der Rezeptorexpressionen und Funktion in der Aorta und in Mesenterialarterien.....	66
5.3	Expression nach Hypoxie/Reoxygenierung in den afferenten Arteriolen	69
5.4	Funktionelle Untersuchungen	71
5.5	Methodische Einschränkungen.....	72
5.6	Zusammenfassung	73
6.	Literaturübersicht	75
7.	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	96
7.1	Eidesstattliche Versicherung	96
7.2	Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	97
8.	Lebenslauf	98
9.	Publikationsliste	99
10.	Danksagung.....	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die AKIN-Stadien	14
Tabelle 2: Übersicht über einige selektive Agonisten und Antagonisten für die α_1 -Rezeptorsubtypen	23
Tabelle 3: Übersicht über einige selektive Agonisten und Antagonisten für die α_2 -Rezeptorsubtypen	25
Tabelle 4: Übersicht über einige selektive Agonisten und Antagonisten für die β -Rezeptorsubtypen	26
Tabelle 5: Gensequenzen der einzelnen Primer für die adrenergen Rezeptoren, β -Aktin und 18S RNA	41
Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Primereffizienzen für die adrenergen Rezep- toren und β -Aktin	50
Tabelle 7: Darstellung der p-Werte für die einzelnen Rezeptoren	59
Tabelle 8: Expression und Funktion der adrenergen Rezeptoren in der Aorta thoraci- ca und in der Mesenterialarterie	69

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die Adrenozeptoren	20
Abb. 2: Die Struktur des humanen β_2 -Rezeptors	22
Abb. 3: Wichtige Signalwege der α_1 -adrenergen Rezeptoren in der glatten Muskulatur	24
Abb. 4: Übersicht über die verschiedenen Signalwege der Adrenozeptoren im Endothel und in glatten Muskelzellen von Gefäßen	27
Abb. 5: Darstellung einer isoliert perfundierten afferenten Arteriole vor und nach Zugabe von Noradrenalin	35
Abb. 6: Exemplarische Darstellung der Amplifikationskurven aller neun Rezeptorgene sowie von β -Aktin	40
Abb. 7: Exemplarische Darstellung der Standardkurven	49
Abb. 8: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in der A. interlobaris	53
Abb. 9: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in der A. interlobaris unter Berücksichtigung der Primereffizienz	53
Abb. 10: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in der A. arcuata	54
Abb. 11: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in der A. arcuata unter Berücksichtigung der Primereffizienz	55
Abb. 12: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in den afferenten Arteriolen	56
Abb. 13: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in den afferenten Arteriolen unter Berücksichtigung der Primereffizienz	56
Abb. 14: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} in den efferenten Arteriolen	57
Abb. 15: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} in den efferenten Arteriolen unter Berücksichtigung der Primereffizienz	57
Abb. 16: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren der mit Hypoxie behandelten afferenten Arteriolen im Vergleich zur Expression der Kontrollgruppe	58
Abb. 17: Veränderung des Gefäßdurchmessers der Interlobararterie unter Kontrollbedingungen und nach Hypoxie/Reoxygenierung im Vergleich	60

Abb. 18: Veränderung des Gefäßdurchmessers der afferenten Arteriolen unter
Zugabe von Noradrenalin mit ansteigender Konzentration61

Abb. 19: Veränderung des Gefäßdurchmessers der efferenten Arteriolen unter
Zugabe von Noradrenalin mit ansteigender Konzentration62

Abb. 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Noradrenalin mit ansteigender
Konzentration für die afferenten und efferenten Arteriolen63

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AA	Arachidonsäure
AKIN	Acute Kidney Injury Network
Akt	Proteinkinase B
ANV	akutes Nierenversagen
AR	adrenerger Rezeptor
ATII	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CAMKK	calmodulinabhängige Proteinkinase Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	zyklische Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CPI-17	C-Kinase-aktivierter Proteinphosphatase-1-Inhibitor
C _T	Cycle threshold
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Effizienz
EC	Endothelzelle
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
E. coli	Escherichia coli
EDH(F)	endothelbedingte Hyperpolarisation (bzw. hyperpolarisierender Faktor)
EGFR	'epidermal growth factor'-Rezeptor
EKR	extracellular signal-regulated kinase
fw/rv	vorwärts/gegenläufig
G	Erdbeschleunigung (1 g = 9,80665 m/s ²)
G _i	inhibitorisches regulatives G-Protein

G _q	heterotrimere G-Protein-Untereinheit q
G _s	stimulierendes regulatives G-Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GPGR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K ⁺	Kalium-Ion
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KHK	koronare Herzerkrankung
L-arg	L-Arginin
m	Maus
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MLC	Myosin-Leichtkette
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N ₂	molekularer Stickstoff
NA	Noradrenalin
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO ₂	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂	molekularer Sauerstoff
OD ₂₆₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
P	Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostacyclin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PI ₃ K	Phosphoinositid-3-Kinase
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
R	Ratte
RAS	Renin-Angiotensin-System
RBF	renaler Blutfluss
ROCK	Rho-abhängige Proteinkinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s	Slope = negativer Anstieg der Standardkurve
SD	Standardabweichung
SHR	spontan hypertensive Ratten
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNS	sympathisches Nervensystem
S.R.	sarkoplasmatisches Retikulum
TNF-α	Tumornekosefaktor-α
VSMC	glatte Muskelzelle von Gefäßen
WKY	Wistar-Kyoto-Ratten
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

1.1 Abstrakt

Einleitung: Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems ist ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus bei der Entstehung von Ischämie- und Reperfusionsschäden in der Niere. Die Wirkung des sympathischen Nervensystems in einzelnen Gefäßabschnitten der Niere hängt von der Expression adrenerger Rezeptoren ab. Um den Einfluss sympathischer Aktivierung auf den Gefäßtonus unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen abzuschätzen, wurden die differentielle Expression der adrenergen Rezeptoren und die Gefäßreaktion auf Noradrenalin in verschiedenen Gefäßabschnitten der Niere unter Kontrollbedingungen sowie nach Hypoxie/Reoxygenierung bestimmt.

Methodik: Es wurden männliche C57BL/6-Mäuse verwendet und präpariert. Die großen Nierenarterien und die glomerulären Arteriolen wurden manuell isoliert, die afferenten Arteriolen für die Expressionsstudien mittels Eisenoxidsiebmethode gewonnen. Die Expression der adrenergen Rezeptoren ($\alpha_{1(A, B, D)}$, $\alpha_{2(A, B, C)}$, β_1 , β_2 , β_3) wurde nach Isolation der RNA und Umschreibung in cDNA mittels real-time PCR für die einzelnen Gefäßabschnitte bestimmt. Für die Expressionsanalyse nach Hypoxie/Reoxygenierung wurden die Gefäße eine Stunde mit einem hypoxischen Gasgemisch behandelt, gefolgt von einer zehnmütigen Reoxygenierungsperiode. Zudem wurde die Gefäßreaktion von Interlobararterien sowie afferenten und efferenten Arteriolen auf unterschiedliche NoradrenalinKonzentrationen (10^{-9} bis 10^{-5} mol/l) untersucht.

Ergebnisse: In Interlobararterien, Aa. arcuatae und afferenten Arteriolen waren alle adrenergen Rezeptoren auf mRNA-Ebene exprimiert. Die Expressionsstärke unterschied sich im Vergleich der Rezeptor-Subtypen, war jedoch im Vergleich der Gefäßabschnitte für jeden Rezeptor ähnlich, mit relativ stärkerer Expression von $\alpha_{1A, 1D}$, α_{2B} und β_2 . In efferenten Arteriolen wurden aufgrund der geringen Menge biologischen Materials nur α_1 -Rezeptorsubtypen untersucht. Hypoxie und Reoxygenierung verringerte die Expression von α_{1A} -Rezeptoren, während die mRNA-Expression der anderen adrenergen Rezeptoren nicht signifikant verändert war. Die funktionellen Untersuchungen zeigten eine dosisabhängige Kontraktion der Nierengefäße bei Noradrenalingabe in steigenden

Konzentrationen. Die Antwort von Interlobararterien auf Noradrenalin war größer als die von glomerulären Gefäßen. Hypoxie veränderte die Gefäßantwort von Interlobararterien auf Noradrenalin nicht signifikant.

Schlussfolgerung: Die Expression von α - und β -Rezeptoren in renalen Gefäßen der Maus unterstützt die Annahme eines bedeutenden Einflusses des sympathischen Nervensystems auf die Nierengefäßfunktion. Hypoxie und Reoxygenierung modifizieren die Rezeptorexpression und die Signalwege adrenerger Rezeptoren, jedoch ohne wesentlichen Einfluss auf die Noradrenalinantwort großer Nierenarterien. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Sympathikus erst durch Interaktion mit anderen vasoaktiven Systemen zum Ischämie-/Reperfusionsschaden beiträgt.

1.2 Abstract

Introduction: Activation of the sympathetic nervous system is an important pathophysiological mechanism in the development of kidney ischemia/reperfusion injury. The effect of the sympathetic nervous system in individual sections of the kidney depends on the expression of adrenergic receptors. To assess the influence of sympathetic activation on vascular tone under physiological and pathophysiological conditions, the differential expression of the adrenergic receptors and the vascular reaction to norepinephrine were determined in various sections of the kidney under control conditions and after hypoxia/reoxygenation.

Methods: Male C57BL/6 mice were used and prepared. Large arterial vessels and the glomerular arterioles were manually isolated, the afferent arterioles used for expression studies were obtained by the iron oxide sieve method. The expression of the adrenergic receptors ($\alpha_{1(A, B, D)}$, $\alpha_{2(A, B, C)}$, β_1 , β_2 , β_3) was determined after RNA isolation and conversion into cDNA by means of real-time PCR for the individual vascular sections. For hypoxia/reoxygenation expression analysis, the vessels were treated with a hypoxic gas mixture for one hour, followed by a ten minute reoxygenation period.

In addition, the vascular response of interlobar arteries and afferent and efferent arterioles to norepinephrine (10^{-9} to 10^{-5} mol/l) was investigated.

Results: All adrenergic receptors were expressed at mRNA level in interlobar arteries, arcuate arteries and afferent arterioles. Comparing the receptor subtypes, the level of expression differed, but was similar for each receptor compared to the vascular sections, with relatively stronger expression of $\alpha_{1A, 1D}$, α_{2B} and β_2 . In efferent arterioles, only α_1 -receptor subtypes were studied due to the small amount of biological material. Hypoxia and reoxygenation reduced the expression of α_{1A} -receptors, while mRNA expression of the other adrenergic receptors was not significantly altered. The functional studies showed a dose-dependent contraction of renal vessels during norepinephrine administration in increasing concentrations. The response of interlobar arteries to norepinephrine was greater than that of glomerular vessels. Hypoxia did not significantly alter the vascular response of interlobar arteries to norepinephrine.

Conclusion: The expression of α - and β -receptors in the renal vasculature of mice supports the assumption of a significant influence of the sympathetic nervous system on the renal vascular function. Hypoxia and reoxygenation modify the receptor expression and the signaling pathways of adrenergic receptors, but without significant influence on the norepinephrine response of large renal arteries. Thus, we conclude that the sympathetic nervous system only contributes to ischemia/reperfusion injury through interaction with other vasoactive systems.

2. Einleitung

2.1 Einführung in die Thematik

Die Niere spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation verschiedener Regelkreise des Körpers. Hierzu gehören der Salz- und Wasser- sowie der Säure-Basen-Haushalt und der arterielle Blutdruck. Sie hat eine wichtige Ausscheidungs- und Entgiftungsfunktion und dient der Produktion von Erythropoetin, einem Hormon, das für die Hämatopoese bedeutsam ist. Die Niere ist störanfällig, insbesondere für pathologische Zustände, die mit einer verminderten Sauerstoffzufuhr einhergehen. Diese können zu einem akuten Nierenversagen führen (142). Die Nierenfunktion wird durch das autonome Nervensystem reguliert. Die efferenten Nervenfasern des Sympathikus sind u. a. bedeutsam für die Regulation des Gefäßtonus in renalen Widerstandsgefäßen und daher von besonderem Interesse bei der Erforschung der Pathomechanismen des akuten Nierenversagens nach Ischämie und Reoxygenierung. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Noradrenalin in den afferenten Arteriolen *in vitro* zu einer Vasokonstriktion führt (176). Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Darstellung der differentiellen Expression der adrenergen Rezeptoren (AR) auf mRNA-Ebene in den renalen Widerstandsgefäßen von Mäusen und deren Reaktion auf exogen appliziertes Noradrenalin.

2.2 Literaturüberblick

2.2.1 Das sympathische Nervensystem und die Niere

Das sympathische Nervensystem (SNS) spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Blutdruckes im menschlichen Körper und ist daher bei der Entstehung verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z. B. der arteriellen Hypertonie, der Herzinsuffizienz sowie der Entstehung der KHK und des Auftretens von Schlaganfällen, maßgeblich beteiligt (29, 120, 199). In Deutschland leben beispielsweise 32 % der Erwachsenen mit einem arteriellen Hypertonus, welcher somit eine der häufigsten Erkrankungen im Erwachsenenalter ist und eine hohe gesundheitspolitische Relevanz besitzt (120).

Die neuronale und humorale Beeinflussung des kardiovaskulären Systems kann orientierend in vier Kategorien unterteilt werden: direkte Auswirkungen von Sympathikusfa-

ern auf die Herzfunktion, sympathische Innervation von Blutgefäßen, Beeinflussung durch Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark und durch Stimulation juxtaglomerulärer Zellen in der Niere, welche zur Reninfreisetzung führt (29).

Die Niere ist dicht von Nervenfasern des Sympathikus innerviert. Dies betrifft insbesondere die renalen Blutgefäße, aber auch die Tubuli sowie die juxtaglomerulären Zellen (46, 48). Eine besonders hohe Dichte efferenter Nervenfasern entlang der renalen Gefäße findet man im Bereich der afferenten Arteriolen (11, 128). Haupteffekte der Aktivierung dieser Nerven sind eine Zunahme der Reninsekretion, eine Abnahme des renalen Blutflusses, die Zunahme der Natrium- und Wasserreabsorption und eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (46, 103). Die sympathischen Nervenenden setzen eine Vielzahl von Neurotransmittern frei. Zu diesen gehören neben Noradrenalin unter anderem Adenosintriphosphat (ATP) und Neuropeptid Y (172, 173, 224, 228). Kontrolliert werden diese (postganglionären) Efferenzen von spezifischen präganglionären autonomen Neuronen, die ihren Ursprung im thorakolumbalen Bereich des Rückenmarkes haben. In diese präganglionären Nervenzellen wiederum projizieren Neurone aus der Medulla oblongata bzw. dem Hypothalamus (48).

Neben den Efferenzen wird die Niere auch von afferenten Nervenfasern in Form von Mechano- und Chemorezeptoren innerviert, die überwiegend in der Wand des Nierenbeckens lokalisiert sind (152). Die afferenten Fasern erreichen diese Rezeptoren in unmittelbarer Nähe zum Ureter oder der A. renalis, wobei diese Fasern oft sehr fein sind und in freien Nervenendigungen münden (128). Auch die großen Nierengefäße und das Gewebe im Bereich des Mark-Rinden-Überganges sind mit sensiblen Nervenendigungen versehen (10, 128). Nur wenige Nervenendigungen erreichen kortikale Bereiche (63). Die afferenten Fasern werden durch Mechanorezeptoren bei Dehnung, welche durch erhöhten ureteralen, pelvinen und venösen Druck entsteht, aktiviert (47, 103, 127, 128). Verschiedene weitere Stimuli, wie renale Ischämie (128, 191) und Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung des Urins (47), haben Auswirkungen auf die Aktivität der Afferenzen von Chemorezeptoren. Die afferenten Nervenfasern beeinflussen u. a. die neuronale Aktivität im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (128) und sind außerdem über Interneurone mit weiteren Gebieten des ZNS verschaltet, die für die Regulation des Kreislaufes von Bedeutung sind (128, 210, 235). Einige wenige Ner-

venfasern projizieren direkt in die Medulla oblongata (128, 233). Die wichtigsten Neurotransmitter der afferenten Nervenfasern sind Substanz P (130, 131) und Calcitonin-gene-related-peptide (79). Eine gesteigerte Aktivität afferenter Fasern führt zu kardiovaskulären Reaktionen wie dem Abfall des arteriellen Druckes, einer Verminderung des Gefäßwiderstandes in den hinteren Extremitäten und der Niere sowie einer Steigerung des Gefäßwiderstandes im Gefäßbett des Mesenteriums (132). Aktivierungen von Mechano- und Chemorezeptoren bzw. afferenten Fasern führen auch zu renorenenalen Reflexen, die überwiegend im Rückenmark umgeschaltet werden (190). Werden die afferenten Nervenfasern durch Dehnung aktiviert, kommt es zu einer renorenenalen Reflexantwort, bei der in der kontralateralen Niere Natriuresis und Diuresis durch Hemmung der efferenten sympathischen Fasern gesteigert werden (47, 52, 132). Hierfür projizieren die afferenten Nerven in das erste Neuron im Hinterwurzelganglion (38, 53). Dieser renorenenale Reflex steuert die Ausscheidungsfunktion der Niere und ist damit an der Modulation des Wasserhaushaltes des Körpers beteiligt. Im Sinne einer negativen Feedbackschleife steigert die Aktivität der efferenten Fasern die der afferenten. Diese wiederum senken die Aktivität der efferenten Fasern (103). Bei salzarmer Diät ist diese Reflexantwort vermindert, bei salzhaltiger verstärkt (129). In der ipsilateralen Niere führte in Untersuchungen von Kopp et. al eine Stimulation afferenter Nervenfasern durch erhöhten venösen Druck zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes und zu einer erhöhten Natriumausscheidung. Überraschenderweise war die Erhöhung des Gefäßwiderstandes in diesen Experimenten nicht an eine intakte renale Innervation gebunden. Die efferente renale sympathische Nervenaktivität wurde, wie auch in der kontralateralen Niere, gehemmt (132). Insgesamt ist die Rolle der afferenten renalen Nerven für die Pathogenese verschiedener Erkrankungsbilder, wie des arteriellen Hypertonus, noch nicht ausreichend verstanden (128).

Innerhalb der Niere liegen afferente und efferente Nervenfasern zum Teil in unmittelbarer Nähe zueinander. Es ist nicht ausgeschlossen, dass afferente Nervenfasern entlang der Axone mit den efferenten Fasern durch peptiderge Transmitter interagieren (52, 99). DiBona et al. berichteten 1996 von Untersuchungen an einzelnen sympathischen Nervenfasern, die zeigten, dass 88 % dieser Fasern auf Stimulation arterieller Barorezeptoren, zentraler und peripherer Chemorezeptoren und peripherer Thermorezeptoren reagierten. Eine Minderheit von 12 % reagierte lediglich auf periphere Thermorezeptoren. Dies zeigt, dass bei den sympathischen Nervenfasern eine gewisse Heterogenität besteht (50).

2.2.2 Beeinflussung der Nierendurchblutung durch das sympathische Nervensystem

Das sympathische Nervensystem ist an der Regulation der renalen Durchblutung beteiligt. Die Beeinflussung der (arteriellen) Blutgefäße in der Niere durch das sympathische Nervensystem erfolgt durch Neurotransmitter, welche aus den terminalen Nervenendigungen in den synaptischen Spalt abgegeben werden und mit entsprechenden Rezeptoren der jeweiligen vaskulären Elemente interagieren. Es handelt sich hierbei überwiegend um Noradrenalin, welches mit adrenergen Rezeptoren interagiert. Begleitend werden auch andere Neurotransmitter, wie das Neuropeptid Y, freigesetzt (33, 159). Die Aktivierung der sympathischen efferenten Nervenfasern in der Niere verringert durch Erhöhung des Tonus in den Widerstandsgefäßen den renalen Blutfluss (RBF) (48). Interessanterweise führt die Unterbrechung der sympathischen Innervation bei Versuchstieren zu einer erhöhten Noradrenalin-Sensibilität der Gefäße im Vergleich zu solchen mit intakter renaler Innervation (95).

Eine niedrigfrequente Stimulation efferenter sympathischer Nerven erhöht zwar die Reninfreisetzung und die tubuläre Natriumreabsorption, der renale Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bleiben jedoch davon unbeeinflusst. Hier zeigt sich, dass eine efferente renale sympathische Nervenaktivität im niedrigfrequenten Bereich keinen Einfluss auf die Autoregulation der Gefäße hat, im höherfrequenten aber durchaus (49). Unter normalen täglichen Bedingungen schwanken im Tierversuch sowohl die Aktivität der efferenten sympathischen Nerven (166) als auch der RBF (81) beträchtlich. Bei körperlicher Aktivität und Stress steigt die efferente renale sympathische Nervenaktivität an (166), der RBF nimmt ab (81). Im entspannten Zustand, insbesondere im Schlaf, ist es umgekehrt (81).

2.2.3 Pathophysiologische Mechanismen

Das sympathische Nervensystem trägt zur Entstehung der akuten Niereninsuffizienz und des chronischen Nierenversagens bei. Im folgenden Absatz sollen diese Entstehungsmechanismen der beiden Erkrankungen mit Fokus auf das SNS und das renale Gefäßsystem dargelegt und kurz mögliche Behandlungsansätze angesprochen werden.

2.2.3.1 Das akute Nierenversagen

Das akute Nierenversagen (ANV) ist eine Erkrankung, die mit einer plötzlichen Verschlechterung der Nierenfunktion einhergeht. Sowohl Morbiditäts- als auch Mortalitätsrate sind hoch. Im Falle eines dialysepflichtigen Nierenversagens liegt die Mortalitätsrate bei 40–50 %. Kommen zusätzlich noch Schäden an anderen Organen wie Herz oder Lunge dazu, steigt diese Rate auf bis zu 60–80 % an (94). Zusätzlich ist das Risiko, eine chronische Niereninsuffizienz zu entwickeln, deutlich erhöht (32). In der Vergangenheit gab es diverse Versuche, eine Definition für das ANV zu entwickeln. 2004 schlug die Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) die sogenannten RIFLE-Kriterien vor. Der Begriff RIFLE steht für die Anfangsbuchstaben der fünf Stadien: Risk, Injury, Failure, Loss und End Stage Renal Disease (14). Auf der Grundlage dieser Kriterien entwickelte das Acute Kidney Injury Network (AKIN) eine Definition, anhand derer man unter Beachtung des Serum-Kreatinins und der Verminderung der Urinproduktion das ANV in drei AKIN-Stadien (siehe Tabelle 1) einteilt (156). Letztlich werden weltweit verschiedene Systeme zur Beurteilung des akuten Nierenversagens eingesetzt.

Tabelle 1: Übersicht über die AKIN-Stadien (156).

Stadium	Serum-Kreatinin	Urinausscheidung
1	Anstieg des Serum-Kreatinins ≥ 0,3 mg/dl (≥ 26,4 µmol/l) oder 1,5- bis 2-facher Kreatininanstieg	< 0,5 ml/kg/h für über 6 h
2	2- bis 3-facher Kreatininanstieg	< 0,5 ml/kg/h für über 12 h
3	> 3-facher Kreatininanstieg oder Serum-Kreatinin > 4 mg/dl (≥ 354 µmol/l) mit einem akuten Anstieg ≥ 0,5 mg/dl (44 µmol/l)	< 0,3 ml/kg/h für 24 h oder Anurie für 12 h

Eine der Hauptursachen des ANV ist die renale Ischämie, welche u. a. durch niedrigen Blutdruck, Herzinsuffizienz, Nierentransplantation (139), Sepsis (236), aber auch als postoperative Komplikation nach Herzoperationen (134) auftreten kann.

Entstehung:

Die Pathogenese des akuten Nierenversagens ist bisher nicht ausreichend verstanden. Es handelt sich um ein komplexes Zusammenspiel von Gefäßreaktionen, tubulären Veränderungen und Entzündungsprozessen (4, 18). Dabei kommt es unter anderem zu einer Akkumulation verschiedener (vasoaktiver) Substanzen. Der Säure-Basen- sowie der Wasser- und Elektrolythaushalt sind meist gestört (94). Im akuten Nierenversagen sind Ischämie und Hypoxie von pathogenetischer Bedeutung (204). Die Reduktion des renalen Blutflusses und die Hypoxie sind auch auf eine Fehlfunktion im Bereich der Mikrozirkulation zurückzuführen (141). Die Aktivierung des SNS trägt ebenfalls zur Entwicklung des ANV bei (69, 124).

Bei der Entstehung des akuten Nierenversagens kommt es u. a. zu einer Veränderung der Gefäßreaktivität. Verschiedene Studien zeigten einen Verlust der Autoregulation renaler Gefäße (2, 40, 113). Insbesondere das Endothel ist für die Pathogenese der akuten Niereninsuffizienz in vielerlei Hinsicht von Bedeutung, vor allem, wenn es durch Erkrankungen vorgeschädigt ist. Die endotheliale Dysfunktion geht mit verringerter vasodilatatorischer Kapazität, insbesondere verminderter NO-Bioverfügbarkeit, einher (137). Hierbei spielen vermutlich entzündliche Prozesse eine Rolle (141). Außerdem kommt es durch Erhöhung der Endotheldurchlässigkeit zu einem Verlust von intravasaler Flüssigkeit ins Interstitium und in der Folge zu interstitiellen Ödemen (214). Dies ist besonders im Bereich der äußeren Medulla der Niere relevant, da diese sehr empfindlich auf Verminderungen des renalen Blutflusses reagiert (18, 179). Vetterlein et al. demonstrierten an Ratten, dass insbesondere in der Medulla der postischämischen Niere der Blutfluss vermindert wird (222). Es kommt im Verlauf zu einer Verringerung der Anzahl der kleinen Gefäße im Bereich des inneren Streifens der äußeren Medulla. Möglicherweise wird dies mitbedingt durch eine Hemmung der Angiogenese (13, 18).

Wie schon erwähnt, ist die Aktivierung des SNS bei der Entwicklung des akuten Nierenversagens bedeutsam. In einer Studie an Ratten von Ma et al. wurde eine verminderte Antwort des inhibitorischen renorenalen Reflexes bei renalen Schäden gezeigt, vermutlich bedingt durch eine verminderte Sensitivität der Mechanorezeptoren. Dies führte zu einer fehlenden Absenkung der Aktivität der efferenten sympathischen Fasern in der

kontralateralen Niere (148). Möglicherweise dominieren in einer ischämisch geschädigten Niere exzitatorische Reflexe (128). Aktiviert werden die afferenten Nerven hierbei vermutlich u. a. über Chemorezeptoren durch intrarenales Adenosin, welches in einer Studie von Katholi et al. über die Aktivierung renaler afferenter Nerven einen durch sympathische Efferenzen bedingten Hypertonus erzeugte (108). Cao et al. demonstrieren in einer Studie an Mäusen, dass es womöglich einen Reflexweg zwischen der hypoxischen Niere und dem Hirnstamm gibt. Beteiligt waren sowohl die renale und zerebrale RAS-Aktivierung als auch afferente und efferente Nervenfasern. Dies trug zu einer weiteren Verschlechterung der Nierenfunktion in dieser Studie bei (24). Bei der Beteiligung des SNS ist die Aktivierung von α_1 -Rezeptoren von pathophysiologischer Relevanz. Dies zeigten Fujii et. al anhand eines Tierexperimentes, in dem der α_1 -Blocker Prazosin nierenprotektiv wirkte (70).

Die Reperfusionphase ist bei der Entwicklung des ANV von Bedeutung, man spricht daher auch von einer ‚ischaemia reperfusion injury‘. Der Schaden entsteht durch das Zusammenspiel von Blutfluss in der Mikrovaskulatur, Endothelschäden und entzündlichen Prozessen (19, 144, 230). Auch wenn die Pathophysiologie noch nicht endgültig verstanden ist, wurden bereits einige Mechanismen identifiziert. Hierzu gehören die Freisetzung reaktiver O_2 -Spezies sowie die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und anderen Entzündungszellen (151). Die postischämische Reperfusionphase ging im Tierexperiment mit einer Aktivierung des SNS einher, welches somit an der Entstehung postischämischer Komplikationen beteiligt ist (195). Sowohl afferente als auch efferente sympathische Nervenfasern triggern Entzündungsprozesse, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrogenese, was wiederum die Entstehung einer chronischen Niereninsuffizienz begünstigen kann (94, 117, 118). Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Sympathikus und der Gefäßantwort in der Niere. In Untersuchungen von Kaufmann et al. an den Interlobararterien und afferenten Arteriolen von Mäusen wurden die durch Angiotensin II-bedingten Gefäßantworten nach Hypoxie/Reoxygenierung und Applikation von Noradrenalin ermittelt. Auffallend war, dass die Kombination von Hypoxie und gleichzeitig niedrigdosierter Behandlung mit Noradrenalin die Antwort der untersuchten Gefäße auf Angiotensin II verstärkte. Möglicherweise spielt also die durch Hypoxie und Noradrenalin bedingte erhöhte Gefäßreagibilität auf Angiotensin II eine Rolle bei der Entstehung postischämischer Nierenschäden. Durch eine simultane Blockade von α_1 - und α_2 -Rezeptoren konnte der Effekt des Noradrenalins wiederum deutlich vermindert werden, daher ist eine kooperative Aktion

von α_1 - und α_2 -Rezeptoren bei der Beeinflussung der Angiotensin II-bedingten Gefäßantwort in der Reperfusionphase zu vermuten (111). In einem Tierversuch induzierten Conger et al. durch intrarenale Infusion von Noradrenalin über einen funktionellen subtotalen Gefäßverschluss in der Niere ein akutes Nierenversagen. Auch eine Woche nach Injektion des Noradrenalins war der vaskuläre Widerstand in den arteriellen Gefäßen nach Stimulation renaler Nerven im Vergleich zu Nieren erhöht, bei denen das akute Nierenversagen durch einen Verschluss der A. renalis herbeigeführt wurde. Man vermutete hier ursächlich einen funktionellen Schaden des Gefäßendothels. Eine Nekrose der glatten Muskulatur konnte nur zu weniger als 10 % festgestellt werden (41). Fujii et al. stellten in Versuchen an Ratten ebenfalls erhöhte Aktivitäten der sympathischen Efferenzen auch 24 h nach Reperfusion fest (69).

Behandlungsansätze:

Das akute Nierenversagen wird durch Beseitigung der Ursache, medikamentös oder als Ultima Ratio durch Nierenersatztherapie behandelt. Es gibt zahlreiche tierexperimentelle und klinische Untersuchungen mit dem Ziel, eine geeignete Therapie zu entwickeln. In einer Studie von 2016 zeigten Shimokawa et al., dass die Injektion von Yohimbin, einem α_2 -Antagonisten, über die Blockade von α_{2C} -Rezeptoren einen renoprotektiven Effekt auf Nieren von Ratten hatte, bei denen durch Ischämie/Reperfusion ein akutes Nierenversagen hervorgerufen wurde. Der Nierenfunktionsverlust wurde anhand der Harn-Stickstoff- und Plasma-Kreatininkonzentration sowie der Kreatinin-Clearance abgeschätzt und fiel nach vorheriger intravenöser Yohimbin-Applikation deutlich geringer aus. Weiterhin war die Expression des Biomarkers Kidney injury molecule 1 auf mRNA- und Proteinebene nach Gabe von Yohimbin geringer. Auch histologisch ließ sich nachweisen, dass die Nierengewebschäden deutlich geringer ausfielen. Marker hierfür waren tubuläre Nekrose sowie Proteinzyylinder in den Tubuli. Die Konzentrationen des renalvenösen Noradrenalins, des TNF- α und des monocyte chemoattractant proteine-1 waren nach α_{2C} -Rezeptorblockade verringert und möglicherweise für die protektiven Effekte verantwortlich (208). Dies könnte einen neuen Therapieansatz darstellen. Als mögliche weitere Therapieoption soll an dieser Stelle die ischämische Präkonditionierung genannt werden. Durch wiederholtes Herbeiführen von Ischämie in Extremitäten (z. B. durch starkes Aufpumpen von Blutdruckmanschetten) wird eine intermittierende Ischämie/Reperfusion erzeugt. Dies führte in einigen klinischen Studien zur geringeren Häufigkeit des Auftretens eines akuten Nierenversagens (57, 221, 243). Die zugrunde

liegenden renoprotektiven Mechanismen sind bisher nicht ausreichend verstanden. Es wird vermutet, dass das SNS eine Rolle spielt (139). Es existieren jedoch auch Studien, in denen diese Technik keinen renoprotektiven Effekt zeigte (35, 91, 158, 180). Somit bleibt offen, ob es hier um eine klinisch erfolgreiche Methode handelt. Bei einem schweren akuten Nierenversagen ist das Nierenersatzverfahren die einzige suffiziente Therapiemöglichkeit (136).

2.2.3.2 Die chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz (CNI) ist eine schwerwiegende Erkrankung, welche mit einer hohen Morbiditäts-, Mortalitäts- und Hospitalisierungsrate einhergeht (76, 155). Neben den direkten Folgen der Nierenschädigung kann es zusätzlich durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems zu verschiedenen kardiovaskulären Komplikationen kommen (209). Bis vor einigen Jahren war die Zahl der nicht-dialysepflichtigen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz in Deutschland unbekannt. 2016 veröffentlichten Girndt et al. eine repräsentative Schätzung, in der 2,3 % der Studienteilnehmer (Alter 18–79 Jahre) eine geschätzte glomeruläre Filtrationsrate von weniger als 60 ml/min/1,73 m² und 12,7 % zumindest eine Albuminurie oder eine reduzierte GFR hatten. Von den Probanden mit einer GFR kleiner 60 ml/min/1,73 m² gaben ungefähr drei Viertel an, zuvor nicht von ihrer Nierenschädigung gewusst zu haben (75). Die relativ hohe Prävalenz zeigt die Bedeutung dieser Erkrankung. Umso wichtiger ist es, die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu verstehen.

Entstehung:

Die Aktivierung der sympathischen Nerven stellt ein frühes Element in der Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz dar, die zugrunde liegenden Mechanismen sind bis jetzt jedoch nicht eindeutig geklärt (84, 200). Man vermutet die Aktivierung renaler afferenter Nerven über Chemorezeptoren durch ischämisch bedingte Metabolite und reflexbedingt eine Überaktivität renaler sympathischer Efferenzen (178). Die Aktivierung der afferenten Nerven als wichtiges Stellglied bei der CNI, insbesondere für die Entwicklung eines Hypertonus, wurde in Studien an Ratten demonstriert (238, 239). Die sympathische Überaktivität bei der CNI geht mit oxidativem Stress (43, 178), reduzierter Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid in spezifischen ZNS-Regionen (15, 22, 178) und erhöhten Angiotensin II-Werten (178) einher. Hoch et al. stellten in ihren Untersuchun-

gen eine gestörte Funktion der α_{2A} -Rezeptoren bei der CNI fest (97). Die Überaktivität des sympathischen Nervensystems führt vermutlich über verschiedene Mechanismen, u. a. die Erhöhung des vaskulären Tonus von Nierengefäßen, Hypertrophie und Artherosklerose von Gefäßen (58, 200, 241) sowie Glomerulosklerose und Albuminurie (6, 7) zum einen direkt zu einem Fortschreiten der CNI. Zum anderen geht eine CNI, u. a. bedingt durch sympathische Überaktivität, mit einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks einher (42, 86), was wiederum weitere Nierenschäden hervorruft (122). In einer Studie beschrieben Johansson et al. einen deutlichen Zusammenhang zwischen erhöhter Sympathikusaktivität bzw. erhöhten Plasma-Noradrenalinspiegeln und renaler Hypertonie (102).

Behandlungsansätze:

Die chronische Niereninsuffizienz wird in Abhängigkeit vom Stadium entweder medikamentös oder mittels Dialyse behandelt. Eine weitere Option stellt die Nierentransplantation dar. Darüber hinaus gibt es einige neue Therapieansätze, die im Tierversuch bzw. in klinischen Studien erprobt wurden bzw. werden. Es wurde im Tierversuch gezeigt, dass eine renale Denervierung den renalen Blutfluss steigern (49) und die mit der CNI assoziierte Hypertonie reduzieren kann (21, 109). Campese und Kogosow zeigten in einer kontrollierten Studie an Ratten eine Verminderung der Aktivität der noradrenergen Neurone im Hypothalamus und Locus coeruleus durch eine Resektion der Afferenzen mittels dorsaler Rhizotomie, was die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus bei Ratten mit chronischer Niereninsuffizienz verhinderte (21).

Ein verhältnismäßig neuer invasiver Therapieansatz zur Behandlung des therapieresistenten Hypertonus ist die renale Nervenablation. Hierbei werden durch Kryoablation, oder durch Elektrocauter bzw. thermische Ablation die Nerven der Nierenarterie durchtrennt (177). Mittlerweile hat sich die katheterbasierte Radiofrequenzablation etabliert (177, 232). Möglicherweise könnte in Zukunft die renale Nervenablation bei der Behandlung der sympathischen Überaktivität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bzw. Dialysepatienten von Relevanz sein. Obwohl einige Studien die renale Denervierung als sicher und effektiv beschrieben, stellen neuere Ergebnisse die Methode wieder in Frage (92, 93, 232).

2.2.4 Noradrenalin – Synthese, Vorkommen und Funktion

Noradrenalin gehört neben Adrenalin zu den Katecholaminen. Diese werden aus der Aminosäure Tyrosin im Nebennierenmark und in den adrenergen, postganglionären Nervenzellen synthetisiert. Erster Schritt ist hierbei die Hydroxylierung des Tyrosins, es entsteht Dihydroxyphenylalanin (Dopa). Dieses wird dann zum biogenen Amin Dihydroxyphenylamin (Dopamin) decarboxyliert. Durch erneute Hydroxylierung entsteht Noradrenalin, welches über N-Methylierung in Adrenalin umgewandelt wird (126).

Noradrenalin wird u. a. im Nebennierenmark und in den sympathischen Nervenendigungen in chromaffinen Granula gespeichert. Bei der Katecholaminsekretion wandern die Sekretgranula auf ein Ca^{2+} -Signal hin zur Zellmembran, mit welcher diese verschmelzen und ihren Inhalt in den extrazellulären Raum bzw. synaptischen Spalt abgeben (223).

Das adrenerge System wird bei körperlicher und psychischer Belastung aktiviert (25). In den peripheren Geweben, außer in der Herz- und Skelettmuskulatur (1), kommt es zur Vasokonstriktion, wodurch der arterielle Blutdruck steigt (29). Die Kontraktionskraft und Frequenz des Herzens steigen (67, 240), die Koronargefäße werden erweitert (96). Zelluläre Energiespeicher werden mobilisiert, die Glykogenolyse und Lipolyse werden aktiviert, die Insulinsekretion wird gehemmt. Es kommt zu einem Anstieg der Glucose-, Laktat- und Fettsäurekonzentration im Blut (67).

2.2.5 Die adrenergen Rezeptoren – Einteilung, Aufbau und Signalwege

Adrenozeptoren unterteilt man in α - und β -Rezeptoren. Die Subtypen sind α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} sowie β_1 , β_2 und β_3 (siehe Abb. 1).

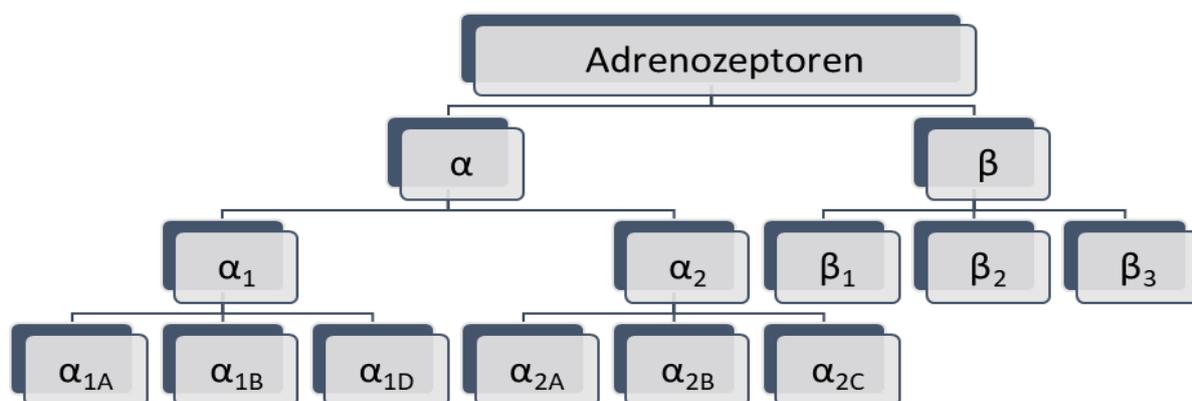


Abb. 1: Übersicht über die Adrenozeptoren.

Sie gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPGR), einer Familie von über 1000 verschiedenen Proteinen allein im Menschen (187), und sind nach Rhodopsin die am intensivsten erforschten Mitglieder dieser Proteinfamilie (212). Die GPGR bestehen aus einer Polypeptidkette und haben typischerweise einen extrazellulären N-Terminus, ein zytoplasmatisches C-Ende sowie sieben hydrophobe, helikale Transmembransegmente (135). Die Transmembransegmente werden durch drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen verbunden. Die extrazellulären Regionen (einschließlich des N-terminalen Endes) dienen der Ligandenbindung (140). Sie weisen deutlich größere strukturelle Unterschiede als die intrazellulären Regionen auf, während diese wiederum nach Aktivierung ausgeprägtere Konformationsänderungen erfahren (110). Die Aktivierung der GPGR auf extrazellulärer Seite bewirkt eine Weiterleitung der Signale an heterotrimere G-Proteine, die den weiteren Signalweg in Gang setzen (226). Sie bestehen aus drei Untereinheiten (α und ein Dimer, bestehend aus β und γ). Die α -Untereinheit ist mit GDP beladen. Der Rezeptor bewirkt einen Austausch des GDP durch GTP. Hierdurch wird das G-Protein instabil, zerfällt in eine α - sowie eine $\beta\gamma$ -Untereinheit und löst sich vom Rezeptor ab. Die jeweiligen Untereinheiten binden sich an ein Effektorprotein (u. a. Enzyme, wie z. B. Proteinkinasen, oder auch Kanäle), welches für die biologische Antwort verantwortlich ist und entweder aktiviert oder inaktiviert wird. Das GTP wird durch eine intrinsische GTPase-Aktivität wieder zu GDP und Phosphat hydrolysiert. Dadurch wird das Signal abgeschaltet, die α -Untereinheit (nun mit GDP beladen) assoziiert mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit und der Ausgangszustand ist wieder erreicht (140).

β -Arrestin ist in der Lage, den G-Protein-abhängigen Signalweg durch Desensibilisierung des Rezeptors zu beenden (187). Neben der Aktivierung der G-Proteine scheint es weitere Signalwege zu geben, die G-Protein-unabhängig sind. Shenoy et al. beispielsweise identifizierten in ihren Experimenten einen Signalweg für den β_2 -AR, bei dem über die Aktivierung von β -Arrestin die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1/2 aktiviert wurden (205). Ebenfalls nach Aktivierung des β_2 -AR beobachteten Galaz-Montoya et al. eine Erhöhung des intrazellulären Calciums über einen alternativen Signalweg, vermutlich bedingt durch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der Inositol-1,4,5-trisphosphat(IP_3)-Rezeptoren. Die G-Proteine G_s und G_i sowie cAMP waren in diesen Experimenten nicht involviert (71). Ein weiterer möglicher Signalweg könnte (ebenfalls nach β -Arrestin-Aktivierung) über Phosphorylierung des ‚epidermal growth factor‘-Rezeptors (EGFR) und die Aktivierung der ERK1/2 laufen, wie Untersuchungen am β_1 -AR zeigen (116).

Die folgende Abbildung 2 stellt schematisch die Struktur der Adrenozeptoren am Beispiel des humanen β_2 -Rezeptors dar (188).

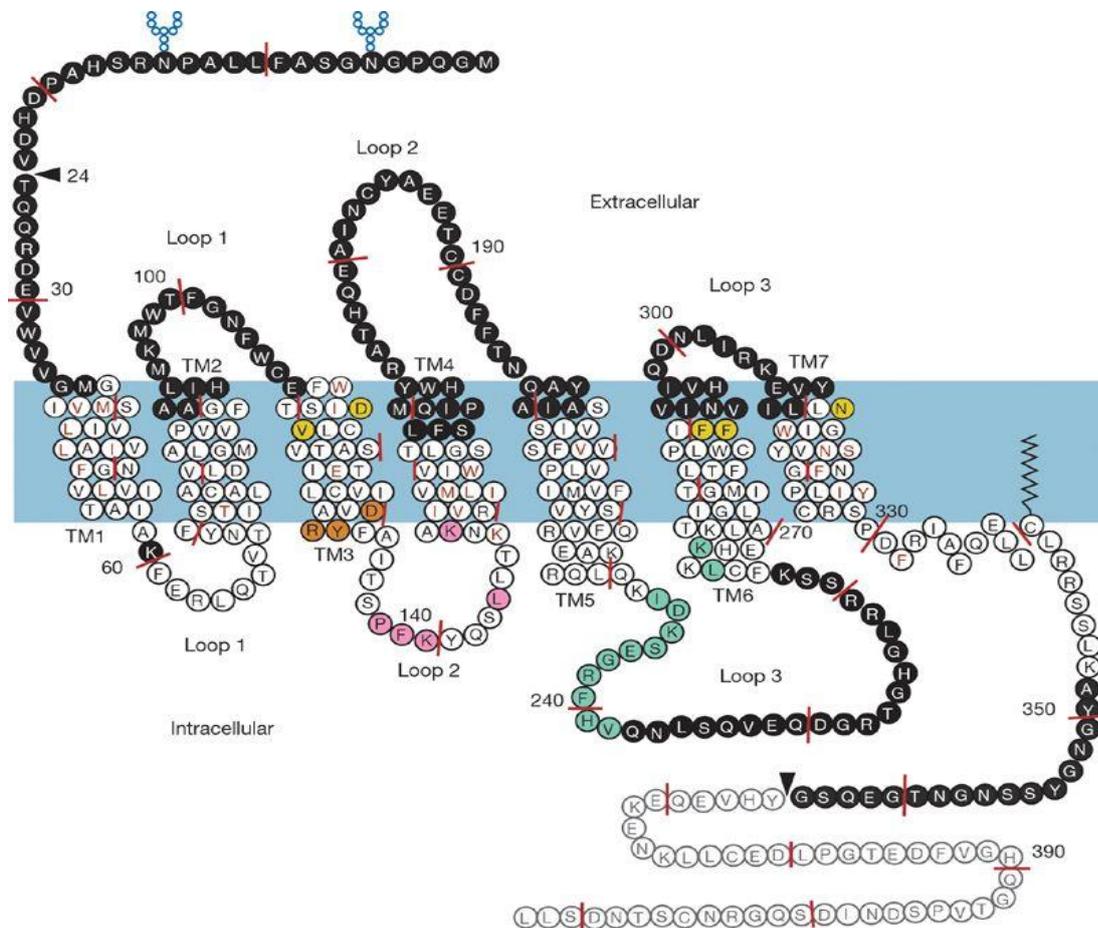


Abb. 2: Die Struktur des humanen β_2 -Rezeptors (188).

2.2.5.1 Die α_1 -Rezeptoren

Die α -Adrenozeptoren werden in α_1 -Rezeptoren und α_2 -Rezeptoren aufgeteilt. Man unterteilt die α_1 -Rezeptoren wiederum in α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Rezeptoren. Früher vermutete man das Vorhandensein eines α_{1C} -Rezeptors, es stellte sich aber heraus, dass es sich um den α_{1A} -AR handelte (182). Als möglicher neuer Adrenozeptor wurde α_{1L} identifiziert, dieser war aber wahrscheinlich eine Konformationsvariante von α_{1A} (87, 164). Die α_1 -AR sind an ihrem aminoterminalen Ende unterschiedlich lang. Für α_{1A} beträgt die Länge ungefähr 25, für α_{1B} 42 und für α_{1D} ca. 90 Aminosäuren. Die carboxyterminalen Enden sind sehr heterolog (82). Beispiele für α_1 -Agonisten sind Oxymetazolin, Imidazolin und Naphazolin (169), während Prazosin, Terazosin und Doxazosin typische Antagonisten sind (85). Die Suche nach selektiven Antagonisten für die Rezeptorsubtypen

gestaltete sich für α_{1A} am erfolgreichsten, aber auch für die anderen beiden Subtypen konnten entsprechende Antagonisten identifiziert werden. Entsprechende selektive Agonisten zu finden, stellte sich als deutlich schwieriger heraus (242). Die folgende Tabelle 2 listet selektive Agonisten und Antagonisten der einzelnen Subtypen auf.

Tabelle 2: Übersicht über einige selektive Agonisten und Antagonisten für die α_1 -Rezeptorsubtypen.

Rezeptorsubtyp	Selektiver Agonist	Selektiver Antagonist
Adr. α_{1A}	A-61603 (123)	KMD-3213 (207), RS-17053 (68), A-131701 (89)
Adr. α_{1B}	?	Cyclazosin (154)
Adr. α_{1D}	?	BMY 7378 (78)

Die Stimulation der α_1 -Rezeptoren führt in den meisten Fällen zur Aktivierung eines Pertussistoxin-insensitiven G-Proteins der $G_{q/11}$ -Familie, allerdings wurde auch die Aktivierung anderer (Pertussistoxin-sensitiver) G-Proteine beschrieben (82). Der Hauptweg führt über die Aktivierung der Phospholipase C, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) aus der Zellmembran in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP_3 interagiert mit verschiedenen Rezeptoren intrazellulärer Organellen (wie dem sarkoplasmatischen Retikulum), was eine Freisetzung von Calcium zur Folge hat. Das Diacylglycerol aktiviert seinerseits die Proteinkinase C (PKC), welche u. a. Ca^{2+} -Kanäle, aber auch andere Zellbestandteile, phosphoryliert. Diese wiederum können die intrazelluläre Calciumkonzentration regulieren und die Expression verschiedener Gene beeinflussen, was in der glatten Muskulatur von Gefäßen u. a. zu einer Steigerung der Expression von Wachstumsfaktoren führt (82, 150). Die PKC wird zusätzlich durch die (durch IP_3 -bedingte) Erhöhung des intrazellulären Calciums aktiviert (242). Die der Calciummobilisation zugrunde liegenden Mechanismen sind insgesamt sehr komplex und nicht vollständig aufgeklärt (160, 242). Es scheint, dass die Erhöhung der Calciumkonzentration in den Zellen auch über eine direkte Aktivierung von Calciumkanälen erfolgen kann (59, 88). Weitere Signalwege laufen über die Aktivierung der Phospholipase D (PLD) (194) und Phospholipase A_2 (PLA_2) (107, 167), was jeweils zur Freisetzung von Arachidonsäure führt. Der Hauptsignalweg mündet in den meisten Zellen in der Erhöhung des intrazellulären Calciums, welches eine Vasokonstriktion be-

wirkt (160). Insbesondere in kleineren arteriellen Widerstandsgefäßen spielt auch der calciumsensitivierende Weg via PKC und CPI-17 eine wichtige Rolle für die Gefäßkonstriktion (121, 229). Abbildung 3 bietet einen Überblick über die wichtigen Signalwege in der glatten Muskulatur (modifiziert nach (227)).

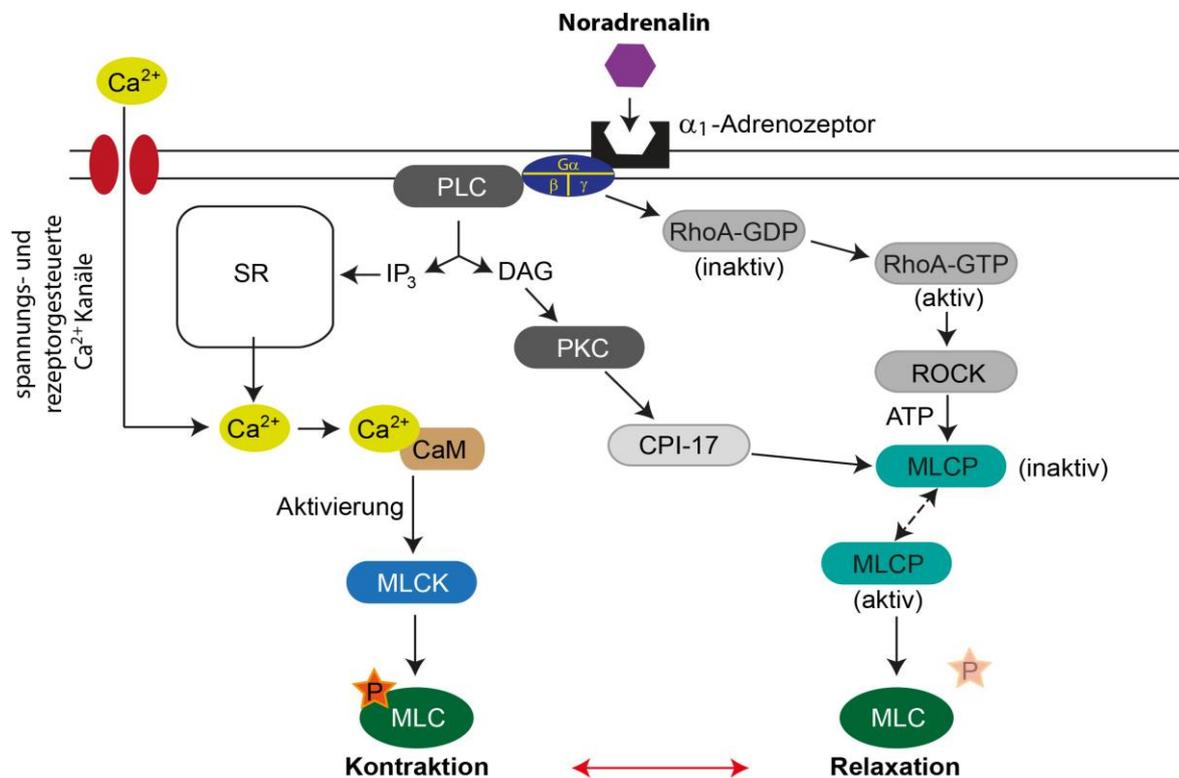


Abb. 3: Wichtige Signalwege der α_1 -adrenergen Rezeptoren in der glatten Muskulatur (modifiziert nach (227)). Ca^{2+} – Calcium, CaM – Calmodulin, CPI-17 – C-Kinase-aktivierter Proteinphosphatase-1-Inhibitor, DAG – Diacylglycerol, GDP – Guanosindiphosphat, GTP – Guanosintriphosphat, IP_3 – Inositol-1,4,5-trisphosphat, MLC – Myosin-Leichtkette, MLCK – Myosin-leichte-Ketten-Kinase, MLCP – Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase, PIP_2 – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, P – Phosphat, PKC – Proteinkinase C, PLC – Phospholipase C, ROCK – Rho-assoziierte Proteinkinase, SR – sarkoplasmatisches Retikulum.

2.2.5.2 Die α_2 -Rezeptoren

Die α_2 -Rezeptoren wurden ursprünglich als präsynaptische Rezeptoren, welche die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter aus Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems inhibieren, verstanden. Sie werden in α_{2A} -, α_{2B} - und α_{2C} -Rezeptoren unterteilt. Bei Nagetieren wird ein α_{2D} -Rezeptor beschrieben, welcher eine Variante des α_{2A} -AR darstellt (16, 87, 171). Die Homologie der Aminosäuresequenzen der Subtypen ist hoch, sie liegt bei über 80 %, weswegen auch die ligandenbindenden Seiten der Proteine sehr ähnlich sind. Der überwiegende Unterschied liegt in deren Größe, wie drei-

dimensionale Modelle zeigen. Die hohe Homologie erschwert es, Liganden zu finden, die für die jeweiligen Subtypen spezifisch sind (174). Clonidin und Moxonidin sind typische α_2 -Agonisten (115), Yohimbin und Idazoxan α_2 -Antagonisten (157). In Tabelle 3 sind selektive Agonisten und Antagonisten für die Rezeptorsubtypen aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht über einige selektive Agonisten und Antagonisten für die α_2 -Rezeptorsubtypen.

Rezeptorsubtyp	Selektiver Agonist	Selektiver Antagonist
Adr. α_{2A}	Guanfacin (218)	BRL 44408 (55)
Adr. α_{2B}	A-1262543 (37)	AGN-209419 (146), Imiloxan (208)
Adr. α_{2c}	Compound A/B (101)	MK912 (219), JP-1302 (208)

Die Signalwege der α_2 -Rezeptoren laufen überwiegend über G-Proteine der $G_{i/o}$ -Familie. Durch die $G\alpha_i$ -Untereinheit kommt es zu einer Verminderung der Aktivität der Adenylatcyclase, was wiederum die intrazelluläre Konzentration von cAMP erniedrigt (74). Über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins sowie über β -Arrestin verlaufen weitere Signalwege, wie z. B. eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von K^+ -Kanälen mit dem Effekt der Hyperpolarisation und in Neuronen eine Hemmung von N- und P/Q-Typ- Ca^{2+} -Kanälen (74, 87, 143, 213). Auch die Aktivität der Phospholipase A_2 (104), C (73) und D (149) kann durch Aktivierung der α_2 -Adrenozeptoren beeinflusst werden. Zusätzlich wird beispielsweise in Müller-Zellen der Retina über die α_2 -AR der Signalweg der MAPK, wie z. B. der EKR, in Gang gesetzt, welche wiederum bedeutsam für Proliferation, Differenzierung und weitere zelluläre Funktionen sind (181). Die $\beta\gamma$ -Untereinheit scheint außerdem eine Rolle bei der Verhinderung der präsynaptischen Freisetzung von Noradrenalin zu spielen (74).

2.2.5.3 Die β -Rezeptoren

Die β -Rezeptoren werden in β_1 , β_2 und β_3 eingeteilt. Zwischenzeitlich wurde die Existenz eines β_4 -Rezeptors angenommen, hierbei handelte es sich aber am ehesten um eine Konformationsvariante von β_1 (83, 87). Cherezov et al. gelang es 2007 erstmals, die kristalline Struktur des humanen β_2 -Adrenozeptors darzustellen (34). Ein nichtselek-

tiver β -Agonist ist Isoprenalin, während Propanolol einen nichtselektiven Antagonisten darstellt (3). Einige für die Subtypen selektive Liganden sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht über einige selektive Agonisten und Antagonisten für die β -Rezeptorsubtypen.

Rezeptorsubtyp	Selektiver Agonist	Selektiver Antagonist
Adr. β_1	Denopamin (100)	Metoprolol, Atenolol, Carvedilol, Nebivolol (51)
Adr. β_2	Salbutamol, Formoterol, Fenoterol (201)	ICI 118551 (119)
Adr. β_3	BRL 37344 (12), ZD 7114, CGP 12177A (202)	SR 59230A (168)

Die Stimulation der β -Rezeptoren führt zu einer Aktivierung des trimeren G_s -Proteins. Das G_s -Protein aktiviert wiederum die Adenylatcyclase, wodurch die Konzentration des intrazellulären cAMPs erhöht wird. Dieses aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle phosphoryliert. Dadurch sinkt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Das G_s kann jedoch auch direkt spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle beeinflussen (20). Die Aktivierung von β_2 -Rezeptoren kann über die PKA K^+ -Kanäle aktivieren, was in Gefäßen zu einer Vasodilatation führt. Dies wurde in Untersuchungen an verschiedenen Gefäßsystemen demonstriert (28, 192, 206). In glatter Muskulatur von Atemwegen wurde ebenfalls eine β -adrenerge Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle beschrieben (105, 161). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass unter bestimmten Voraussetzungen auch Signalwege über das inhibitorische G_i -Protein laufen können (9, 31). Möglicherweise dient dies der Desensibilisierung der Rezeptoren (9). Calciumsensitivierende Signalwege via Modulation der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase MLCP sind für die β_2 -Rezeptoren in der glatten Muskulatur der Bronchien der Lunge beschrieben worden (44). Über β -Arrestin kann (wie bei den α -AR) der G-Protein-abhängige Signalweg beendet werden (80, 147). Im Endothel von Gefäßen und im Myokard wird, vermittelt durch β_2 und β_3 , außerdem über die Proteinkinase B (zusätzlich zur Proteinkinase A) die NO-Synthase aktiviert, was zu einem NO-Anstieg führt. Hierdurch kommt es zu

einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (64, 189). Genau wie die α -Rezeptoren können auch die β -AR über MAPK-abhängige Signalwege die Transkription von Genen in Gang setzen (220).

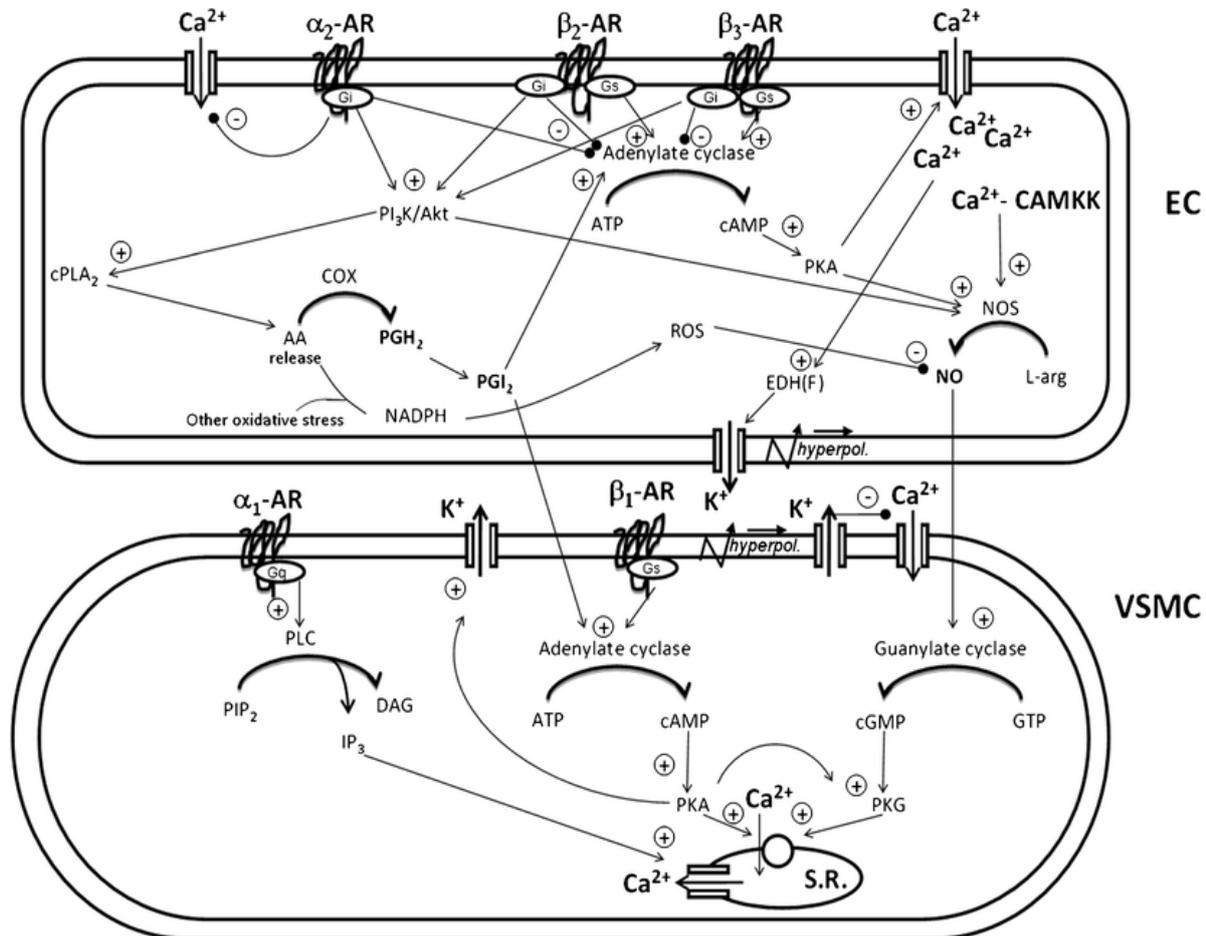


Abb. 4: Übersicht über die verschiedenen Signalwege der Adrenorezeptoren im Endothel und in glatten Muskelzellen von Gefäßen (189). → – Aktivierung, —●– Inhibierung, AA – Arachidonsäure, Akt – Proteinkinase B, ATP – Adenosintriphosphat, Ca^{2+} – Calcium aus spannungs- und agonistenabhängigen Kanälen, CAMKK – calmodulinabhängige Proteinkinase Kinase, cAMP – zyklisches Adenosinmonophosphat, cGMP – zyklisches Guanosinmonophosphat, COX – Cyclooxygenase, cPLA₂ – zytosolische Phospholipase A₂, DAG – Diacylglycerol, EC – Endothelzelle, EDH(F) – endotheliumbedingte Hyperpolarisation (bzw. hyperpolarisierender Faktor), G_i – inhibitorisches regulatives G-Protein, G_q – heterotrimeres G-Protein-Untereinheit q, G_s – stimulierendes regulatives G-Protein, GTP – Guanosintriphosphat, IP₃ – Inositol-1,4,5-trisphosphat, K⁺ – Kalium aus spannungs- und agonistenabhängigen Kanälen, L-arg – L-Arginin, NADPH – Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, NO – Stickstoffmonoxid, NOS – Stickstoffmonoxid Synthase, PGH₂ – Prostaglandin H₂, PGI₂ – Prostacyclin, PI₃K – Phosphoinositid-3-Kinase, PIP₂ – Phosphatidylinositolbisphosphat, PKA – Proteinkinase A, PKG – Proteinkinase G, PLC – Phospholipase C, ROS – reaktive Sauerstoffspezies, S.R. – sarkoplasmatisches Retikulum, VSMC – glatte Muskelzelle.

2.2.6 Einfluss der verschiedenen adrenergen Rezeptoren auf den Gefäßtonus der Nierengefäße

Entscheidend für die Beeinflussung des vaskulären Tonus der Nieren- und insbesondere der Widerstandsgefäße sind in der Ratte die α_1 -Rezeptoren (48). Bei der Vermittlung der Vasokonstriktion dominieren α_{1A} -Rezeptoren (33, 47), jedoch gibt es Hinweise, dass auch α_{1D} -Rezeptoren den vaskulären Tonus verstärken können (8, 112, 196, 198). Die α_{1B} -Rezeptoren spielen unter physiologischen Bedingungen eher eine untergeordnete Rolle (196). Möglicherweise sind sie bei Hypoxie von Bedeutung, da sie unter sauerstoffarmen Umständen in glatter Muskulatur verstärkt exprimiert werden (56). Untersuchungen von Ratten mit Nierenversagen und früher diabetischer Nephropathie lassen vermuten, dass der vasokonstriktorische Effekt der α_{1B} -Rezeptoren insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen in Erscheinung tritt (114).

Die α_2 -Rezeptoren werden zu einem großen Teil, aber nicht ausschließlich, präsynaptisch im Sinne einer Autoregulation exprimiert (39). Sie sind zunächst für den Tonus der renalen Widerstandsgefäße wenig bedeutsam. Bei postsynaptischer Expression verstärken sie die ATII- und Vasopressin-induzierte renale Vasokonstriktion bei Ratten (72). Bei manchen Spezies, wie z. B. Hunden, wurde allerdings auch eine direkte α_2 -bedingte Vasokonstriktion beschrieben (231).

Für die Vasodilatation der kleinen Nierengefäße sind möglicherweise die β_1 -AR verantwortlich. Die β_2 -AR verursachen in vielen Gefäßgebieten eine Relaxation glatter Muskulatur. In den afferenten Arteriolen sind sie nur von untergeordneter Bedeutung, wie Experimente an Kaninchen zeigen (225). Früher wurde vermutet, dass die β_3 -AR den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur nicht beeinflussen, mittlerweile liegen gegenteilige Beweise für verschiedene Gefäßsysteme vor (87). Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, dass eine Aktivierung der β_3 -AR durch den Betablocker Nebivolol über die Aktivierung der NOS in afferenten und efferenten Arteriolen in der Niere eine Vasodilatation bewirken kann (61).

2.3 Herleitung der Fragestellung

Aus der Literatur geht hervor, dass das sympathische Nervensystem von enormer Bedeutung bei der Regulation der renalen Durchblutung insbesondere im Bereich der Widerstandsgefäße und u. a. über diesen Mechanismus an der Entwicklung verschiedener

kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt ist. Die den Muskeltonus verändernden Signalkaskaden in der glatten Gefäßmuskulatur werden durch die adrenergen Rezeptoren ausgelöst, welche den Tonus auf unterschiedliche Weise – in Abhängigkeit vom Gefäßabschnitt und dem jeweiligen Rezeptortyp – beeinflussen. Dies kann bei der Behandlung verschiedener Nierenerkrankungen, z. B. dem akuten Nierenversagen und in der Folge den Ischämie-/Reperfusionsschäden sowie der chronischen Niereninsuffizienz und dem daraus folgenden arteriellen Hypertonus, klinische bzw. pharmakologische Relevanz haben.

Aufgrund der unterschiedlichen Auswirkungen der Aktivierung der Rezeptoren ist es wichtig, zum einen ihre Verteilung entlang der großen und kleinen Widerstandsgefäße in der Niere und zum anderen deren Effekt auf den vaskulären Tonus in den entsprechenden Abschnitten der renalen Gefäße sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei Ischämie zu kennen. Es ergeben sich daher folgende Fragestellungen:

1. Wie sind die Rezeptoren des adrenergen Systems differentiell in den verschiedenen Nierengefäßen exprimiert?
2. Welche funktionellen Antworten der Gefäße existieren in der Niere auf Noradrenalin?
3. Wie ändert sich die Rezeptorexpression und Gefäßfunktion nach Hypoxie/Reoxygenierung?

In der folgenden Arbeit wurden exemplarisch die Nierengefäße von C57BL/6-Mäusen untersucht. Teilergebnisse der Arbeit (Expression der adrenergen Rezeptoren in der Arteria interlobaris, Abschnitt 4.1.1, sowie der Einfluss von Noradrenalin auf den Gefäßtonus der A. interlobaris, Abschnitt 4.3.1) wurden 2015 im Artikel „Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/reoxygenation in renal interlobar arteries“ von J. Kaufmann, P. Martinka, O. Moede, M. Sendeski, A. Steege, M. Fähling, M. Hultström, M. Gaestel, I. C. Moraes-Silva, T. Nikitina, Z. Z. Liu, O. Zavaritskaya und A. Patzak in der *Acta Physiologica (Oxf.)* 213: 920-932, 2015, veröffentlicht (111).

Folgende Aufgabenstellungen sind Gegenstand der vorliegenden Promotionsschrift:

1. Gewinnung einer adäquaten Menge und Qualität verschiedener Abschnitte des Nierengefäßsystems
2. Bestimmung der Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene mithilfe der real-time PCR in verschiedenen Gefäßabschnitten
3. Analyse der relativen Expression der Adrenozeptoren in den afferenten Arteriolelen nach Hypoxie/Reoxygenierung
4. Funktionelle Untersuchungen zur Wirkung von Noradrenalin auf verschiedene Gefäßabschnitte

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Es wurden männliche Mäuse des Stammes C57BL/6 mit einem Alter von drei bis sechs Monaten verwendet. Sie lebten in gemeinsamer Käfighaltung und wurden mit handelsüblichem Pressfutter und Wasser ernährt.

Alle im Folgenden genannten Tierexperimente berücksichtigten das vom Bundesministerium der Justiz herausgegebene Tierschutzgesetz vom 08.05.2006. Es lag vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin eine Empfangsbestätigung über die Anzeige zur Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken vom 24.02.2006 vor (AZ T003/06). Des Weiteren wurden die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ beachtet.

3.2 Isolierung und Lagerung der Gefäße für die Expressionsanalysen

3.2.1 Präparation der großen Nierenarterien

Die Mäuse wurden mittels Isofluran (Carl Roth GmbH, Deutschland) narkotisiert und durch zervikale Translokation getötet. Die Nieren wurden nach Bauchschnitt entfernt und im Becherglas bei 4 °C in einer Präparierlösung zwischengelagert. Die Präparation erfolgte in kalter Präparierlösung in einer mit Silikon beschichteten Präparierschale unter einem Stereomikroskop (Typ MZ6 Leica, D). Die Arterien wurden unter Zuhilfenahme von Mikropinzetten (Aesculap AG, Deutschland) und Trabekularschere (gerade, 8 cm, Geuder, Deutschland) schonend vom umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit, ohne sie dabei zu berühren.

Für die Isolierung der Gefäße befand sich das Nierengewebe in physiologischer Lösung (118,6 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 1,25 mmol/l CaCl₂, 1,2 mmol/l MgSO₄, 1,2 mmol/l KH₂PO₄, 25,1 mmol/l NaHCO₃, 11,1 mmol/l Glucose und 0,02 mmol/l EDTA), welche mit Carbogen äquilibriert wurde. Die Arterien wurden unter Verwendung eines Operationsmikroskops präpariert.

Die isolierten Gefäße der einzelnen Versuchstiere wurden jeweils in einem Eppendorfgefäß in flüssigem Stickoxid schockgefroren. Die anschließende Lagerung für einige Tage erfolgte bei -80 °C im Gefrierschrank.

Für die Expressionsuntersuchungen der Interlobararterien wurden 140 Gefäße aus 18 Versuchstieren präpariert, für die Analyse der Genexpression in der A. arcuata wurden vier bis sechs Gefäße pro Tier aus insgesamt zwölf Tieren gewonnen.

3.2.2 Präparation präglomerulärer Arteriolen zur RNA-Gewinnung

Zur Gewinnung einer größeren Zahl von präglomerulären Gefäßen wurde die Methode von Chaudhari et al. verwendet (30). Das Verfahren beruht auf der Kombination einer Eisenoxidperfusion der Gefäße und nachfolgender Isolation unter Anwendung von Gewebesieben. Die Tiere wurden getötet, der Thorax geöffnet und via linken Ventrikel wurde das Gefäßsystem mit einer PBS-Lösung gespült. Im Anschluss erfolgte die Infusion einer eisenoxidhaltigen physiologischen Lösung (PBS, Zusammensetzung der Eisenoxidlösung: 50 ml PBS, 5 g Eisenoxid-Pulver, 5 g bovines Serumalbumin). Die infolge der Perfusion dunkel erscheinenden Nieren wurden entnommen und im weiteren Verlauf gekühlt aufgearbeitet. Zunächst wurde die Kapsel entfernt und die Nieren wurden unter Verwendung spezieller scharfer Rasierklingen für 5 min in kleinste Teile gehackt. Das Nierengewebe wurde in PBS-Lösung aufgeschwemmt, mit Spritzen aufgezogen und durch Kanülen gepresst. Dadurch erfolgte eine weitere Trennung von Gefäßen und Tubuli. Starke Magnete dienten zur Auftrennung von eisenhaltigen Gefäßen und den Tubuli. Die Prozedur wurde mehrfach wiederholt und dabei wurde die Größe der Kanülen von 0,9 mm auf 0,6 mm reduziert. Im Anschluss an diese Prozedur wurden die Gewebepartikel durch Siebe mit Porengrößen von 100 µm und 80 µm gepresst. Das gewonnene Material wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und einige Tage bei -80 °C aufbewahrt.

Protokoll:

Es wurden insgesamt 24 männliche Mäuse (C57BL/6) verwendet. In einer ersten Serie wurde die mRNA-Expression adrenerger Rezeptoren in isolierten Arteriolen von sechs Tieren ohne jegliche Behandlung mittels qPCR bestimmt. Das Material wurde direkt nach Isolierung schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Untersuchung der Auswirkung von Hypoxie und Reoxygenierung auf die mRNA-Expression von adrenergen Rezeptoren wurden 18 Tiere verwendet. In den entsprechenden physiologischen Lösungen (118,6 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 1,25 mmol/l CaCl₂, 1,2 mmol/l MgSO₄, 1,2 mmol/l KH₂PO₄, 25,1 mmol/l NaHCO₃, 11,1 mmol/l Glucose und 0,02 mmol/l EDTA)

wurden Arteriolen von neun Tieren mit einem Gasgemisch aus 95 % N₂ und 5 % CO₂ für 1 h begast. Die Reoxygenierung erfolgte durch 10 min Carbogenbegasung. Arteriolen von weiteren neun Tieren wurden zur Kontrolle 70 min lang mit Carbogen behandelt.

3.2.3 Präparation efferenter Arteriolen

Die Mäuse wurden (wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben) getötet und die Nieren entnommen. Die Nierenkapsel wurde entfernt und dünne Nierenquerschnitte wurden hergestellt, die in DMEM F-12 (HEPES und 0,1 % Albumin) auf Eis bei 0 °C aufbewahrt wurden. Die Präparation der efferenten Arteriolen erfolgte in DMEM F-12 (HEPES und 0,1 % Albumin) ohne zusätzliche Begasung bei 4 °C mittels kleinster Pinzetten (No. 5, Dumont, Montignez, Schweiz) per Hand. Glomeruli des äußeren und mittleren Kortex wurden identifiziert und die efferenten Arteriolen wurden dargestellt. Die Gefäße wurden mit feinen Skalpell proximal am Glomerulus und distal am Übergang in die Kapillaren durchtrennt und die Arteriolen wurden mit einer Saugpipette in Eppendorfgläser (1,5 ml) transportiert und sofort schockgefroren. Es wurden Arteriolen von sechs männlichen C57BL/6-Mäusen gewonnen. Insgesamt standen 23 Gefäße zur Verfügung. Die Dauer der Präparation betrug pro Tier jeweils ca. 1 h.

3.3 Funktionelle Untersuchungen

3.3.1 Präparation, Perfusion und isotonische Untersuchung afferenter und efferenter Arteriolen

Nach Tiertötung und Nierenentnahme wurden letztere von der Kapsel befreit. Mittels langer Rasierklingen wurden dünne Gewebescheiben angefertigt und in DMEM F-12 (HEPES und 0,1 % Albumin) auf Eis gelagert. Die Präparation afferenter Arteriolen erfolgte unter einem Stereomikroskop (SMC 4, Askania Mikroskop Technik Rathenow, Deutschland) mit 250-facher Vergrößerung. Es wurden Pinzetten No. 5 (Dumont, Schweiz) verwendet, welche für die Arbeit mit Schleifsteinen (white Arkansas) bearbeitet wurden. Arteriolen und zugehörige Glomeruli wurden überwiegend aus dem mittkortexikalen Bereich sowie von äußeren Rindenbereichen isoliert. Dabei wurden Berührungen oder übermäßige Dehnung der Gefäße vermieden. Arteriolen mit Glomeruli wurden aus der auf 4 °C thermostatierten Präparierschale (Werkstätten der Charité, Berlin,

Deutschland) in die Experimentierkammer mittels einer Saugpipette transportiert. Die Pipetten waren im Lumen proteinbeschichtet, um ein Anheften der Präparate an der Pipetteninnenwand weitestgehend auszuschließen. Nach Überführung der Präparate in die Experimentierkammer (Volumen: 2 ml) wurden sie mithilfe der Haltepipetten fixiert und perfundiert.

Das Mikroperfusionssystem bestand aus einem linken und einem rechten Perfusionsapparat. Diese waren geeignet, die selbst hergestellten Pipetten (Rohmaterial: Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) zu justieren und einen Lösungstausch im System zu ermöglichen (Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland). Die Positionierung der Pipetten in der Kammer gelang durch motorisierte Mikromanipulatoren (Luigs & Neumann), die auf dem Tisch des Mikroskops (Axiovert 100, Zeiss Oberkochen, Deutschland) angebracht waren. Das Präparat wurde durch die Haltepipette auf der rechten Seite durch leichtes Saugen am Glomerulus oder an Tubulusresten fixiert. Die Arteriolen wurden jeweils am freien Ende in die Haltepipette gesaugt und mit einer Perfusionspipette (5 µm Außendurchmesser) perfundiert. Die Perfusionslösung war DMEM F-12 (+ HEPES und 1 % Albumin). Diese wurde über ein Schlauchsystem aus einem Vorratsbehälter in die Spitze der Perfusionspipette gebracht. Der Druck im Vorratsgefäß betrug 100 mmHg für afferente Arteriolen und 50 mmHg für efferente Arteriolen. Die Perfusionsgröße lag für afferente Arteriolen bei etwa 50 nl/min und damit im physiologischen Bereich (145). Arteriolen wurden nach einer Aufwärmphase in der thermostatierten Kammer (VETEC, Rostock, Deutschland) mit einer physiologischen Lösung, die 100 mmol/l KCl enthielt, getestet. Nur afferente Arteriolen, die auf die kurzzeitige Applikation mit einer unmittelbaren und vollständigen Konstriktion reagierten, wurden verwendet. Die Integrität efferenter Arteriolen wurde anhand des typischen Bildes im Mikroskop (sichtbare Myozyten), Reaktion auf Erwärmung sowie Resistenz auf Druckerhöhungen bewertet. Die Prüfverfahren zur Testung der Gefäßintegrität wurden über Jahre sowohl international als auch in unserem Labor etabliert. Die funktionellen Eigenschaften der Gefäße bedingen die jeweiligen Testverfahren. Afferente Arteriolen besitzen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ. Es lässt sich durch kurzzeitige Applikation einer kaliumreichen Lösung (100 mmol/l KCl, im Austausch mit 95 mmol NaCl: 20 mmol/l NaCl, 25 mmol/l NaHCO_3 , 2,5 mmol/l K_2HPO_4 , 1,3 mmol/l CaCl_2 , 1,2 mmol/l MgSO_4 , 100 mmol/l KCl und 5,5 mmol/l Glucose) eine Depolarisation auslösen, die keinen Einfluss auf die Funktion der Gefäße und den weiteren Verlauf des Experimentes hat (90). In den efferenten Arteriolen ist die Reaktion auf KCl

sehr gering, sodass dieser Test hier nicht anwendbar war. Es wurden nur Gefäße verwendet, die innerhalb von 90 min nach Tötung des Tieres perfundiert waren.

Protokoll:

Nach Testung der Gefäße folgte eine Adaptationsphase von 10 min. Danach wurde die Badlösung alle 2 min ausgetauscht und es wurden dabei Noradrenalin-Konzentrationen im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-5} mol/l (afferente Arteriolen: n = 8, efferente Arteriolen: n = 5) appliziert.

Datenaufnahme und Auswertung:

Es wurden für Ausgangssituationen und für die jeweiligen Noradrenalin-Konzentrationen jeweils fünf videomikroskopische Bilder aufgenommen (Videokamera und Programm: Moticam 2.0, Motic Asia, Hongkong). Der zeitliche Abstand zwischen den Aufnahmen war 1 s. Die Aufnahmen wurden jeweils 1 min 45 s nach Applikationsbeginn gestartet. Die Bilder wurden auf einem Computer gespeichert und offline ausgewertet. Als Maß für die Kontraktilität diente die Änderung des Durchmessers der Gefäße. Diese wurde nach Kalibrierung des Systems mithilfe des Programms ImageJ (verfügbar unter <https://www.imageJ.org>) gemessen. Die Werte der fünf zusammengehörigen Bilder wurden gemittelt und dieser Wert wurde weiterverwendet.

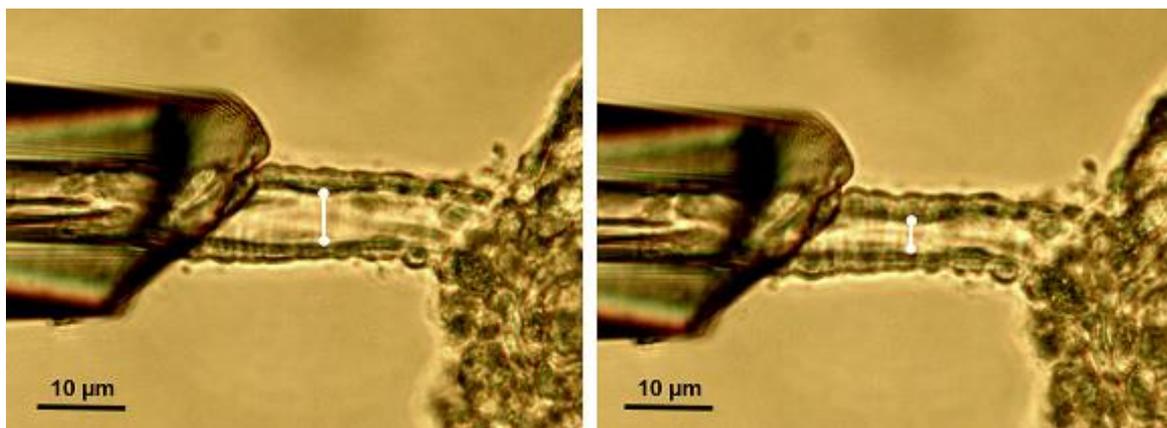


Abb. 5: Darstellung einer isoliert perfundierten afferenten Arteriole vor und nach Zugabe von Noradrenalin. Auf der linken Seite befindet sich die Arteriole im nicht kontrahierten Zustand, auf der rechten Seite sieht man eine durch Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur bedingte Lumenverengung.

3.3.2 Kraftmessung an den großen Nierenarterien

Die Messung der Kraft der großen renalen Arterien wurde mit einem Drahtmyographen (Modell 500A, J. P. Trading, Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Diese Apparatur gestattete eine gleichzeitige und voneinander unabhängige Untersuchung von zwei Gefäßen. Die hierbei verwendete Experimentierlösung (118,6 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l CaCl₂, 1,2 mmol/l MgSO₄, 1,2 mmol/l KH₂PO₄, 25,1 mmol/l NaHCO₃, 11,1 mmol/l Glucose und 0,02 mmol/l EDTA) wurde fortlaufend mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂, Linde Gas, Deutschland) begast. Die Experimentiertemperatur betrug 37 °C und der pH-Wert war 7,4. Die Originalmesswerte wurden online via Schnittstelle (Myo-Interface Unit, P. Trading, Aarhus, Dänemark) auf ein PowerLab System (ADInstruments GmbH, D) übertragen und mit einem Computer verbunden. Nach Präparation der Gefäße wurden diese auf Länge geschnitten und mittels zweier Edelstahldrähte (40 µm) zum einen am Kraftaufnehmer auf der einen Seite der Kammer und zum anderen an einem beweglichen, mit einer Mikrometerschraube verbundenen, Arm fixiert. Entsprechend den Arbeiten und Empfehlungen von Mulvany und Halpern (163) wurden die Gefäße kalibriert und es wurde ein luminaler Durchmesser eingestellt, der 90 % desjenigen bei 100 mmHg Gefäßinnendruck entsprach. Die Normalisierung bzw. Kalibrierung wurde entsprechend der Bedienungsanleitung für Drahtmyographen durchgeführt (verfügbar unter https://www.dmt.dk/service_and_development.html, calibration guide).

Protokoll:

Nachdem die Normalisierung erfolgt war, erholten sich die renalen Gefäße für 5 min. Danach wurde eine physiologische Experimentierlösung appliziert (100 mmol/l KCl, im Austausch mit 95 mmol NaCl: 20 mmol/l NaCl, 25 mmol/l NaHCO₃, 2,5 mmol/l K₂HPO₄, 1,3 mmol/l CaCl₂, 1,2 mmol/l MgSO₄, 100 mmol/l KCl und 5,5 mmol/l Glucose). Die durch die Depolarisation ausgelöste Kontraktion diente dem Gefäßtest und war zugleich Bezugswert für die Beurteilung aller nachfolgenden Kontraktionen. Als Bezugswert wurde die maximale im steady state gemessene Kraft verwendet. Nach zweimaligem Auswaschen und Erreichen des Ausgangswertes folgte die eigentliche Versuchsdurchführung. Die Gefäße der Experimentiergruppe wurden für 60 min mit einem Gasmisch aus 95 % N₂ und 5 % CO₂ begast (Hypoxie, n = 11). Dann wurde Carbogen für 10 min verabreicht (Reoxygenierung). Die Kontrollgruppe wurde mit Carbogen für 70 min behandelt (n = 13). An die Hypoxie-/Reoxygenierungsphase anschließend wurde Nora-

drenalin kumulativ in die Badlösung gegeben und eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10^{-9} bis 3×10^{-5} mol/l Noradrenalin) wurde erstellt.

3.4 RNA-Isolierung und Vervielfältigung der cDNA

3.4.1 Gewinnung und Quantifizierung der RNA

Die Isolierung der RNA aus den isolierten Gefäßen erfolgte mit dem RNeasy® Micro Kit (50) von Qiagen (#74004). Zu den Proben wurden je 350 µl Puffer RLT gegeben, welcher Zellen lysiert und vorher mit β-Mercaptoethanol (zur Denaturierung von Proteinen durch Spaltung von Disulfidbrücken) versetzt wurde. Nun wurde das Gefäß-Puffer-Gemisch mit einem Polytron (PT3000, Kinematika) dreimal für je ca. 10 s homogenisiert und zwischen den Schritten für jeweils 1 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgten eine dreiminütige Zentrifugation (Sigma Laborzentrifuge 3K15, Thermo Scientific) bei Raumtemperatur und 13000 g, das vorsichtige Abpipettieren des Überstandes und Überführen in ein neues Eppendorfgefäß. Nun wurde zum Überstand die gleiche Menge (350 µl) an 70 %igem Ethanol gegeben und beides wurde mithilfe einer Pipette vorsichtig vermischt. Die so entstandene Lösung wurde zügig auf eine RNeasy MinElute spin-Säule aufgetragen, welche vorher in einem 2 ml Eppendorfgefäß platziert wurde. Es erfolgte eine anschließende Zentrifugation bei 8000 g für 15 s. Nach dieser wurden 350 µl RW1-Waschpuffer auf die Säule aufgetragen, welche dann erneut bei 8000 g für 15 s zentrifugiert wurde. Nun wurden 10 µl DNase I Stock Lösung mit 70 µl RDD-Puffer vorsichtig vermengt und auf die Säule pipettiert, welche dann für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde die Säule erneut mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Nach Überführen der Säule in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß wurden auf diese 500 µl RPE-Puffer aufgetragen und sie wurde 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Daraufhin wurden 500 µl 80 %iges Ethanol zugegeben und die RNA-bindende Säule wurde 2 min bei 8000 g zentrifugiert. Nun erfolgten ein Platzieren der Säule in einem neuen 2 ml-Tube und ein Zentrifugieren für 5 min bei 13000 g, um die Säule zu trocknen. Für die RNA-Elution wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Tube überführt. Dann wurden 14 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Mitte der Säule aufgetragen, welche dann 1 min bei 13000 g zentrifugiert wurde. Die eluierte RNA wurde bei -80 °C gelagert. Ein Teil der so gewonnenen RNA wurde zur Konzentrationsbestimmung mithilfe eines Fotometers (NanoDrop 8000, Thermo Scientific) ver-

wendet. Mit den gemessenen Extinktionswerten bei 260 und 280 nm wurde die Konzentration der RNA berechnet.

3.4.2 Synthese der cDNA

Für die Durchführung einer PCR wurde zunächst die RNA in cDNA umgeschrieben. Die Herstellung der cDNA erfolgte mithilfe der Reversen Transkriptase. Es wurden das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#4368814) und der RNase Inhibitor (#N8080119) von Applied Biosystems (Foster City, USA) verwendet. Das Enzym Reverse Transkriptase ist in der Lage, RNA unter Verwendung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten in cDNA umzuschreiben. Hierfür wurde die RNA zunächst (wenn das Volumen der eluierten RNA nicht ausreichte) mit sterilem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Es wurde bei ständiger Lagerung auf Eis ein Mix aus folgenden Inhaltsstoffen hergestellt:

- 2 µl 10 × RT-Puffer
- 0,8 µl 25 × dNTPs (100 mM)
- 2 µl 10 × RT Random Primer
- 1 µl MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)
- 1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)
- 3,2 µl steriles Wasser

Das entstandene Volumen betrug 10 µl. Dieses wurde im Anschluss zur RNA gegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Es erfolgte nun im Thermocycler eine zehnmünütige Erwärmung auf 25 °C. So konnte eine Anlagerung der Random Primer an die RNA erfolgen. Dann wurde bei 37 °C über einen Zeitraum von 120 min die cDNA synthetisiert. Durch Erwärmung auf 85 °C für 5 s wurde das Enzym inaktiviert. Schließlich erfolgte eine Abkühlung auf 4 °C. Die cDNA konnte dann bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

3.4.3 Real-time PCR

Die real-time quantitative-PCR bzw. quantitative Echtzeit-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Hierzu wurde dieser ein fluoreszierender Farbstoff zugegeben, der mit der

doppelsträngigen DNA interkalierte, wobei ein messbares Lichtsignal abgegeben wurde. Folgender Mix wurde je Ansatz auf Eis hergestellt:

- 6,25 µl Immo Mix™ (Bioline, #Bio-25020, enthielt u. a. die Taq-Polymerase und dNTPs)
- 0,25 µl 50 × SYBR Green Solution I (Bioline, #S7563)
- 0,5 µl Primer fw/rv (10 pmol/µl)
- ~ 20 ng Template (cDNA)
- H₂O (steril)

Die Volumina von Wasser und Template wurden je nach Ausgangskonzentration der cDNA variiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 12,5 µl ergab. Dieses wurde anschließend im dreifachen Ansatz in je ein Well einer MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction-Platte (Applied Biosystems, #4346906) pipettiert. Die real-time PCR wurde in einem StepOnePlus™-Gerät durchgeführt (Applied Biosystems). Für jeden Ansatz wurden Negativkontrollen, d. h. Ansätze ohne Template, durchgeführt. Die PCR lief nach einer initialen zehnmütigen Denaturierung bei 95 °C in drei Schritten ab:

1. 15 s Melting bei 95 °C
2. 1 min Annealing bei 64 °C
3. 30 s Elongation bei 77 °C

Insgesamt erfolgten 40 Zyklen. Die Amplifikationskurven sind in Abbildung 6 exemplarisch dargestellt. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Anhand der Schmelzkurven war es möglich zu erkennen, ob es sich bei der amplifizierten DNA um die gesuchten Gene oder nur um unspezifische Produkte handelte. Die anschließende Berechnung der relativen Genexpression erfolgte mithilfe einer Auswertungssoftware des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems. Aus der gemessenen Emission des fluoreszierenden Farbstoffes wurden Amplifikationskurven entwickelt. Es wurde ein Schwellenwert im Bereich des linearen Anstiegs der Kurven festgelegt (schwarze waagerechte Linie in Abb. 6, mit ‚Threshold‘ gekennzeichnet). Hieraus konnten die C_T-Werte als Schnittpunkte des Schwellenwertes mit den Amplifikationskurven abgeleitet werden. Diese entsprachen der Anzahl an Zyklen, die erforderlich waren, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte mithilfe der ΔC_T-Methode. Die Differenz der C_T-Werte der Re-

zeptorgene und des C_T -Wertes von β -Aktin als Vergleichsstandard ergibt den ΔC_T -Wert als Maß für die relative mRNA-Menge der untersuchten Gene:

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Zielgen})} - C_{T(\text{Referenzgen})}$$

Das Ergebnis wurde dann in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta C_T}$$

Unter Berücksichtigung der Primereffizienzen E verwendeten wir folgende Formel:

$$\text{Relative Genexpression} = E^{-\Delta C_T}$$

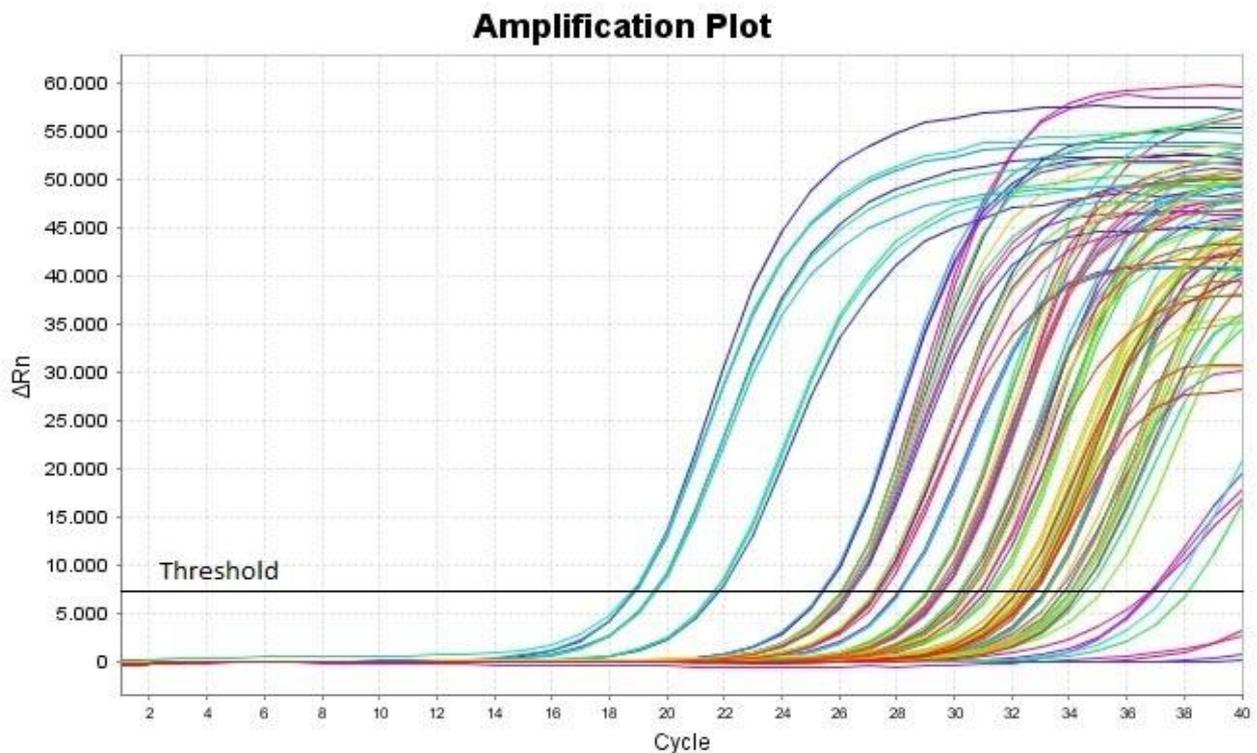


Abb. 6: Exemplarische Darstellung der Amplifikationskurven aller neun Rezeptorgene sowie von β -Aktin. Die rote waagerechte Linie entspricht dem in diesem Fall festgelegten Schwellenwert (Threshold). Auf der y-Achse ist die Stärke des Fluoreszenzsignals dargestellt, auf der x-Achse die Anzahl der durchlaufenen Zyklen (eigene Abbildung aus der StepOne™ Software v2.0 – afferente Arteriolen).

Um die relative Expression für Hypoxie/Reoxygenierung zu berechnen, wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet. Die Formel hierfür lautet:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-(\Delta C_T \text{ Behandlung} - \Delta C_T \text{ Kontrolle})} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (183)$$

Da unter Hypoxie die Amplifikationsrate für β -Aktin nicht dem Qualitätsstandard entsprach (zu erkennen an einer zu geringen Steigung der Amplifikationskurve), wurde für diese Bedingungen das Referenzgen 18S RNA als Normalisierungsgrundlage verwendet. Sowohl β -Aktin als auch 18S RNA stellen geeignete Referenzgene für die Expressionsanalyse unter hypoxischen Bedingungen dar (162, 165).

In Tabelle 5 sind die Gensequenzen aller in der real-time PCR verwendeten Primer (adrenerge Rezeptoren, β -Aktin sowie 18S RNA) aufgelistet.

Tabelle 5: Gensequenzen der einzelnen Primer für die adrenergen Rezeptoren, β -Aktin und 18S RNA.

Primer	Genbank	Sequenz	Produktgröße
Adr. α_{1A}	NM_013461	fw: TGC GAG GAC TGA AGG TCC GCT rv: CAG GGA CGC TGG GCG AAT GG	220 bp
Adr. α_{1B}	NM_007416	fw: TCC AGG GAA AAG AAA GCA GCC AA rv: GGG TAG ATG ATG GGG TTG AGG CA	190 bp
Adr. α_{1D}	NM_013460	fw: TAA GGC TGC TCA AGT TTT CCC GC rv: TGA GCG GGT TCA CAC AGC TAT TGA	200 bp
Adr. α_{2A}	NM_007417	fw: TCC GCT GCC TCT TGG GGT AAG A rv: TCT AAG CGG CAG GAT CGA GTA GGG	190 bp
Adr. α_{2B}	NM_009633	fw: TGG TAC ATC TTG GCT TCC AGC ATC G rv: TTT AGC CGA GGC TGG AAC TCC C	187 bp
Adr. α_{2C}	NM_007418	fw: CCA ATG AGC TCA TGG CCT ACT GGT rv: AGA TGA GCC ACA CGG CCA CGA T	205 bp
Adr. β_1	NM_007419	fw: TCG TGT GCA CAG TGT GGG CCA T rv: TGA TGC ACA GGG GCA CGT AGA AG	180 bp
Adr. β_2	NM_007420	fw: TGT GGA ATT TTG GCA ACT TCT GGT G rv: AGG CAA AAA GGA GGT AAG GCC AGA T	207 bp
Adr. β_3	NM_013463	fw: ACT TTC GCG ACG CCT TCC GT rv: TTG CTG GAT CTT CAC GGC CCT	190 bp
β-Aktin	NM_007393	fw: CAC CCG CGA GCA CAG CTT CTT T rv: AAT ACA GCC CGG GGA GCA TC	155 bp
18S RNA	NM_10098.1	fw: GAT CAA AAC CAA CCC GGT CA rv: CCG TTT CTC AGG CTC CCT CT	227 bp

3.5 Erstellen der Standardkurven

Die Standardkurven dienen der Ermittlung der Effizienz der spezifischen Primer und wurden vor den eigentlichen Untersuchungen bestimmt. Als Ausgangsmaterial wurde Gewebe einer Mausniere (C57BL/6) verwendet. Die primerspezifischen Gensequenzen wurden in einen pCR2.1-Vektor kloniert, um ein stabiles Template zu haben. Mithilfe einer Verdünnungsreihe ließen sich die für die Berechnung der Effizienz der Primer notwendigen Standardkurven erstellen. Dadurch war es möglich, die Ergebnisse der real-time PCRs für die verschiedenen Rezeptoren zu vergleichen.

3.5.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine sensitive Möglichkeit zur Vervielfältigung von DNA. Das verwendete Enzym Taq-Polymerase ist in der Lage, bestimmte Sequenzen der Desoxyribonukleinsäure nach Anlagerung spezifischer Primer, welche den Beginn und die Länge des zu amplifizierenden Abschnittes festlegen, zu binden und anschließend zu kopieren. Dies geschieht unter Verwendung von dNTP, welche sich an die gegensätzlichen Nukleotide anlagern. Der synthetisierte, zur Ausgangssequenz komplementäre DNA-Strang steht der Polymerase nun auch als Template zur Verfügung. Diese Amplifikation erfolgt exponentiell. Bei einer Durchführung von beispielsweise 40 Zyklen lässt sich somit eine DNA-Vervielfältigung von 2^{40} erreichen. Um für die Taq-Polymerase optimale Bedingungen zu schaffen, wurde für die zu vervielfältigenden Sequenzen jeweils folgender Ansatz pipettiert:

- 2,5 µl 10 × Puffer Y
- 4 µl dNTPs (1,25 mM)
- 0,18 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)
- 1 µl Primer fw/rv (10 pmol/µl)
- 16,32 µl H₂O (steril)
- 1 µl Template (Gewebe der Mausniere, c = 20 ng/nl)

Es wurden Mausprimer für alle neun adrenergen Rezeptoren verwendet. Als vergleichender Standard diente das Haushaltsgen β -Aktin (Sequenzen siehe Abschnitt 3.4.3).

Die Vervielfältigung der DNA erfolgte im T3 Thermocycler (Biometra) mit folgenden Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA mit Aufspaltung in die Einzelstränge bei 95 °C für 5 min
2. Melting bei 95 °C für 30 s
3. Anlagerung der Primer (Annealing) bei 64 °C für 30 s
4. DNA-Polymerisierung (Elongation) bei 72 °C für 30 s
5. DNA-Polymerisierung bei 72 °C für 10 min
6. Herunterkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. bis 4. wurden insgesamt 35-mal wiederholt. Die entstandene DNA konnte dann bei -20 °C gelagert werden.

3.5.2 Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese dient der Überprüfung der Amplifikationsprodukte der PCR. Sie beruht auf dem Prinzip der Wanderung der negativ geladenen DNA in einem elektrischen Feld. Hierfür wird diese in Taschen eines Agarose-Gels pipettiert, welches von einem ionischen Puffer umspült wird. Nach Anlegen des elektrischen Feldes wandert die DNA innerhalb des Gels zur Anode, je nach Größe unterschiedlich weit. Anhand der Laufstrecke und mithilfe eines mitlaufenden Größenstandards lässt sich das PCR-Produkt identifizieren. Für die Elektrophorese wurde 1,5 %iges Agarose-Gel verwendet. Zur Sichtbarmachung der Banden im Gel wurde der Agarose-Lösung SYBR™ Safe™ DNA Gel Stain (10000 x, Invitrogen, #S33102), ein Fluoreszenzfarbstoff, zugesetzt. Alle PCR-Samples wurden mit 6-fach konzentriertem Ladepuffer versetzt (4,5 µl auf 25 µl PCR-Produkt), damit diese in den Geltaschen absinken konnten und nicht beim Pipettiervorgang verloren gingen und eine visuelle Kontrolle während des Laufs erfolgen konnte. Die Zusammensetzung des Puffers lautete:

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,6
- 0,15 % Orange G
- 0,03 % Xylencyanol
- 60 % Glycerin
- 60 mM EDTA

Bei der Auftrennung wurde ein 100 bp-DNA-Leiter eingesetzt, anhand dessen man die Größe der aufgetrennten Produkte in Abhängigkeit von der Laufstrecke abschätzen und, da die Größe der zu erwartenden Gene bekannt war, unspezifische Produkte identifizieren konnte. Die Elektrophorese bei ca. 100 V dauerte ungefähr 20 bis 30 min.

3.5.3 Gel-Elution

Die Elution der genspezifischen Banden des Gels diente der Wiedergewinnung der für die Elektrophorese verwendeten DNA der adrenergen Rezeptoren. Zum Ausschneiden der Banden wurden Mikroskop-Deckgläschen verwendet. Die anschließende Elution erfolgte mit dem MicroElute™ Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek, #D6294-01). Dabei war zunächst ein Abwiegen der einzelnen Gelstücke erforderlich, hieraus ließ sich das Volumen ermitteln. Die Gelstücke wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit dem gleichen Volumen an Binding Puffer (XP2) versetzt. Es folgte ein zehninütiger Inkubationsvorgang bei 55 °C im Thermomixer, was dem Schmelzen des Gels diente. Während des Schmelzens wurde der Gel-Puffer-Mix alle 2 min gevortext (Vortexer VF2 Jahnke und Kunkel IKA Labortechnik). Nun wurde eine MicroElute™ Hi Bind® DNA-Säule in einem 2 ml-Eppendorfgefäß platziert. Der Gel-Puffer-Mix wurde auf die Säule aufgetragen (maximales Volumen/Säule: 700 µl) und anschließend wurde diese 1 min bei 10000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Auf die Säule wurden nun 300 µl Binding Puffer (XP2) pipettiert, danach wurde wie im vorherigen Schritt zentrifugiert. Es wurden 700 µl Waschpuffer SPW (mit Ethanol versetzt) auf die DNA-Säule gegeben, welche erneut wie oben zentrifugiert wurde. Dieser Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde anschließend wiederholt. Im Anschluss daran folgte eine weitere Zentrifugation bei 13000 g für 2 min, was dem Trocknen der Säule diente. Diese wurde danach in ein 1,5 ml-Tube überführt. Es wurden 15 µl H₂O (steril) auf die Mitte der Säule gegeben, welche nach ein- bis zweiminütiger Inkubationszeit im abschließenden Schritt 1 min bei 13000 g Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Die löste die DNA aus der Säule, welche anschließend bei -20 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt wurde.

3.5.4 Einbau der Templates in Plasmide (Ligation)

Bei Plasmiden handelt es sich um kleine, doppelsträngige, meist ringförmige DNA-Moleküle, die sich als Vektoren nutzen lassen, um bestimmte Gene zu vervielfältigen. Die verwendeten Plasmide besaßen neben dem Ampicillin-Resistenz-Gen zusätzlich das Gen LacZ. Dieses sorgte dafür, dass nach Zugabe eines Substrates ein blauer Farbstoff gebildet wurde, wenn das gesuchte Gen nicht in das betreffende Plasmid eingebaut wurde. War die Integration des Gens in das Plasmid erfolgreich, so blieb die jeweilige Zell-Kolonie (*E. coli*), in welche die Plasmide mit dem Ziel der Replikation des gesuchten Gens transformiert wurden, weiß. Auf diese Weise ließen sich die Zellkolonien mit dem replizierten und zu untersuchenden Gen identifizieren. Für die Ligation der DNA der adrenergen Rezeptoren wurde das Original TA Cloning® Kit (pCR2.1 Vector; Invitrogen, #45-0046) verwendet. Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 5 µl H₂O (steril)
- 1 µl 10 × Ligationspuffer
- 2 µl Vektor (Plasmid-DNA)
- 1 µl Template (eluierte DNA aus Schritt 3.5.3)
- 1 µl Ligase

Dieser wurde über Nacht (mindestens 6 h) im Kühlschrank inkubiert, damit die Ligase die DNA in die Vektoren (Plasmide) einbauen konnte.

3.5.5 Transformation und Klonierung

Die Transformation ist das Einschleusen der Plasmide in die chemisch kompetent gemachten Zellen von Bakterien oder anderen Mikroorganismen, was ihnen die Möglichkeit der Genreplikation bietet. Hierfür wurden 10 µl Ligationsansatz zu 80 µl kompetenten Top F10-Zellen (*E. coli*) gegeben und diese wurden für 20 min auf Eis inkubiert. Zwei weitere Inkubationsschritte (1 min bei 42 °C im Thermomixer und 2 min auf Eis) folgten. Dies diente dazu, die Poren der Zellen zur Aufnahme der Plasmide zu öffnen und wieder zu schließen. Anschließend wurden zu diesem Ansatz 250 µl SOC-Medium (Invitrogen, #15544-034) pipettiert. Das Gemisch wurde 1 h bei 37 °C und 800 rpm im Thermomixer inkubiert. Nun erfolgte die Vorbereitung des Nährbodens für die *E. coli*-Bakterienkulturen. Dafür wurden die verwendeten Ampicillin-Agar-Platten zunächst bei

37 °C getrocknet. Anschließend wurden auf den Nährböden je 40 µl XGal (40 mg/ml; Roth, #2315.3) und IPTG (100mM; Roth, #2316.2) ausplattiert, welche das Substrat für das in Abschnitt 3.5.4 erwähnte LacZ bildeten. Nun wurde das E. coli-SOC-Medium-Gemisch auf die Platten aufgetragen und diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dies führte zum Wachsen von Zellkolonien, welche sich nun weiterverarbeiten ließen. Die Agar-Platten konnten für weitere Schritte im Kühlschrank gelagert werden.

3.5.6 PCR und Gel-Elektrophorese

Um zu überprüfen, ob die Bakterienkulturen tatsächlich die spezifischen Gene enthielten, war eine weitere PCR notwendig. Als Template wurden die in Abschnitt 3.5.5 hergestellten Klone verwendet, indem etwas davon mit einer Pipettenspitze aufgenommen und zum restlichen PCR-Ansatz pipettiert wurde, welcher wie folgt lautete:

2,5 µl 10 × Puffer Y
4 µl dNTPs (1,25 mM)
0,18 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)
1 µl Primer fw/rv (10 pmol/µl)
17,32 µl H₂O (steril)

Es wurden die in Abschnitt 3.4.3 aufgelisteten Primer verwendet. Zusätzlich wurde ein M13-Primer genutzt. Dieser flankierte einen Bereich im Plasmid, in welchem die Gensequenzen der betreffenden Rezeptoren eingeschlossen waren. Mithilfe der Gel-Elektrophorese ließ sich anhand der Laufstrecke erkennen, ob in der jeweiligen Bakterienkultur tatsächlich das zu untersuchende Rezeptorgen kloniert wurde. Im Falle einer fehlenden Klonierung war das amplifizierte DNA-Segment für den M13-Primer kleiner (198 bp) und die Laufstrecke in der Elektrophorese kürzer. Die PCR erfolgte in den in 3.5.1 beschriebenen Schritten. Die Annealing-Temperatur lag hier allerdings bei 60 °C, da sich diese Temperatur näher am Optimum für die Anlage der M13-Primer befand. Zur Auswertung diente eine Gel-Elektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.2). Anschließend wurde ein Teil der verwertbaren Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in Falcon-Tubes gegeben, in denen sich 5 ml LB-Nährmedium und 5 µl Ampicillin befanden. Eine Inkubation dieser Tubes bei 37 °C über Nacht bewirkte eine weitere Zellvermehrung. Anschließend wurde ein Teil dieser Kulturen (500 µl pro Tube) mit 500 µl Gly-

cerol versetzt und in Cryo-Tubes gegeben, welche bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Dies diente dem Anlegen eines Cryogenvorrats für den Fall, dass weitere Schritte misslingen und eine Wiederholung notwendig werden sollte, sowie zur langzeitigen Lagerung der Klone.

3.5.7 Pelletieren der Kolonien

Die für die Gene positiven Bakterienkulturen wurden zur Isolierung der DNA weiterverwendet. Sie wurden ca. 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5000 g zentrifugiert, wodurch sich am Boden der Röhrchen ein Pellet absetzte. Der Überstand wurde abgekippt und die Isolierung der Plasmid-DNA folgte.

3.5.8 Miniprep

Nach einer erfolgreichen Klonierung und Überprüfung der Gene mussten diese nun aus den Bakterienkulturen isoliert werden. Es wurde hierfür das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, #27106) verwendet. Zunächst wurden zu den Pellets jeweils $250\text{ }\mu\text{l}$ P1-Puffer gegeben und die Pellets wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst. Anschließend wurde das Gemisch in ein Eppendorfgefäß überführt, es wurden $250\text{ }\mu\text{l}$ des P2-Puffers dazugegeben und beides wurde durch erneutes Auf- und Abpipettieren (vier- bis sechsmal) vermengt. $350\text{ }\mu\text{l}$ N3-Puffer wurden nach zwei- bis fünfminütiger Inkubation zum Gemisch pipettiert und alles wurde wieder vorsichtig durch vier- bis sechsmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Es folgten ein Zentrifugationsschritt bei 17900 g für 10 min und ein Überführen des Überstandes in eine in einem Eppendorfgefäß gelagerte QIAprep Spin-Säule. Diese wurde bei der gleichen Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert und anschließend mit $750\text{ }\mu\text{l}$ PE-Puffer (mit 96 bis 100 %igem Ethanol versetzt) beladen. Nun wurde die Säule zweimal für 1 min zentrifugiert und dazwischen wurde der Überstand verworfen. Der letzte Zentrifugationsschritt diente dem Trocknen der Säule. Zuletzt musste die DNA aus der Säule eluiert werden. Dafür wurde die Säule in ein $1,5\text{ ml}$ -Eppendorfgefäß überführt, es wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ H_2O (steril) direkt auf ihre Mitte gegeben und anschließend wurde die Säule je 1 min inkubiert und wie oben zentrifugiert. Die Konzentrationen der DNA ließen sich im Abschluss fotometrisch bei 260 nm ermitteln. Zunächst wurden dafür die Proben 1:20 mit sterilem H_2O verdünnt und mittels Fotometer wurde die OD_{260} ermittelt. Hieraus ließ sich wie folgt die DNA-Konzentration berechnen:

$$C = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor (20)} \times \text{DNA-Faktor (50)}$$

Die DNA wurde im Anschluss bei -20 °C gelagert.

3.5.9 Überprüfung der Miniprep mit PCR und Gel-Elektrophorese

Um sicherzugehen, dass die eluierte DNA tatsächlich für die adrenergen Rezeptoren kodierte, wurde im Anschluss eine erneute PCR pipettiert. Der Ansatz für diese setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 2,5 µl Puffer Y
- 2 µl dNTPs (2,5 mM)
- 0,1 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)
- 1 µl Primer fw/rv (10 pmol/µl)
- 18,4 µl H₂O (steril)
- 1 µl Template (isolierte DNA aus Schritt 3.5.8)

Die Primer sind Abschnitt 3.4.3, die Durchführung ist Abschnitt 3.5.1 zu entnehmen. Zusätzlich wurde wieder der M13-Primer verwendet. Im Anschluss an die PCR wurde eine Gel-Elektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.2) durchgeführt. War diese für die betreffenden Gene positiv, konnte die jeweilige DNA zum Sequenzieren verschickt werden.

3.5.10 Real-time PCR und Erstellen der Standardkurven

Um die Effizienz der real-time PCR für die sequenzierten Primer zu überprüfen, wurde für alle Primer eine Verdünnungsreihe angelegt und diese wurde mit der real-time PCR amplifiziert. Der Ansatz für die PCR lautete:

- 6,25 µl Immo MixTM (Bioline, #Bio-25020, enthielt u. a. die Taq-Polymerase und dNTPs)
- 0,25 µl 50 × SYBR Green Solution I (Bioline, #S7563)
- 0,5 µl Primer fw/rv (10 pmol/µl)
- 4,5 µl H₂O (steril)
- 1 µl Template (PCR-Amplifikationsprodukt aus Abschnitt 3.5.9, c = 50 ng/µl)

Für die Verdünnungsreihe wurden die Templates zunächst auf identische Konzentrationen von 50 ng/µl vorverdünnt, um gleiche Bedingungen zu schaffen. Dann wurden die Templates sechsmal 1:10 verdünnt (1 µl Template mit 9 µl H₂O [steril]), sodass sich jeweils eine Verdünnungsreihe in sieben Schritten (beginnend mit der Ausgangskonzentration) ergab. Von diesen Verdünnungen wurde je 1 µl zum zugehörigen PCR-Ansatz pipettiert. Die Auswertungssoftware des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems erstellte nach Durchführung der qPCR (Zeiten und Temperaturen siehe 3.4.3) die Standardkurven und berechnete mit ihrem negativen Anstieg (Slope *s*) die Effizienz, wobei ein Slope von -3,3 annähernd einer Effizienz von 100 % entspricht. Die Formel für die Berechnung der Effizienz lautet:

$$E = 10^{-1/s}$$

$E = 2$ entspricht hierbei einer Effizienz von 100 %.

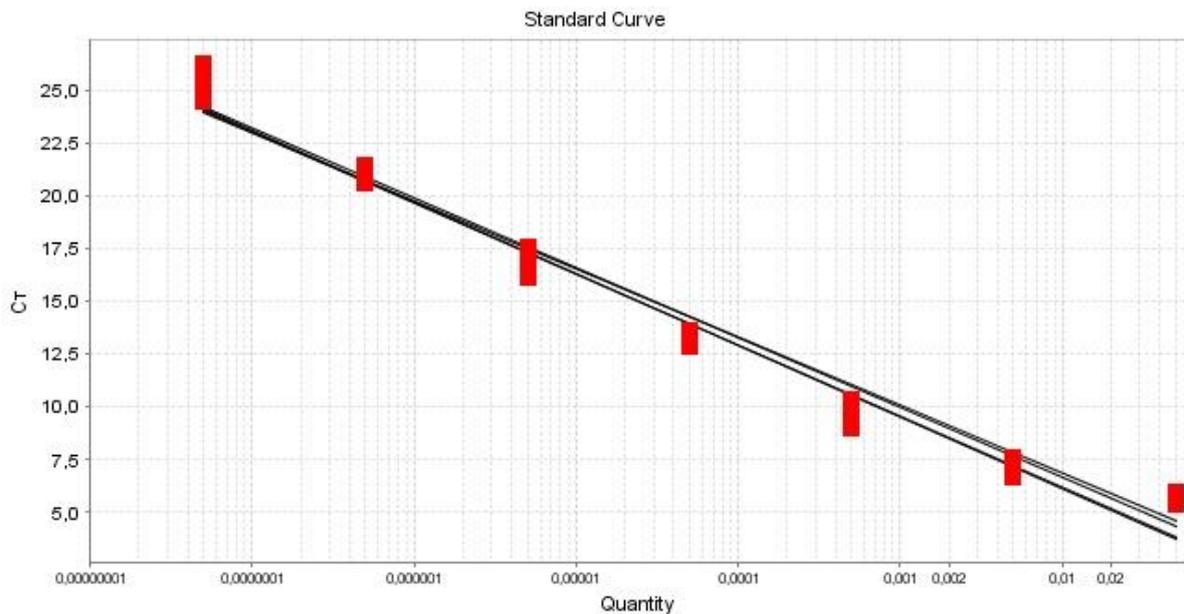


Abb. 7: Exemplarische Darstellung der Standardkurven. In diesem Fall handelt es sich um die Kurven für die Rezeptorgene Adr. β_1 , Adr. β_2 , Adr. β_3 sowie das β -Aktin-Gen. Auf der y-Achse sind die C_T-Werte dargestellt, auf der x-Achse die cDNA-Konzentrationen in µg (eigene Abbildung aus der StepOne™ Software v2.0).

In der folgenden Tabelle 6 werden die Effizienzen für die einzelnen Primer dargestellt.

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Primereffizienzen für die adrenergen Rezeptoren und β -Aktin.

Rezeptor	Effizienz
Adr. α_{1A}	1,815
Adr. α_{1B}	1,967
Adr. α_{1D}	1,892
Adr. α_{2A}	2,068
Adr. α_{2B}	2,115
Adr. α_{2C}	2,093
Adr. β_1	1,97
Adr. β_2	1,985
Adr. β_3	2,009
β -Aktin	2,046

Eine Effizienz von 2 bedeutet, dass die PCR optimal arbeitet. In der Theorie kann die Effizienz also 2 nicht übersteigen. In den in der Tabelle aufgeführten Messungen ist dies trotzdem der Fall, was vermutlich auf Messungenauigkeiten und Nebenprodukte (wie z. B. Primerdimere) zurückzuführen ist. Auf die Bestimmung der Effizienz für das Referenzgen 18S RNA verzichteten wir, da dieses lediglich für die Expressionsanalysen Hypoxie vs. Normoxie verwendet wurde. Hierbei handelte es sich um vergleichende Untersuchungen mit der gleichen Methode, somit musste die Effizienz nicht berücksichtigt werden.

3.6 Darstellung der Daten und statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel, die grafische Darstellung mit Graph Pad Prism. Für die statistischen Auswertungen wurde Sigma Plot verwendet.

Expressionsuntersuchungen:

Die ΔC_T -Werte der drei Ansätze der PCR für jedes Gen wurden gemittelt. Für die einzelnen Gene wurden für die afferenten Arteriolen Mittelwerte und Standardabweichungen aus der Zahl der verwendeten Tiere berechnet. In einigen Fällen (Aa. interlobares respektive große renale Arterien, Aa. arcuatae und efferente Arteriolen) wurden Mate-

rialien von Tieren zusammengefasst (siehe Abschnitte 4.1.1, 4.1.2 und 4.1.4). Für die Beurteilung der Unterschiede in der Expression nach Hypoxie/Reoxygenierung einzelner Rezeptoren im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde der Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Es konnte aufgrund der relativ geringen Größe der Gruppen ($n = 9$) nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden und daher wurde ein nichtparametrisches Prüfverfahren ausgewählt.

Funktionelle Untersuchungen:

Arteriolen: Die Darstellung der konzentrationsabhängigen Noradrenalinwirkung erfolgte als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die Bewertung der Unterschiede in den Konzentrations-Dosis-Kurven für Noradrenalin von afferenten und efferenten Arteriolen wurde mit einer ANOVA für wiederholte Messungen und nicht-normalverteilte Proben (Brunner-Test, R-Projekt, <https://www.r-project.org/>) vorgenommen. Als post hoc-Test diente der Mann-Whitney-Test.

Arterien: Es wurden EC_{50} -Werte für einzelne Tiere berechnet. Der Gruppenvergleich von Hypoxie/Reoxygenierung versus Kontrollgruppe erfolgte dann mittels Mann-Whitney-Test.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 0,05 für alle Tests.

4. Ergebnisse

4.1 Relative Expression der adrenergen Rezeptoren in den verschiedenen Gefäßabschnitten

In der vorliegenden Arbeit wurde die relative Expression der RNA für die verschiedenen adrenergen Rezeptoren in mehreren Gefäßabschnitten von Mausnieren ermittelt. Es handelte sich um die Rezeptoren α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 und β_3 .

Untersucht wurden folgende Gefäßabschnitte:

- Arteria interlobaris
- Arteria arcuata
- afferente Arteriolen
- efferente Arteriolen

4.1.1 Expression der adrenergen Rezeptoren in der Arteria interlobaris

Für alle neun adrenergen Rezeptoren konnte mRNA in unterschiedlicher Menge aus den Interlobararterien isoliert werden. In der Abbildung 8 ist die relative Expression dieser dargestellt, als Referenzgen diente β -Aktin. Für die Expressionsanalysen wurden die 140 Gefäße der insgesamt 18 Tiere aufgrund der geringen Menge an Ausgangsmaterial zusammengefasst, die real-time PCR erfolgte im Anschluss auf die gesamte cDNA. Die Mittelwerte MW und Standardabweichungen SD berechneten sich daher in diesem Fall nicht aus der Zahl der verwendeten Tiere, sondern aus den Dreifachansätzen beim Pipettieren.

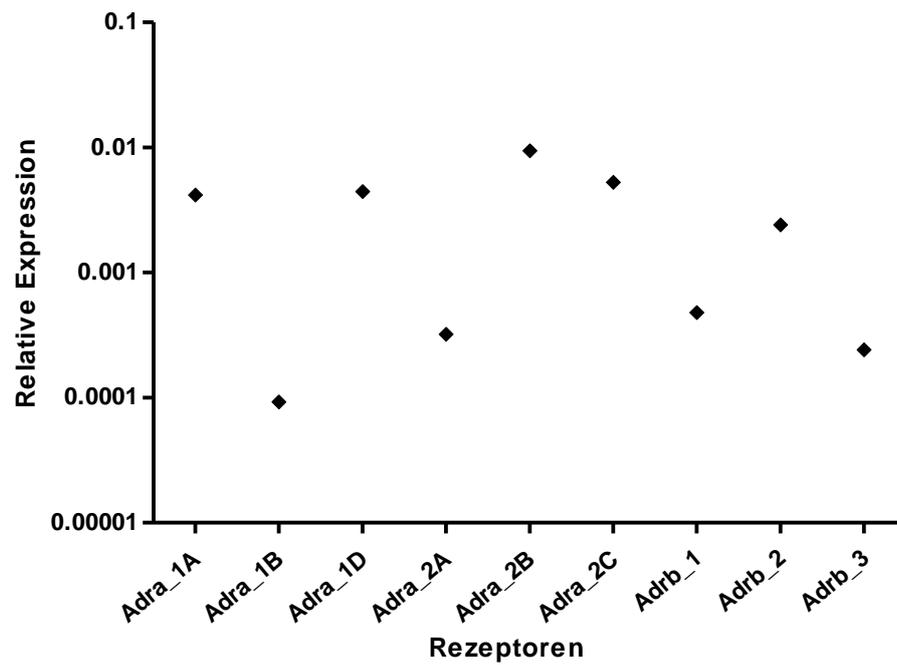


Abb. 8: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in der A. interlobaris (RNA aus 140 Arterien von insgesamt 18 Tieren).

Wenn man nun die Effizienz des Primers mit einberechnet, kommt es zu kleinen Änderungen, wie die folgende Abbildung 9 verdeutlicht.

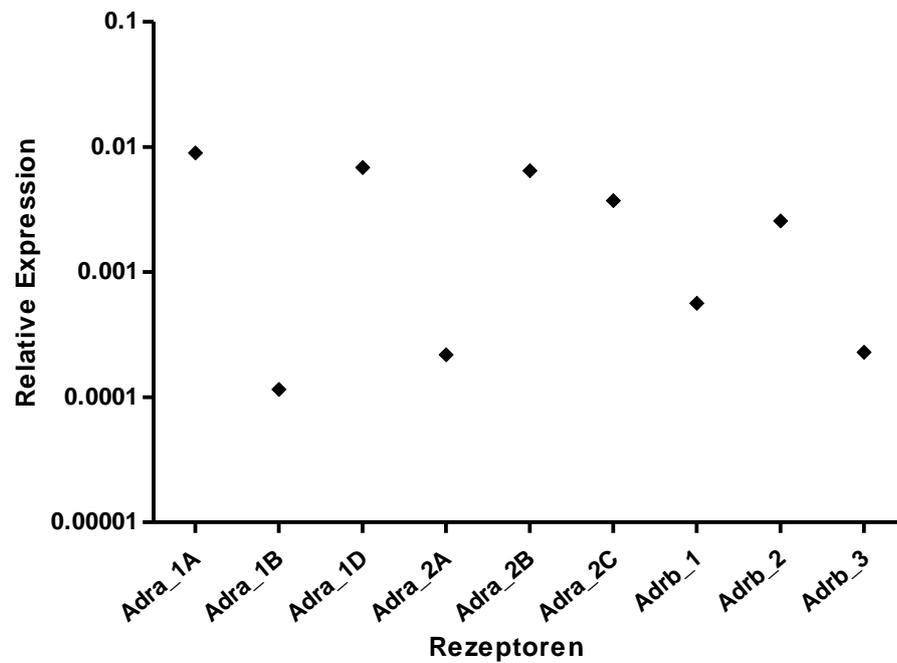


Abb. 9: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in der A. interlobaris (RNA aus 140 Arterien von 18 Tieren) unter Berücksichtigung der Primereffizienz.

4.1.2 Expression der adrenergen Rezeptoren in der Arteria arcuata

Im Gefäßabschnitt der A. arcuata konnte ebenfalls die mRNA sämtlicher adrenerger Rezeptoren in unterschiedlicher Menge isoliert werden. Abbildung 10 stellt die Expression grafisch dar. Für die Analyse der Genexpression in der A. arcuata wurden vier bis sechs Gefäße pro Tier aus insgesamt zwölf Tieren gewonnen und für einen PCR-Ansatz zusammengefasst. Wie bei den Interlobararterien ergaben sich hier ebenfalls die Mittelwerte und Standardabweichungen aus dem Dreifachansatz beim Pipettieren.

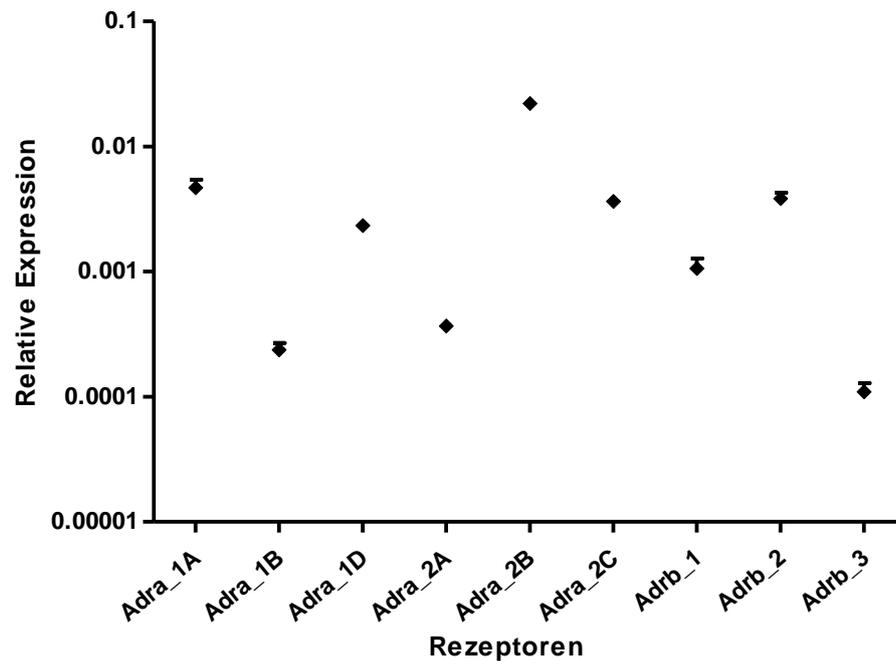


Abb. 10: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in der A. arcuata (RNA von vier bis sechs Gefäßen pro Tier aus insgesamt zwölf Tieren).

Auch hier ändern sich die Expressionen nur wenig, wenn man eine Berücksichtigung der Effizienz vornimmt. Dies stellt die Abbildung 11 dar.

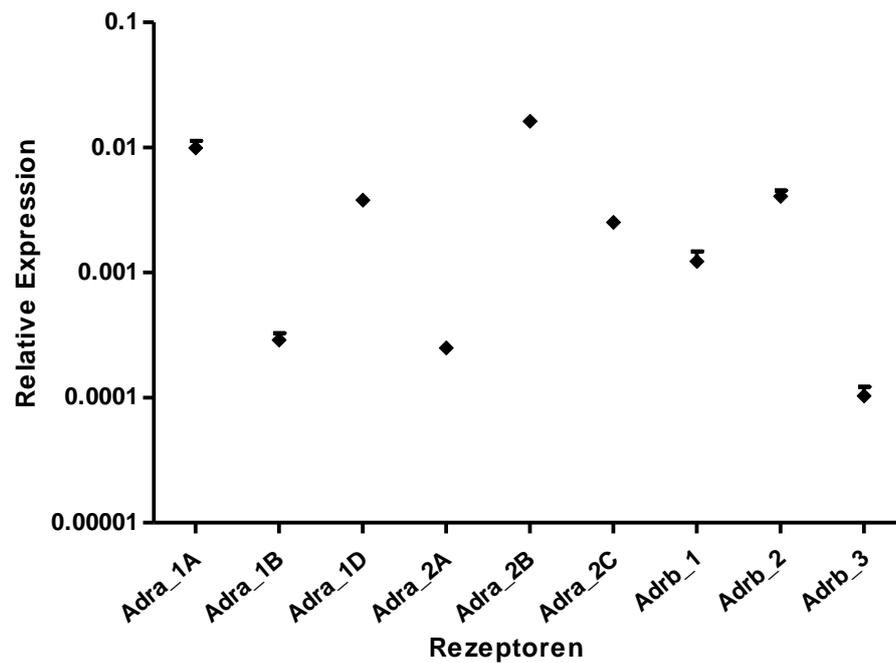


Abb. 11: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in der *A. arcuata* (RNA von vier bis sechs Gefäßen pro Tier aus insgesamt zwölf Tieren) unter Berücksichtigung der Primereffizienz.

4.1.3 Expression der adrenergen Rezeptoren in den afferenten Arteriolen

Im Bereich der afferenten Arteriolen wurde ebenfalls cDNA für alle neun Adrenozeptoren amplifiziert. Die Verteilung ähnelt der in den anderen Gefäßabschnitten. Aufgrund der deutlich höheren Menge an RNA für die afferenten Arteriolen, die durch die Eisensiebmethode gewonnen wurde, erfolgten die PCR und die ΔC_T -Berechnungen für alle sechs Tiere einzeln. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichungen relativer Expression in Abbildung 12 dargestellt.

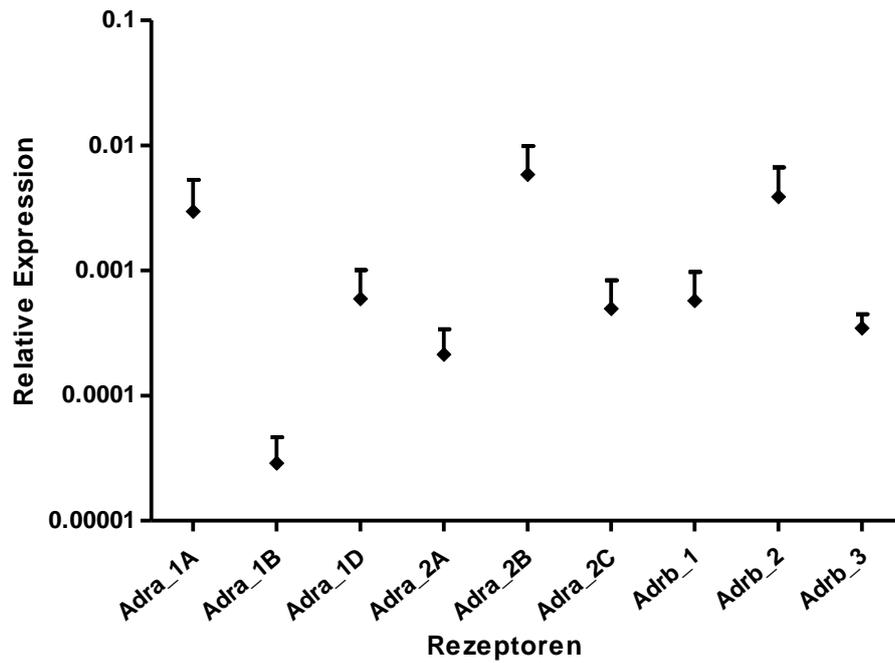


Abb. 12: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in den afferenten Arteriolen (MW \pm SD aus n = 6).

Die folgende Abbildung 13 stellt die relativen Expressionen unter Berücksichtigung der Effizienz dar.

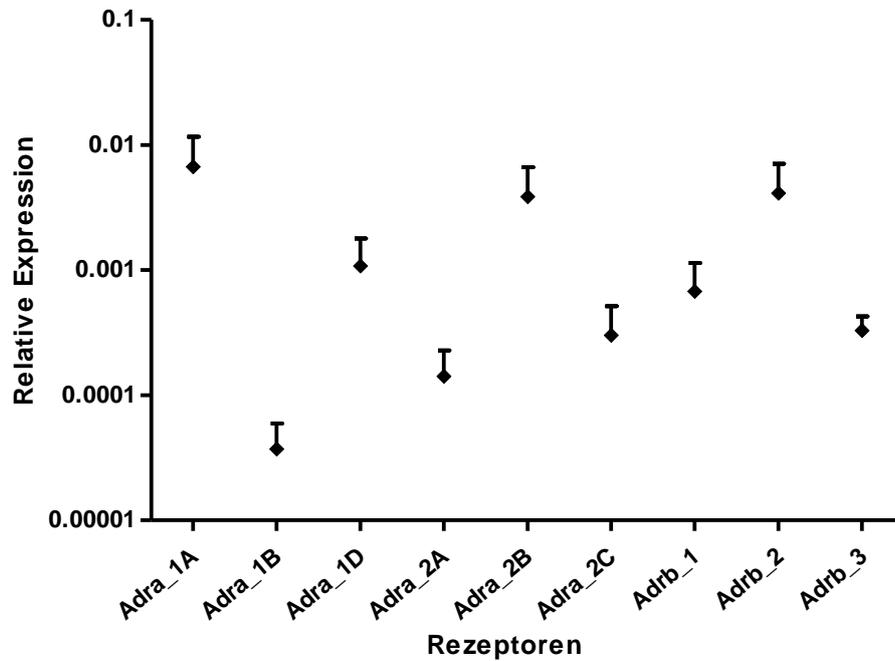


Abb. 13: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren in den afferenten Arteriolen (MW \pm SD aus n = 6) unter Berücksichtigung der Primereffizienz.

4.1.4 Expression der adrenergen Rezeptoren in den efferenten Arteriolen

Bei den efferenten Arteriolen war es aufgrund der geringen Ausgangsmenge an Material lediglich möglich, die mRNA für die Rezeptoren α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} zu isolieren. Die mRNA der 23 Gefäße der sechs Tiere wurde zusammengefasst und nach Umschreibung in cDNA amplifiziert, für eine zweite PCR konnte ausreichend mRNA aus dem Überstand des Puffers, in dem die Gefäße zuvor gelagert waren, isoliert und umgeschrieben werden. Die Δ_{CT} -Berechnungen erfolgten für beide PCRs einzeln, dann erfolgten die Mittelung und Berechnung der relativen Expression (Abb. 14).

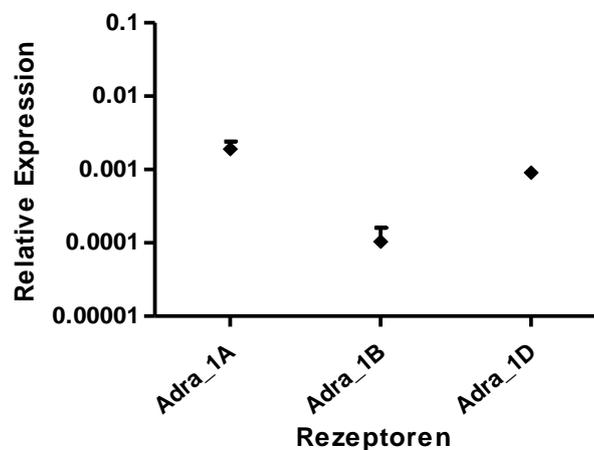


Abb. 14: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} in den efferenten Arteriolen (MW \pm SD aus zwei Ansätzen).

In Abbildung 15 ist die relative Expression der Rezeptoren nach Effizienzkorrektur dargestellt.

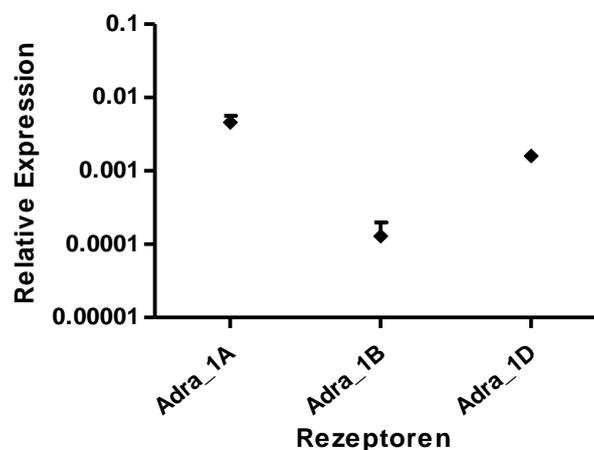


Abb. 15: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} in den efferenten Arteriolen (MW \pm SD aus zwei Ansätzen) unter Berücksichtigung der Primereffizienz.

4.2 Expression der adrenergen Rezeptoren nach Hypoxie/Reoxygenierung

Es wurde die relative Expression für die adrenergen Rezeptoren in den afferenten Arteriolen nach Hypoxie im Vergleich mit einer Kontrollgruppe untersucht. Die Isolierung der afferenten Arteriolen erfolgte mit der Eisenoxidsiebmethode, als Referenzgen diente diesmal 18S RNA. In Abbildung 16 sind die Mittelwerte der relativen Expressionen sowie die Standardabweichungen dargestellt. Für den adrenergen Rezeptor α_{1A} zeigte sich ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Hypoxie- und der Kontrollgruppe, die Expression des Rezeptors in der behandelten Gruppe war also signifikant niedriger. Die Unterschiede für die anderen Rezeptoren waren nicht signifikant.

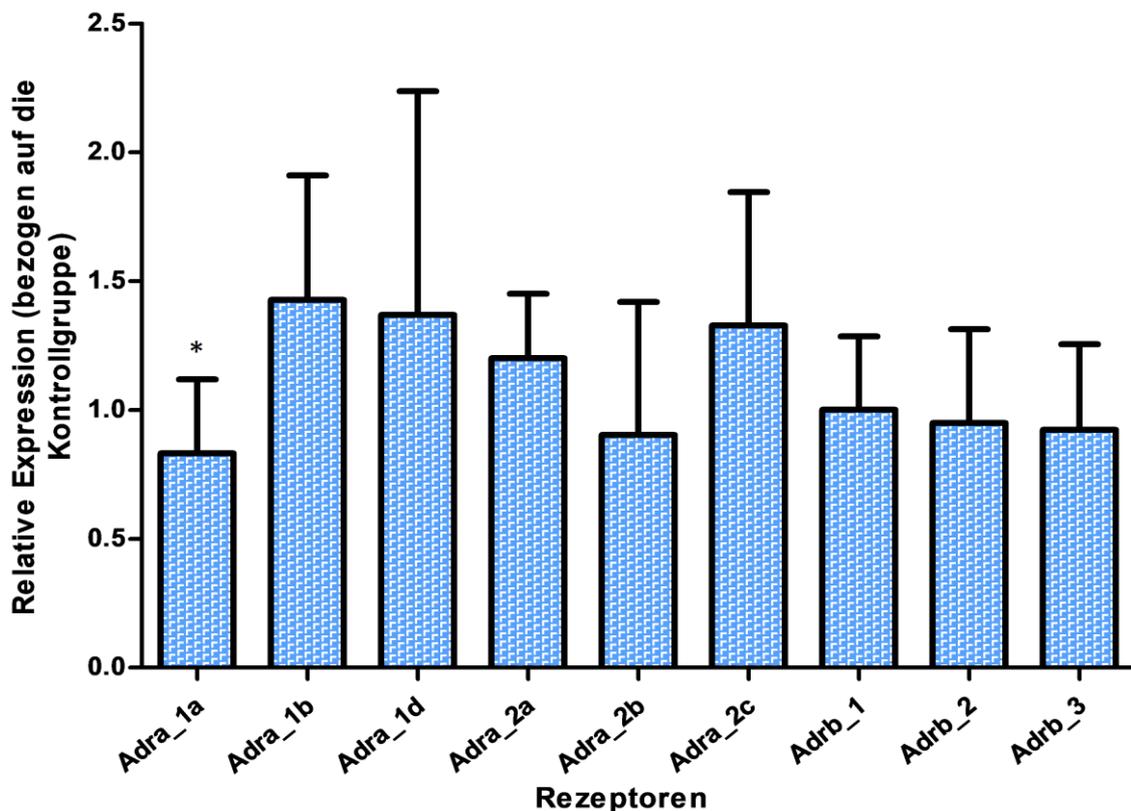


Abb. 16: Relative mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren der mit Hypoxie behandelten afferenten Arteriolen (MW ± SD von n = 9); * – signifikante Expressionsänderung für α_{1A} .

Die folgende Tabelle 7 stellt eine Übersicht über die Signifikanzen der Abweichungen von Hypoxie/Reoxygenierung zur Kontrollgruppe dar (* markiert Signifikanzen).

Tabelle 7: Darstellung der p-Werte für die einzelnen Rezeptoren. * – signifikante Abweichung.

Rezeptor	p-Werte
Adr. α_{1A}	0,034 *
Adr. α_{1B}	0,251
Adr. α_{1D}	0,536
Adr. α_{2A}	0,158
Adr. α_{2B}	0,052
Adr. α_{2C}	0,791
Adr. β_1	0,596
Adr. β_2	0,930
Adr. β_3	0,185

4.3 Funktionelle Untersuchungen der Nierengefäße zur Ermittlung der Auswirkungen von Noradrenalin auf den Gefäßtonus

Die funktionellen Untersuchungen erfolgten an Interlobararterien, afferenten sowie efferenten Arteriolen.

4.3.1 Einfluss von Noradrenalin auf den Gefäßtonus der Arteria interlobaris

Für die A. interlobaris wurde der Einfluss von Noradrenalin auf den Vasotonus sowohl unter Kontrollbedingungen als auch für Hypoxie untersucht. Für die Kontrollgruppe wurden 13 Gefäße verwendet, für die Behandlungsgruppe elf. Zu Beginn der Untersuchung erfolgte eine KCl-induzierte Kontraktion, diese diente bei den folgenden Untersuchungen als Referenz. Dann wurde die Kontraktion nach kumulativer Applikation von Noradrenalin gemessen. Bei der zweiten Versuchsgruppe wurden die Gefäße zuvor für 60 min unter Hypoxie gesetzt, im Anschluss erfolgte eine Reoxygenierung von 10 min.

Es zeigt sich eine mit steigender Konzentration des applizierten Noradrenalins zunehmende Kontraktion des Gefäßes und damit einhergehende Erhöhung des Gefäßtonus. Unter Kontrollbedingungen ergab sich eine maximale Gefäßantwort von 134,18 % der max. K⁺-Kontraktion bei 10⁻⁵ mol/l NA. Der Mittelwert der EC₅₀ liegt bei 3,02 x 10⁻⁸.

Nach Hypoxie/Reoxygenierung ergab sich eine maximale Gefäßantwort von 145,32 % der maximalen K⁺-Kontraktion bei ebenfalls 10⁻⁵ mol/l NA. Der Mittelwert der EC₅₀ liegt bei 6,3 x 10⁻⁸. Beide Werte unterscheiden sich nicht signifikant von denen der Kontroll-

gruppe. Somit ändert sich die Sensitivität der Gefäße für Noradrenalin durch Hypoxie nicht.

In der Abbildung 17 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven der Kontroll- und Behandlungsgruppe dargestellt. Diese ergeben sich aus den Mittelwerten der einzelnen Messungen und ihren Standardfehlern SEM.

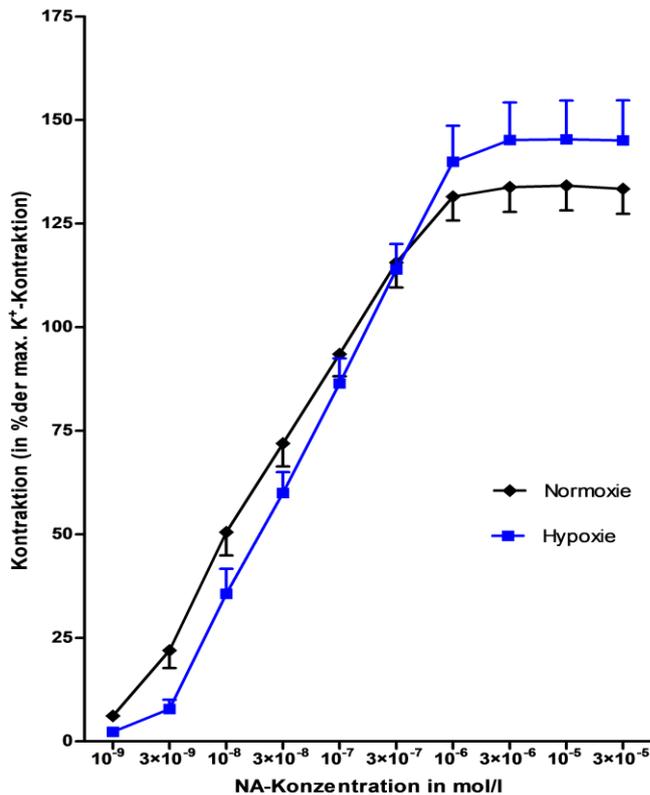


Abb. 17: Veränderung des Gefäßtonus der Arteria interlobaris unter Kontrollbedingungen (MW \pm SEM von $n = 13$, MW $EC_{50} = 3,02 \times 10^{-8}$) und nach Hypoxie/Reoxygenierung (MW \pm SEM von $n = 11$, MW $EC_{50} = 6,3 \times 10^{-8}$) im Vergleich. Auf der y-Achse ist die Kontraktion prozentual zu der durch KCl induzierten Kontraktion angegeben, die x-Achse stellt die unterschiedlichen NA-Konzentrationen in mol/l dar. Die Kurven Normoxie (Kontrollgruppe) und Hypoxie unterscheiden sich nicht signifikant (Mann-Whitney-Test, $p = 0,105$). Abb. in veränderter Form publiziert in (111).

4.3.2 Einfluss von Noradrenalin auf den Gefäßtonus der afferenten Arteriolen

Die Untersuchungen an afferenten und efferenten Arteriolen erfolgten unter isotonischen Bedingungen. In der folgenden Abbildung 18 zeigt sich in Abhängigkeit von der Konzentration des applizierten Noradrenalins eine Gefäßkontraktion der afferenten Arteriolen ($n = 8$) mit einer erkennbaren Verengung des Gefäßlumens ab einer NA-Konzentration von 10^{-8} mol/l. Die EC_{50} der Mittelwertkurve für die untersuchten Gefäße liegt bei $2,00 \times 10^{-6}$. Ebenfalls dargestellt ist die Lumengröße vor NA-Zugabe (in den Abbildungen als Kontrolle K) mit einem Ausgangswert von $9,3 \mu\text{m}$ entsprechend einem Durchmesser von 100 %. Es sind in der Abbildung die jeweiligen Mittelwerte und die Standardfehler der Versuche aufgetragen.

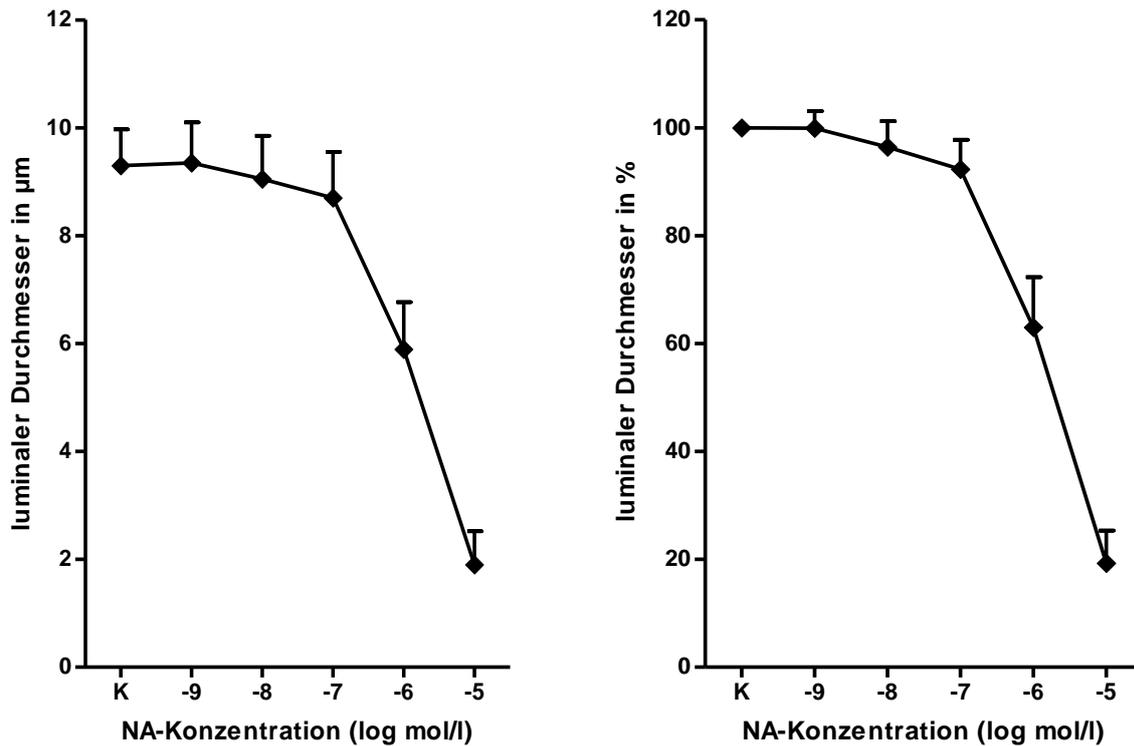


Abb. 18: Veränderung des Gefäßdurchmessers der afferenten Arteriolen unter Zugabe von Noradrenalin mit ansteigender Konzentration (MW \pm SEM von $n = 8$). Linke Abb.: Angabe des Durchmessers in μm . Rechte Abb.: Darstellung des Durchmessers prozentual zum Ausgangswert.

4.3.3 Einfluss von Noradrenalin auf den Gefäßtonus der efferenten Arteriolen

Es wurden fünf Gefäße untersucht. Die Veränderung des Gefäßdurchmessers in Abhängigkeit von der applizierten Noradrenalin-Konzentration ähnelt derjenigen der afferenten Arteriolen, dargestellt ist dies in Abbildung 19. Das Lumen ist mit einem Ausgangswert von $6,89 \mu\text{m}$ kleiner als das der afferenten Arteriolen. Die Gefäße kontrahierten etwa ab einer NA-Konzentration von 10^{-8} mol/l . Die EC_{50} der Mittelwertkurve beträgt in diesem Fall $2,43 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$.

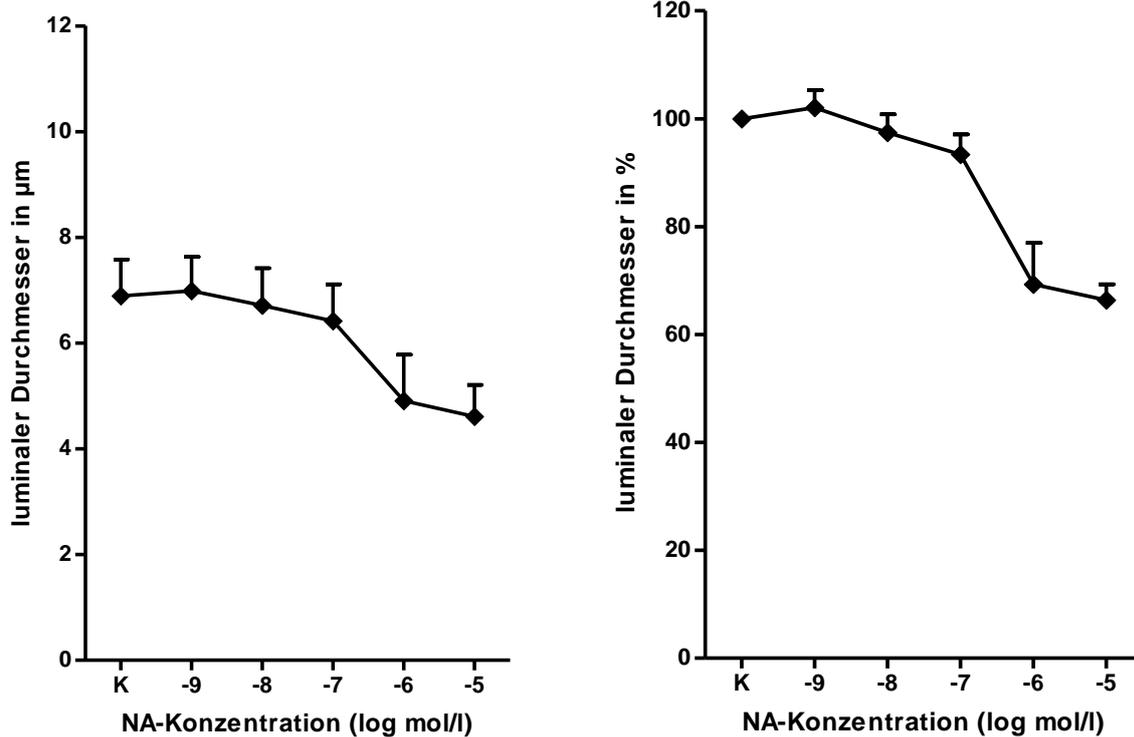


Abb. 19: Veränderung des Gefäßdurchmessers der efferenten Arteriolen unter Zugabe von Noradrenalin mit ansteigender Konzentration (MW \pm SEM von $n = 5$). Linke Abb.: Angabe des Durchmessers in μm . Rechte Abb.: Darstellung des Durchmessers prozentual zum Ausgangswert.

4.3.4 Vergleich der afferenten und efferenten Arteriolen

Die EC_{50} der Mittelwertkurve der afferenten Arteriolen beträgt $2,00 \times 10^{-6}$ mol/l und die der efferenten Arteriolen $2,43 \times 10^{-7}$ mol/l (Abb. 20). Eine Bewertung dieses Unterschiedes in der EC_{50} zwischen afferenten und efferenten Arteriolen mittels statistischer Verfahren ist jedoch wegen fehlender Einzelbestimmung der EC_{50} nicht möglich, da sich nicht alle Kurven mathematisch an eine entsprechende Funktion anpassen ließen.

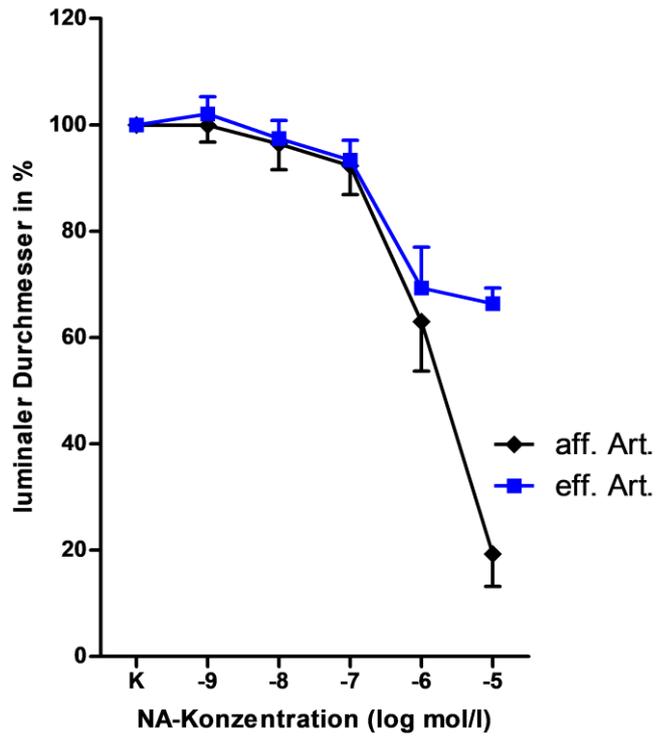


Abb. 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Noradrenalin mit ansteigender Konzentration für die afferenten (MW \pm SEM aus n = 8) und efferenten (MW \pm SEM aus n = 5) Arteriolen. Die Veränderung der Gefäßdurchmesser ist prozentual zum Ausgangswert dargestellt.

5. Diskussion

5.1 Expression der adrenergen Rezeptoren in renalen Gefäßen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die differentielle Expression der adrenergen Rezeptoren mithilfe der real-time PCR auf mRNA-Ebene in verschiedenen Gefäßabschnitten (A. interlobaris, A. arcuata, afferente und efferente Arteriolen) der Mausnieren zu untersuchen. Motivation für diese Untersuchungen waren Befunde aus der Literatur, die der NA-bedingten Veränderung des Gefäßtonus in den renalen Gefäßen eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung verschiedener renaler Krankheitsbilder zusprechen. Allerdings ist die Datenlage hinsichtlich der Expression adrenerger Rezeptoren in der Maus als wichtigem Tiermodell unzureichend. Nach unserem Wissen wurden Untersuchungen differentieller Expressionen sämtlicher adrenerger Rezeptortypen im arteriellen Gefäßbaum der Niere noch nicht durchgeführt. Ebenso ist die Reaktivität auf Noradrenalin in den verschiedenen Gefäßabschnitten der Niere in der Maus nicht untersucht.

In allen afferenten Gefäßabschnitten wurde mRNA für alle neun adrenergen Rezeptoren gefunden. Die Expressionen sind für die einzelnen Rezeptoren in allen Gefäßabschnitten sehr ähnlich, beispielsweise sind die Rezeptoren α_{1A} , α_{1D} , α_{2B} und β_2 stark exprimiert, die Expression für α_{1B} ist in allen Gefäßen eher niedrig. Aufgrund ihrer geringen Größe und der aufwändigen Isolationsmethode war die Menge des Ausgangsmaterials der efferenten Arteriolen sehr gering, weswegen lediglich die Expression der drei α_1 -Rezeptoren dargestellt werden konnte. Die Verteilung ähnelt denen in den afferenten Gefäßabschnitten.

Der Rezeptor α_{1A} ist in allen untersuchten Gefäßabschnitten auf mRNA-Ebene stark exprimiert. Dieser Rezeptor vermittelt in den renalen Widerstandsgefäßen eine Vasokonstriktion (196). Chen et al. beobachteten beispielsweise eine α_{1A} -vermittelte Vasokonstriktion in Interlobararterien von Ratten (33). Die α_{1D} -Rezeptoren waren ebenfalls auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Gefäßen stark exprimiert. Kazi et al. zeigten in renalen kortikalen Gefäßen an Ratten neben der α_{1A} - auch eine α_{1D} -vermittelte Vasokonstriktion (112). Es gibt verschiedene Studien, die zu dem Ergebnis kamen, dass die funktionelle Koexistenz von α_{1A} und α_{1D} nicht nur unter physiologischen Bedingungen maßgeblich für die Vasokonstriktion der renalen Widerstandsgefäße bei Ratten verant-

wortlich ist, sondern auch bei Krankheitsbildern, wie z. B. dem Diabetes mellitus, eine Rolle spielt (8, 198).

Im Gegensatz dazu ist die Expression des α_{1B} -Rezeptors in allen vier Gefäßabschnitten in nur sehr geringer Menge ausgeprägt, sodass die Ergebnisse auch als unspezifisch angesehen werden können. Dies deckt sich mit den Literaturangaben, in denen diesem Rezeptor bei der Regulation des renalen Blutflusses nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben wird (196). Die geringen Expressionen der eigenen Untersuchungen an den C57BL/6-Mäusen deuten darauf hin, dass α_{1B} -Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen den Vasotonus renaler Gefäße nicht wesentlich beeinflussen. Eine kurzzeitige Hypoxie verändert die Expression nicht signifikant und unterstützt die Annahme einer untergeordneten Funktion. Für andere Spezies finden sich in der Literatur für diesen Rezeptor sowohl relevante Expressionen als auch Hinweise auf eine pathophysiologische Relevanz. Canessa et al. gelang es, in renalen Mikrogefäßen von spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar-Kyoto-Ratten (WKY, normotensive Kontrollgruppe), die Expression von α_{1B} -Rezeptoren sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachzuweisen (23). Studien an Ratten geben Hinweise auf eine vasokonstriktorische Bedeutung dieser Rezeptoren unter pathophysiologischen Bedingungen (112, 114).

In allen afferenten Gefäßabschnitten wurde die Expression von α_2 -Rezeptoren dargestellt. In efferenten Arteriolen konnte aufgrund der geringen Materialmenge keine mRNA für diese Gene isoliert werden. Eine besonders hohe Expression liegt in allen afferenten Gefäßabschnitten für den Adrenozeptor α_{2B} vor. Dies ist insofern interessant, als dass den α_2 -Adrenozeptoren zumindest unter physiologischen Bedingungen keine nennenswerte Bedeutung bei der Regulation des Vasotonus in den kleinen Nierengefäßen zugeschrieben wird. Es gibt allerdings Untersuchungen an SHR von Gao et al., die Hinweise darauf geben, dass sich dies unter pathophysiologischen Bedingungen möglicherweise ändert und die Rezeptoren einen indirekten Einfluss auf den Gefäßtonus haben. In dieser Studie zeigte sich eine Verstärkung der Angiotensin II- und Vasopressinbedingten Gefäßantwort nach Behandlung mit einem selektiven α_2 -Agonisten bei SHR, die jedoch nicht bei normotensiven Ratten beobachtet wurde. Die Autoren vermuteten eine verstärkte Interaktion zwischen dem G_i -Signalweg der α_2 -Rezeptoren und dem Signalweg von ATII/Vasopressin (72). Außerdem ist die verstärkte Signalantwort der ATII-Rezeptoren vermutlich durch eine Aktivierung der Y1-Rezeptoren und dadurch des G_i -Protein-Signalweges durch Neuropeptid Y (freigesetzt aus den sympathischen Nervenenden) bedingt (54). In einer Studie von Lai et al. wurde 2009 nach einer kurzen

Behandlung mit NA die Angiotensin II-bedingte Gefäßantwort von afferenten Arteriolen von Mausnieren verstärkt, möglicherweise durch α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren vermittelt (138). Als wichtiger Mechanismus der durch Noradrenalin verstärkten Gefäßantwort der Arteriolen auf ATII ist die erhöhte Calciumsensitivität der glatten Muskulatur zu nennen, hierbei spielt die Aktivität der p38 mitogen-aktivierten Proteinkinase eine Rolle (111).

In der Gruppe der β -Adrenozeptoren hat der β_2 -AR die höchste Expressionsrate in allen untersuchten afferenten Widerstandsgefäßen. Der Rezeptor β_2 hat in vielen Blutgefäßen eine dilatatorische Funktion. Die hohe Expressionsrate deutet darauf hin, dass der Rezeptor auch in der Niere funktionell bedeutsam ist, allerdings zeigt die Niere unter sympathischer Aktivierung eher eine Vasokonstriktion. Auch für β_1 und β_3 konnte mRNA gefunden werden. Eine β_2 -vermittelte Vasodilatation wurde z. B. in Koronargefäßen am Herzen beschrieben (170). Interessanterweise beobachteten Wang et al. in ihren Untersuchungen eine β_1 -vermittelte Vasodilatation in den afferenten Arteriolen von Kaninchen, während die Konstriktion α_1 -Rezeptor-vermittelt war (225). Es gibt Untersuchungen in verschiedenen Blutgefäßen von Mäusen (u. a. Femoral- und Pulmonalarterien), die auch eine vasodilatatorische Funktion des β_1 -ARs zeigen konnten (36). Es liegen Hinweise für ein Vorhandensein von β -Adrenozeptoren in den efferenten Arteriolen von Ratten vor (211).

Über die funktionelle Relevanz der Unterschiede der Expressionsstärken der Rezeptoren geben unsere Ergebnisse keine Auskunft. Hierzu sind umfassende funktionelle Untersuchungen zur Beteiligung der einzelnen Subtypen an den beobachteten Antworten auf Noradrenalin und auch zu den Effekten anderer Agonisten, evtl. auch an subtypdefizienten Tieren, notwendig.

5.2 Vergleichende Darstellung der Rezeptorexpressionen und Funktion in der Aorta und in Mesenterialarterien

Vorkommen und Funktion von adrenergen Rezeptoren in renalen Gefäßen sind in der Literatur unzureichend beschrieben. Eine vergleichende Betrachtung des Vorkommens und der Funktion in anderen Gefäßabschnitten ist von Interesse. Um die Rolle von Adrenozeptoren bei der Einstellung des Vasotonus abschätzen zu können, wurden vielfach Untersuchungen an der thorakalen Aorta und an Mesenterialarterien in Tieren

durchgeführt. Hierbei ist zu bemerken, dass verhältnismäßig wenige Daten zu Expressionen der Adrenozeptoren auf mRNA-Ebene in der Literatur zu finden sind.

α_1 -Rezeptoren:

In mehreren Untersuchungen war die Expressionsrate sowohl in der Aorta als auch in der großen Mesenterialarterie für den α_{1D} -Adrenozeptor am höchsten, gefolgt von α_{1A} und α_{1B} . Dies deckt sich mit den erhobenen funktionellen Daten. Der α_{1D} -Rezeptor wird aus diesem Grund als überwiegend vasokonstriktorisch in beiden Gefäßen angesehen (98, 153). In den Experimenten von Martí et al. nahm die vasokonstriktorische Rolle von α_{1D} in den distalen kleineren Mesenterialgefäßen ab und die von α_{1A} zu, auch die Expressionsrate war in diesen Gefäßen für α_{1A} am höchsten (153). Es existieren aber auch gegensätzliche Befunde (184, 185). Phillips und Hill untersuchten die mRNA-Expression der α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren in Mesenterialarterien von Ratten. Der am stärksten exprimierte α_1 -Rezeptor war in ihren Untersuchungen α_{1A} (184). In einer Untersuchung von Filippi et al. bewirkte der α -Agonist Phenylephrin in niedriger Dosis im mesenterialen Gefäßbett über α_{1D} -AR eine Vasodilatation und in höherer Konzentration über α_{1A} -AR eine Vasokonstriktion (65). Es gibt Untersuchungen, in denen im mesenterialen Gefäßbett in den kleineren Widerstandsgefäßen die Vasokonstriktion über α_{1A} vermittelt wurde (125, 153). Über die Bedeutung von α_{1B} in den untersuchten Gefäßabschnitten ist relativ wenig bekannt. Es liegen keine ausreichenden Beweise für eine Beeinflussung des Vasotonus vor (27, 153).

α_2 -Rezeptoren:

In der Literatur finden sich ebenfalls Expressionsdaten für die α_2 -Rezeptoren in Aorten und Mesenterialgefäßen. Faber et al. fanden ausschließlich RNA für den α_{2D} -AR in der glatten Muskulatur und in den Fibroblasten der Adventitia von Rattenaorten (60). Dieser α_{2D} -AR stellt eine Variante des humanen α_{2A} -Rezeptors bei Nagetieren dar (16, 87, 171). Richman und Regan konnten RNA für alle drei α_2 -Adrenozeptoren in Kulturen glatter Muskelzellen der thorakalen Aorta von Ratten isolieren (193). Phillips und Hill beschrieben mRNA für alle drei α_2 -AR in den Mesenterialarterien von Ratten. Das Expressionslevel war in ihren Experimenten für α_{2B} am höchsten (184). Hier zeigen sich Parallelen zu den eigenen Untersuchungen an den Nierengefäßen, in denen ebenfalls die Expressionsrate für α_{2B} sehr hoch ist. Bezüglich der Funktion der α_2 -Rezeptoren in verschiedenen Blutgefäßen existieren unterschiedliche Angaben in Abhängigkeit von

Gefäßsystem und Lokalisation (glatte Muskulatur bzw. Endothel) (62). Es finden sich für die α_2 -AR in den Aorten sowohl Angaben über vasokonstriktorische (26, 77) als auch vasodilatatorische (203) Effekte. In den Mesenterialarterien ist vermutlich bei intaktem Endothel ein vasodilatatorischer Effekt vorrangig. In verschiedenen Studien wurde eine endothelabhängige α_2 -vermittelte Vasodilatation in Mesenterialgefäßen an Ratten bzw. Mäusen demonstriert (17, 215). Kanagy et al. beschrieben in der Mesenterialarterie nach Endothelentfernung eine Vasokonstriktion (106).

β -Rezeptoren:

Untersuchungen der mRNA-Expression von β -adrenergen Rezeptoren in Aortenringen und in glatten Muskelzellen von normotensiven und spontan hypertensiven Ratten von Al-Gburi et al. zeigten alle drei β -Rezeptoren exprimiert. Die Expressionsrate war für dilatatorisch wirksame β_1 - und β_3 -Adrenozeptoren bei den weiblichen Tieren höher als bei den männlichen Tieren (5). Flacco et al. beobachteten eine stärkere Expression des β_3 -Rezeptors im Vergleich zu den anderen beiden β -Adrenozeptoren in thorakalen Aorten von Ratten. Nach Entfernen des Endothels sank die Expressionsrate deutlich. Dies deutet auf eine Expression der β_3 -AR im Endothel hin. Ebenfalls in den Untersuchungen von Flacco et al. wurden die Expressionen auf mRNA-Ebene für die β -AR in den mesenterialen Widerstandsgefäßen dargestellt. Der β_3 -Rezeptor war deutlich schwächer exprimiert als die anderen und konnte nicht in den glatten Muskelzellen lokalisiert werden, während β_1 überwiegend in diesen lokalisiert war (66). Alle β -Adrenozeptoren wirken in der thorakalen Aorta von Ratten gefäßdilatorisch (5, 64, 66, 197, 216, 217). In einer Studie waren die β_2 -Adrenozeptoren in Mesenterialarterien von Ratten ebenfalls vasodilatatorisch wirksam (133). In Untersuchungen an den kleinen Widerstandsgefäßen des mesenterialen Gefäßbetts wirkten hauptsächlich β_1 -Rezeptoren der glatten Muskulatur gefäßdilatorisch (66). Die Ergebnisse dieser Arbeiten lassen eine differentielle Wirkung der β -Rezeptoren im Vergleich von großen, leitenden Gefäßen mit den kleinen Widerstandsgefäßen vermuten.

Das Studium der verfügbaren Literatur weist darauf hin, dass es wesentliche Unterschiede in der Expression adrenerger Rezeptoren im Vergleich von kleinen und großen arteriellen Gefäßen gibt. Dies können die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen an arteriellen Nierengefäßen nicht bestätigen. Allerdings reagieren größere Nierenarterien stärker als kleinere Arteriolen auf NA in unseren Experimenten (unter

Vorbehalt unterschiedlicher Messmethoden). Dies lässt Unterschiede in der Ausprägung des Signalweges vermuten. Die folgende Tabelle 8 stellt eine Übersicht über die Literatur zur RNA-Expression und Funktion in den thorakalen Aorten und Mesenterialarterien verschiedener Spezies dar.

Tabelle 8: Expression und Funktion der adrenergen Rezeptoren in der Aorta thoracica und in der Mesenterialarterie.

Rezeptor	Aorta thoracica		Mesenterialarterie	
	Expression	Funktion	Expression	Funktion
α_1-Rezeptoren	$\alpha_{1D} > \alpha_{1A} > \alpha_{1B}$ (m) (153)	Vasokonstriktion (m, r) (98, 153, 186, 237)	$\alpha_{1D} > \alpha_{1A} > \alpha_{1B}$ (m) (98, 153)	Vasokonstriktion (m) (98, 153)
	$\alpha_{1D} > \alpha_{1B} > \alpha_{1A}$ (m) (98)		$\alpha_{1A} > \alpha_{1D} > \alpha_{1B}$ (kleine Widerstandsgefäße) (m) (153)	Vasodilatation über α_{1D} , Vasokonstriktion über α_{1A} (gesamtes Gefäßbett) (r) (65)
			$\alpha_{1A} > \alpha_{1B}/\alpha_{1D}$ (r) (184, 185)	
α_2-Rezeptoren	$\alpha_{2A}, \alpha_{2B}, \alpha_{2C}$ (r) (193)	Vasokonstriktion (r) (26, 77)	$\alpha_{2B} > \alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ (r) (184, 185)	Vasodilatation (m, r) (17, 215)
		Vasodilatation (m) (203)		
β-Rezeptoren	$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ (♀), $\beta_1/\beta_2 > \beta_3$ (♂) (r) (5)	Vasodilatation (r) (64, 66, 197, 216, 217)	$\beta_1/\beta_2 > \beta_3$ (kleine Widerstandsgefäße) (r) (66)	Vasodilatation über β_2 (r) (133)
	$\beta_1/\beta_2 < \beta_3$ (r) (66)			Vasodilatation über β_1 (kleine Widerstandsgefäße) (r) (66)

5.3 Expression nach Hypoxie/Reoxygenierung in den afferenten Arteriolen

Das sympathische Nervensystem trägt entscheidend zur Pathogenese des akuten Nierenversagens bei, Hypoxie und Reoxygenierung sind wichtige Pathomechanismen. Daher war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Expression der adrenergen Rezeptoren auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Funktionelle Untersuchungen von Kaufmann et al. von 2015 zeigten, dass nach Hypoxie/Reoxygenierung und gleichzeitiger Behandlung mit Noradrenalin die Ge-

fäßantwort auf Angiotensin II verstärkt wird. Hieraus lässt sich schließen, dass der Sympathikus eine bedeutsame Rolle bei der ‚ischaemia reperfusion injury‘ spielt. Die verstärkte Vasokonstriktion der renalen Widerstandsgefäße bewirkt eine Minderdurchblutung des Nierengewebes (111). Auch aufgrund dieser Ergebnisse war es daher von Interesse zu prüfen, ob sich die Expression der Adrenozeptoren nach Hypoxie/Reoxygenierung ändert. Die Untersuchungen wurden an afferenten Arteriolen durchgeführt, da für diesen Gefäßabschnitt die verfügbare mRNA-Menge ausreichend hoch war. Es war nur für den α_{1A} -Adrenozeptor eine signifikante Verminderung der mRNA-Expression zu beobachten. Auf funktioneller Ebene wäre das am ehesten mit einer verminderten Gefäßantwort auf Noradrenalin in Verbindung zu bringen. Allerdings liegen nur funktionelle Untersuchungen für die Interlobararterien vor (siehe Abschnitt 4.3.1). In diesen war die Gefäßantwort auf Noradrenalin nach Hypoxie und Reoxygenierung jedoch nicht verändert. Posttranslationale Mechanismen, welche die Proteinmenge modifizieren, aber auch Unterschiede in der Expression solcher Rezeptoren im Vergleich beider Gefäßtypen, können für die unerwarteten Ergebnisse verantwortlich sein. Die Menge verfügbarer Rezeptoren an der Zellmembran wurde nicht gemessen und deshalb sind Aussagen darüber nicht möglich. Diese Rezeptorverfügbarkeit bestimmt aber wesentlich die Stärke der Antwort. Nicht zuletzt können die zellulären Signalwege durch Hypoxie/Reoxygenierung verändert sein. Die pathophysiologische Relevanz der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Beobachtungen muss deshalb noch weiter untersucht werden.

Es existieren wenig vergleichbare Studien zur differentiellen Rezeptorexpression nach Hypoxie/Reoxygenierung. In einem anderen Gefäßgebiet, und zwar in den Pulmonalarterien und -venen, stieg nach Hypoxie die mRNA-Menge aller drei α_1 -AR, am meisten jedoch für α_{1A} , an. Diese Gefäße kontrahieren unter hypoxischen Bedingungen (234). Eckhard et al. stellten einen Anstieg der mRNA für α_{1B} in Kulturen glatter Muskelzellen von Aorten sowie in Rattenaorten ohne Endothel nach achtstündiger Hypoxie fest (56). Expressionen von Adrenozeptoren ändern sich offensichtlich in Reaktion auf Hypoxie. Die Antworten sind, entsprechend der Funktion des Gefäßgebietes, unterschiedlich.

5.4 Funktionelle Untersuchungen

Es ist weitestgehend gesichert, dass Noradrenalin eine dosisabhängige Vasokonstriktion in den renalen Widerstandsgefäßen verursacht, was die Nierendurchblutung maßgeblich beeinflusst. Bei den Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Noradrenalin im Bereich der Interlobararterien liegt die EC_{50} für die Kontrollgruppe bei $3,02 \times 10^{-8}$ mol/l und für die Behandlungsgruppe nach Hypoxie/Reoxygenierung bei $6,3 \times 10^{-8}$ mol/l. Die EC_{50} liegt für die afferenten und efferenten Arteriolen bei einer Noradrenalin-Konzentration von $2,00 \times 10^{-6}$ mol/l bzw. $2,43 \times 10^{-7}$ mol/l (EC_{50} aus den Mittelwerten berechnet). Somit reagieren die größeren Gefäße vermutlich sensibler auf Noradrenalin als die kleinen Widerstandsgefäße. Eine Begründung hierfür lässt sich aus den erhobenen Expressionsdaten nicht ableiten. Bei der Interpretation ist zu beachten, dass die Interlobararterien unter isotonischen, die afferenten und efferenten Gefäße hingegen unter isometrischen Bedingungen gemessen wurden. Möglicherweise hatte dies einen Einfluss auf die unterschiedlichen Gefäßantworten auf Noradrenalin. Owen et al. untersuchten die Sensitivität für exogen appliziertes Noradrenalin von Untereinheiten der A. renalis mit einem Lumen von ca. 300 μ m und Interlobararterien mit einem Lumen von ca. 250 μ m an Kaninchen. Die Sensitivität war für die größeren Arterien höher (175).

Ein Vergleich der EC_{50} afferenter und efferenter Arteriolen lässt vermuten, dass die efferenten Arteriolen sensibler auf Noradrenalin reagieren. Leider ist eine statistische Absicherung nicht möglich, da die EC_{50} -Berechnung für einige Arteriolen aufgrund variabler Konzentrations-Antwort-Kurven nicht gelang und nur die EC_{50} für die Mittelwerte berechnet werden konnten.

Für das Verständnis der Pathogenese des akuten Nierenversagens sind Untersuchungen von Gefäßantworten auf Noradrenalin in entsprechenden Modellen sinnvoll. Da, wie schon erwähnt, bei der Pathogenese des akuten Nierenversagens eine durch Ischämie und anschließende Reperfusion bedingte Schädigung angenommen wird, die mit Hypoxie/Reoxygenierung einhergeht, untersuchten wir die Reaktion von Interlobararterien auf Noradrenalin unter diesen Bedingungen. Hierbei zeigte sich, dass Hypoxie/Reoxygenierung die Antwort großer Arterien auf Noradrenalin nicht signifikant änderte. Möglicherweise führt die Aktivierung des Sympathikus allein noch nicht zu einer deutlichen pathogenetisch wirksamen Vasokonstriktion. Dies widerspricht nicht der Vorstellung von einer maßgeblichen Beteiligung des SNS an der Pathogenese des akuten Nierenversagens. Die Beobachtung spricht vielmehr dafür, dass ein Zusammenspiel

des Sympathikus mit anderen vasoaktiven Systemen für die erhöhte Kontraktilität ursächlich ist. Dies wurde kürzlich für die verstärkte Konstriktion großer Arterien der Niere auf ATII nach Hypoxie/Reoxygenierung gezeigt (111). Denton et al. demonstrierten in einer Studie an Kaninchen, dass Hypoxie mit einer erhöhten Aktivität des SNS und einer Verstärkung des berechneten Widerstandes afferenter und efferenter Arteriolen einhergeht (45). Unter diesen *in vivo*-Bedingungen interagieren viele vasoaktive Substanzen, sodass der Effekt der sympathischen Aktivierung durch Hypoxie hier auch das Ergebnis einer solchen Interaktion sein könnte.

5.5 Methodische Einschränkungen

Die mRNA-Ausbeute in den isolierten großen Arterien und den efferenten Arteriolen war gering. Eine kleine Ausgangsmenge an RNA kann zu Variationen in der Menge der cDNA führen. Aufgrund der niedrigen Menge an mRNA respektive cDNA war es nicht möglich, für jede Probe eine individuelle Verdünnungsreihe zu erstellen und bei der PCR mitlaufen zu lassen. Die Notwendigkeit, die mRNA der großen Arterien und efferenten Arteriolen zu poolen, verhinderte eine statistische Absicherung der Ergebnisse. In den großen Gefäßen wurden verschiedene Verfahren zur mRNA-Isolation getestet. Es zeigten sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede in der Ausbeute. Die geringe Größe und damit geringe biologische Masse der efferenten Arteriolen schränkt bei Handpräparation die verfügbare Menge ein. Zurzeit gibt es keine alternativen Methoden zur Gewinnung von isolierten efferenten Arteriolen. Aufgrund der Abschätzung der RNA-Menge unter Berücksichtigung der Zahl der Gene wurde entschieden, für die Expressionsanalyse im Falle der *A. interlobaris* die 140 Gefäße von 18 Tieren zusammenzufassen. In diesen Gefäßen war die mRNA-Ausbeute besonders gering und auch bei Verwendung spezieller Isolationsmethoden nicht verbesserbar.

Es stellt sich die Frage, ob die langen Präparationszeiten der Gefäße von bis zu 1 h einen Einfluss auf die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen haben könnten. Insbesondere die Präparationen der kleinen präglomerulären Gefäße mit der Siebtechnik und der efferenten Arteriolen haben einen nicht unerheblichen Zeitbedarf. Die afferenten Arteriolen wurden unter ständiger Kühlung auf Eis isoliert und die efferenten Arteriolen wurden ebenfalls unter Kühlung bei ca. 4 °C gewonnen. Die präparierten Gefäße wurden jeweils sofort schockgefroren. Durch die Verwendung von Haushaltsgenen

wurde eine „Normierung“ erreicht, die die Schwankungen der Gesamtmenge der mRNA in einem gewissen Rahmen ausgleicht.

Die Expression der adrenergen Rezeptoren wurde ausschließlich auf mRNA-Ebene durchgeführt. Es können deshalb auch nur Aussagen über die Expression der mRNA, nicht aber die der Proteine oder die verfügbaren Rezeptoren gemacht werden.

Die differentiellen Expressionen unter Hypoxiebedingungen wurden nur für die afferenten Arteriolen ermittelt. Sie sind die wichtigsten Widerstandsgefäße in der Niere. Die Handpräparation von efferenten Arteriolen und der damit verbundene Zeitaufwand verhindert die Verfügbarkeit einer ausreichend großen Zahl von Gefäßen für die mRNA-Isolierung.

Die funktionellen Untersuchungen für Hypoxie/Reoxygenierung erfolgten ausschließlich an den Interlobararterien, da hierfür die methodischen Voraussetzungen in Form begasbarer Organkammern gegeben waren. Arteriolen spielen jedoch für den renalen Perfusionswiderstand eine größere Rolle. Ein differentes Verhalten von Arteriolen kann nicht ausgeschlossen werden.

Es wurde festgelegt, dass funktionelle Untersuchungen nur in Arteriolen durchgeführt wurden, die innerhalb von 90 min nach Tötung des Tieres präpariert und perfundiert wurden. Damit sollten die Variabilitäten in den Gefäßantworten möglichst klein gehalten werden. Arteriolen dieser Größe sind weit weniger robust als beispielsweise große Arterien. Dadurch war die Versuchsdauer und somit auch die Erfolgsquote limitiert.

5.6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Expressionen aller adrenergen Rezeptoren in wichtigen Gefäßabschnitten der Mausniere und exemplarisch die Reaktion der Gefäße auf Noradrenalin untersucht.

In den Gefäßen waren alle Adrenozeptoren auf mRNA-Ebene exprimiert, wobei sich die Expressionsstärken der einzelnen Rezeptorsubtypen voneinander unterschieden. Im Vergleich der verschiedenen Gefäßabschnitte zeigten sich für die einzelnen Subtypen ähnliche Expressionsstärken. Die Rezeptoren $\alpha_{1A, D}$, α_{2B} und β_2 waren relativ stark exprimiert.

Hypoxie/Reoxygenierung bewirkte eine Verringerung der Expression von α_{1A} , hatte aber auf die mRNA-Expression der übrigen Rezeptoren keinen signifikanten Einfluss.

Die Gabe von Noradrenalin hatte eine dosisabhängige Kontraktion der untersuchten Gefäße zur Folge, wobei die Gefäßantwort der Interlobararterien größer war als die der glomerulären Gefäße. Die Antwort der Interlobararterien auf Noradrenalin wurde durch Hypoxie/Reoxygenierung nicht signifikant beeinflusst.

Unsere Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass das sympathische Nervensystem durch ein Zusammenspiel mit anderen Systemen zur Pathogenese verschiedener Nierenerkrankungen beiträgt.

6. Literaturübersicht

1. **Abrahams VC and Hilton SM.** The role of active muscle vasodilatation in the alerting stage of the defence reaction. *J Physiol* 171: 189-202, 1964.
2. **Adams PL, Adams FF, Bell PD and Navar LG.** Impaired renal blood flow auto-regulation in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 18: 68-76, 1980.
3. **Ahren B and Lundquist I.** Effects of selective and non-selective beta-adrenergic agents on insulin secretion in vivo. *Eur J Pharmacol* 71: 93-104, 1981.
4. **Aksu U, Demirci C and Ince C.** The pathogenesis of acute kidney injury and the toxic triangle of oxygen, reactive oxygen species and nitric oxide. *Contrib Nephrol* 174: 119-128, 2011.
5. **Al Gburi S, Deussen A, Zatschler B, Weber S, Kunzel S, El Armouche A, Lorenz K, Cybularz M, Morawietz H and Kopaliani I.** Sex-difference in expression and function of beta-adrenoceptors in macrovessels: role of the endothelium. *Basic Res Cardiol* 112: 29, 2017.
6. **Amann K, Koch A, Hofstetter J, Gross ML, Haas C, Orth SR, Ehmke H, Rump LC and Ritz E.** Glomerulosclerosis and progression: effect of subantihypertensive doses of alpha and beta blockers. *Kidney Int* 60: 1309-1323, 2001.
7. **Amann K, Rump LC, Simonaviciene A, Oberhauser V, Wessels S, Orth SR, Gross ML, Koch A, Bielenberg GW, Van Kats JP, Ehmke H, Mall G and Ritz E.** Effects of low dose sympathetic inhibition on glomerulosclerosis and albuminuria in subtotaly nephrectomized rats. *J Am Soc Nephrol* 11: 1469-1478, 2000.
8. **Armenia A, Munavvar AS, Abdullah NA, Helmi A and Johns EJ.** The contribution of adrenoceptor subtype(s) in the renal vasculature of diabetic spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 142: 719-726, 2004.
9. **Asano T, Katada T, Gilman AG and Ross EM.** Activation of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase, Gi, by beta-adrenergic receptors in reconstituted phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 259: 9351-9354, 1984.
10. **Barajas L, Liu L and Powers K.** Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 735-749, 1992.
11. **Barajas L and Wang P.** Localization of tritiated norepinephrine in the renal arteriolar nerves. *Anat Rec* 195: 525-534, 1979.
12. **Barbier J, Mouas C, Rannou-Bekono F and Carre F.** Existence of beta(3)-adrenoceptors in rat heart: functional implications. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34: 796-798, 2007.

13. **Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, Leonard EC and Parrish AR.** Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F928-F936, 2008.
14. **Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL and Palevsky P.** Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 8: R204-R212, 2004.
15. **Bergamaschi CT, Campos RR and Lopes OU.** Rostral ventrolateral medulla: A source of sympathetic activation in rats subjected to long-term treatment with L-NAME. *Hypertension* 34: 744-747, 1999.
16. **Blaxall HS, Heck DA and Bylund DB.** Molecular determinants of the alpha-2D adrenergic receptor subtype. *Life Sci* 53: L255-L259, 1993.
17. **Bockman CS, Gonzalez-Cabrera I and Abel PW.** Alpha-2 adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 1235-1243, 1996.
18. **Bonventre JV.** Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair. *Contrib Nephrol* 165: 9-17, 2010.
19. **Bonventre JV and Zuk A.** Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 66: 480-485, 2004.
20. **Brown AM.** Regulation of heartbeat by G protein-coupled ion channels. *Am J Physiol* 259: H1621-H1628, 1990.
21. **Campese VM and Kogosov E.** Renal Afferent Denervation Prevents Hypertension in Rats with Chronic-Renal-Failure. *Hypertension* 25: 878-882, 1995.
22. **Campese VM, Ye S, Zhong H, Yanamadala V, Ye Z and Chiu J.** Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H695-H703, 2004.
23. **Canessa LM, Piccio MM, Vachvanichsanong P, Sidhu A, Porter CC, Robillard JE, Felder RA and Jose PA.** Alpha 1B-adrenergic receptors in rat renal microvessels. *Kidney Int* 48: 1412-1419, 1995.
24. **Cao W, Li A, Li J, Wu C, Cui S, Zhou Z, Liu Y, Wilcox CS and Hou FF.** Reno-Cerebral Reflex Activates the Renin-Angiotensin System, Promoting Oxidative Stress and Renal Damage After Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxid Redox Signal* 27: 415-432, 2017.
25. **Carrasco GA and Van de Kar LD.** Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463: 235-272, 2003.

26. **Carrier GO and White RE.** Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 232: 682-687, 1985.
27. **Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, Tobita K, Keller BB, Lasley RD, Perez DM, Tanoue A, Tsujimoto G, Post GR and Piascik MT.** Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha 1B- and alpha 1D-adrenoceptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 1045-1053, 2003.
28. **Chang HY.** The involvement of ATP-sensitive potassium channels in beta 2-adrenoceptor agonist-induced vasodilatation on rat diaphragmatic microcirculation. *Br J Pharmacol* 121: 1024-1030, 1997.
29. **Charkoudian N and Rabbitts JA.** Sympathetic Neural Mechanisms in Human Cardiovascular Health and Disease. *Mayo Clinic Proceedings* 84: 822-830, 2009.
30. **Chaudhari A and Kirschenbaum MA.** A rapid method for isolating rabbit renal microvessels. *Am J Physiol* 254: F291-F296, 1988.
31. **Chaudhry A, MacKenzie RG, Georgic LM and Granneman JG.** Differential interaction of beta 1- and beta 3-adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes. *Cell Signal* 6: 457-465, 1994.
32. **Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL and Palant CE.** The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney Int* 79: 1361-1369, 2011.
33. **Chen H, Bischoff A, Schafers RF, Wambach G, Philipp T and Michel MC.** Vasoconstriction of rat renal interlobar arteries by noradrenaline and neuropeptide Y. *J Auton Pharmacol* 17: 137-146, 1997.
34. **Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK and Stevens RC.** High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318: 1258-1265, 2007.
35. **Choi YS, Shim JK, Kim JC, Kang KS, Seo YH, Ahn KR and Kwak YL.** Effect of remote ischemic preconditioning on renal dysfunction after complex valvular heart surgery: a randomized controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 142: 148-154, 2011.
36. **Chruscinski A, Brede ME, Meinel L, Lohse MJ, Kobilka BK and Hein L.** Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 60: 955-962, 2001.

37. **Chu KL, Xu J, Frost J, Li L, Gomez E, Dart MJ, Jarvis MF, Meyer MD and McGaraughty S.** A selective alpha₂ B adrenoceptor agonist (A-1262543) and duloxetine modulate nociceptive neurones in the medial prefrontal cortex, but not in the spinal cord of neuropathic rats. *Eur J Pain* 19: 649-660, 2015.
38. **Ciriello J and Calaresu FR.** Central projections of afferent renal fibers in the rat: an anterograde transport study of horseradish peroxidase. *J Auton Nerv Syst* 8: 273-285, 1983.
39. **Civantos CB and Aleixandre dA.** Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res* 44: 195-208, 2001.
40. **Conger JD.** Vascular abnormalities in the maintenance of acute renal failure. *Circ Shock* 11: 235-244, 1983.
41. **Conger JD, Robinette JB and Hammond WS.** Differences in vascular reactivity in models of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 39: 1087-1097, 1991.
42. **Converse RL, Jacobsen TN, Toto RD, Jost CMT, Cosentino F, Fouadtarazi F and Victor RG.** Sympathetic Overactivity in Patients with Chronic-Renal-Failure. *New England Journal of Medicine* 327: 1912-1918, 1992.
43. **Cottone S, Lorito MC, Riccobene R, Nardi E, Mule G, Buscemi S, Geraci C, Guarneri M, Arsena R and Cerasola G.** Oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic renal failure. *J Nephrol* 21: 175-179, 2008.
44. **Delmotte P, Ressmeyer AR, Bai Y and Sanderson MJ.** Mechanisms of airway smooth muscle relaxation induced by beta₂-adrenergic agonists. *Front Biosci (Landmark Ed)* 15: 750-764, 2010.
45. **Denton KM, Shweta A and Anderson WP.** Preglomerular and postglomerular resistance responses to different levels of sympathetic activation by hypoxia. *J Am Soc Nephrol* 13: 27-34, 2002.
46. **Dibona GF.** Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 279: R1517-R1524, 2000.
47. **Dibona GF and Esler M.** Translational medicine: the antihypertensive effect of renal denervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R245-R253, 2010.
48. **Dibona GF and Kopp UC.** Neural control of renal function. *Physiol Rev* 77: 75-197, 1997.
49. **Dibona GF and Sawin LL.** Effect of renal denervation on dynamic autoregulation of renal blood flow. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F1209-F1218, 2004.

50. **Dibona GF, Sawin LL and Jones SY.** Differentiated sympathetic neural control of the kidney. *Am J Physiol* 271: R84-R90, 1996.
51. **DiNicolantonio JJ, Lavie CJ, Fares H, Menezes AR and O'Keefe JH.** Meta-analysis of carvedilol versus beta 1 selective beta-blockers (atenolol, bisoprolol, metoprolol, and nebivolol). *Am J Cardiol* 111: 765-769, 2013.
52. **Ditting T, Freisinger W, Siegel K, Fiedler C, Small L, Neuhuber W, Heinlein S, Reeh PW, Schmieder RE and Veelken R.** Tonic Postganglionic Sympathetic Inhibition Induced by Afferent Renal Nerves? *Hypertension* 59: 467-476, 2012.
53. **Donovan MK, Wyss JM and Winternitz SR.** Localization of renal sensory neurons using the fluorescent dye technique. *Brain Res* 259: 119-122, 1983.
54. **Dubinon JH, Mi Z and Jackson EK.** Role of renal sympathetic nerves in regulating renovascular responses to angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 1330-1336, 2006.
55. **Dwyer JM, Platt BJ, Rizzo SJ, Pulicicchio CM, Wantuch C, Zhang MY, Cummons T, Leventhal L, Bender CN, Zhang J, Kowal D, Lu S, Rajarao SJ, Smith DL, Shilling AD, Wang J, Butera J, Resnick L, Rosenzweig-Lipson S, Schechter LE and Beyer CE.** Preclinical characterization of BRL 44408: antidepressant- and analgesic-like activity through selective alpha2A-adrenoceptor antagonism. *Int J Neuropsychopharmacol* 13: 1193-1205, 2010.
56. **Eckhart AD, Zhu Z, Arendshorst WJ and Faber JE.** Oxygen modulates alpha 1B-adrenergic receptor gene expression by arterial but not venous vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 271: H1599-H1608, 1996.
57. **Er F, Nia AM, Dopp H, Hellmich M, Dahlem KM, Caglayan E, Kubacki T, Benzing T, Erdmann E, Burst V and Gassanov N.** Ischemic preconditioning for prevention of contrast medium-induced nephropathy: randomized pilot RenPro Trial (Renal Protection Trial). *Circulation* 126: 296-303, 2012.
58. **Erami C, Zhang H, Ho JG, French DM and Faber JE.** Alpha(1)-adrenoceptor stimulation directly induces growth of vascular wall in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1577-H1587, 2002.
59. **Esbenshade TA, Theroux TL and Minneman KP.** Increased voltage-dependent calcium influx produced by alpha 1B-adrenergic receptor activation in rat medullary thyroid carcinoma 6-23 cells. *Mol Pharmacol* 45: 591-598, 1994.
60. **Faber JE, Yang N and Xin X.** Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 441-452, 2001.

61. **Feng MG, Prieto MC and Navar LG.** Nebivolol-induced vasodilation of renal afferent arterioles involves beta3-adrenergic receptor and nitric oxide synthase activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F775-F782, 2012.
62. **Feres T, Borges AC, Silva EG, Paiva AC and Paiva TB.** Impaired function of alpha-2 adrenoceptors in smooth muscle of mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 125: 1144-1149, 1998.
63. **Ferguson M and Bell C.** Ultrastructural localization and characterization of sensory nerves in the rat kidney. *J Comp Neurol* 274: 9-16, 1988.
64. **Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y and Queen L.** Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br J Pharmacol* 143: 397-403, 2004.
65. **Filippi S, Parenti A, Donnini S, Granger HJ, Fazzini A and Ledda F.** Alpha(1D)-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 869-875, 2001.
66. **Flacco N, Segura V, Perez-Aso M, Estrada S, Seller JF, Jimenez-Altayo F, Noguera MA, D'Ocon P, Vila E and Ivorra MD.** Different beta-adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *Br J Pharmacol* 169: 413-425, 2013.
67. **Fluck DC.** Catecholamines. *Br Heart J* 34: 869-873, 1972.
68. **Ford AP, Arredondo NF, Blue DR, Jr., Bonhaus DW, Jasper J, Kava MS, Lesnick J, Pfister JR, Shieh IA, Vimont RL, Williams TJ, McNeal JE, Stamey TA and Clarke DE.** RS-17053 (N-[2-(2-cyclopropylmethoxyphenoxy)ethyl]-5-chloro-alpha, alpha-dimethyl-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride), a selective alpha 1A-adrenoceptor antagonist, displays low affinity for functional alpha 1-adrenoceptors in human prostate: implications for adrenoceptor classification. *Mol Pharmacol* 49: 209-215, 1996.
69. **Fujii T, Kurata H, Takaoka M, Muraoka T, Fujisawa Y, Shokoji T, Nishiyama A, Abe Y and Matsumura Y.** The role of renal sympathetic nervous system in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *Eur J Pharmacol* 481: 241-248, 2003.
70. **Fujii T, Sugiura T, Ohkita M, Kobuchi S, Takaoka M and Matsumura Y.** Selective antagonism of the postsynaptic alpha(1)-adrenoceptor is protective against ischemic acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* 574: 185-191, 2007.
71. **Galaz-Montoya M, Wright SJ, Rodriguez GJ, Lichtarge O and Wensel TG.** beta2-Adrenergic receptor activation mobilizes intracellular calcium via a non-

- canonical cAMP-independent signaling pathway. *J Biol Chem* 292: 9967-9974, 2017.
72. **Gao L, Zhu C and Jackson EK.** Alpha 2-Adrenoceptors potentiate angiotensin II- and vasopressin-induced renal vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 581-586, 2003.
73. **Gesek FA.** Alpha 2-adrenergic receptors activate phospholipase C in renal epithelial cells. *Mol Pharmacol* 50: 407-414, 1996.
74. **Gilsbach R, Preissl S and Hein L.** [alpha -Adrenoceptors: three subtypes for a broad spectrum of activity]. *Pharm Unserer Zeit* 40: 462-468, 2011.
75. **Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S and Stang A.** The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int* 113: 85-91, 2016.
76. **Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE and Hsu CY.** Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351: 1296-1305, 2004.
77. **Godfraind T, Miller RC and Lima JS.** Selective alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor agonist-induced contractions and ⁴⁵Ca fluxes in the rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 77: 597-604, 1982.
78. **Goetz AS, King HK, Ward SD, True TA, Rimele TJ and Saussy DL, Jr.** BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of alpha 1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 272: R5-R6, 1995.
79. **Gontijo JR and Kopp UC.** Renal sensory receptor activation by calcitonin gene-related peptide. *Hypertension* 23: 1063-1067, 1994.
80. **Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH and Benovic JL.** Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383: 447-450, 1996.
81. **Grady HC and Bullivant EM.** Renal blood flow varies during normal activity in conscious unrestrained rats. *Am J Physiol* 262: R926-R932, 1992.
82. **Graham RM, Perez DM, Hwa J and Piascik MT.** alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signalling. *Circ Res* 78: 737-749, 1996.
83. **Granneman JG.** The putative beta4-adrenergic receptor is a novel state of the beta1-adrenergic receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E199-E202, 2001.

84. **Grassi G, Quarti-Trevano F, Seravalle G, Arenare F, Volpe M, Furiani S, Dell'Oro R and Mancina G.** Early sympathetic activation in the initial clinical stages of chronic renal failure. *Hypertension* 57: 846-851, 2011.
85. **Grimm RH, Jr.** Alpha 1-antagonists in the treatment of hypertension. *Hypertension* 13: 1131-1136, 1989.
86. **Grisk O and Rettig R.** Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 61: 238-246, 2004.
87. **Guimaraes S and Moura D.** Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53: 319-356, 2001.
88. **Han C, Abel PW and Minneman KP.** Alpha 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca²⁺ in smooth muscle. *Nature* 329: 333-335, 1987.
89. **Hancock AA, Brune ME, Witte DG, Marsh KC, Katwala S, Milicic I, Ireland LM, Crowell D, Meyer MD and Kerwin JF, Jr.** Actions of A-131701, a novel, selective antagonist for alpha-1A compared with alpha-1B adrenoceptors on intraurethral and blood pressure responses in conscious dogs and a pharmacodynamic assessment of in vivo prostatic selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 628-642, 1998.
90. **Hansen PB.** Functional and pharmacological consequences of the distribution of voltage-gated calcium channels in the renal blood vessels. *Acta Physiol (Oxf)* 207: 690-699, 2013.
91. **Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, Knight R, Kunst G, Laing C, Nicholas J, Pepper J, Robertson S, Xenou M, Clayton T and Yellon DM.** Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med* 373: 1408-1417, 2015.
92. **Hering D, Mahfoud F, Walton AS, Krum H, Lambert GW, Lambert EA, Sobotka PA, Bohm M, Cremers B, Esler MD and Schlaich MP.** Renal denervation in moderate to severe CKD. *J Am Soc Nephrol* 23: 1250-1257, 2012.
93. **Hering D, Marusic P, Duval J, Sata Y, Head GA, Denton KM, Burrows S, Walton AS, Esler MD and Schlaich MP.** Effect of renal denervation on kidney function in patients with chronic kidney disease. *Int J Cardiol* 232: 93-97, 2017.
94. **Hering D and Winklewski PJ.** R1 autonomic nervous system in acute kidney injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 44: 162-171, 2017.
95. **Heumann P, Koenen A, Zavaritskaya O, Schutze K, Ramm A, Schluter T, Steinbach A, Rettig R, Schubert R and Grisk O.** Sympathetic denervation facil-

- itates L-type Ca²⁺ channel activation in renal but not in mesenteric resistance arteries. *J Hypertens* 34: 692-703, 2016.
96. **Heusch G and Thamer V.** Significance of the sympathetic nervous system for the coronary circulation. *Z Kardiol* 73: 543-551, 1984.
 97. **Hoch H, Stegbauer J, Potthoff SA, Hein L, Quack I, Rump LC and Vonend O.** Regulation of renal sympathetic neurotransmission by renal alpha(2A)-adrenoceptors is impaired in chronic renal failure. *Br J Pharmacol* 163: 438-446, 2011.
 98. **Hosoda C, Tanoue A, Shibano M, Tanaka Y, Hiroyama M, Koshimizu TA, Cotecchia S, Kitamura T, Tsujimoto G and Koike K.** Correlation between vasoconstrictor roles and mRNA expression of alpha1-adrenoceptor subtypes in blood vessels of genetically engineered mice. *Br J Pharmacol* 146: 456-466, 2005.
 99. **Huang LY and Neher E.** Ca(2+)-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron* 17: 135-145, 1996.
 100. **Ishide T.** Denopamine, a selective beta1-receptor agonist and a new coronary vasodilator. *Curr Med Res Opin* 18: 407-413, 2002.
 101. **Jia Y, Mingo GG, Hunter JC, Lieber GB, Palamanda JR, Mei H, Boyce CW, Koss MC, Yu Y, Cicmil M, Hey JA and McLeod RL.** Pharmacological evaluation of selective alpha2c-adrenergic agonists in experimental animal models of nasal congestion. *J Pharmacol Exp Ther* 349: 75-84, 2014.
 102. **Johansson M, Elam M, Rundqvist B, Eisenhofer G, Herlitz H, Lambert G and Friberg P.** Increased sympathetic nerve activity in renovascular hypertension. *Circulation* 99: 2537-2542, 1999.
 103. **Johns EJ, Kopp UC and Dibona GF.** Neural Control of Renal Function. *Comprehensive Physiology* 1: 731-767, 2011.
 104. **Jones SB, Halenda SP and Bylund DB.** Alpha 2-adrenergic receptor stimulation of phospholipase A2 and of adenylate cyclase in transfected Chinese hamster ovary cells is mediated by different mechanisms. *Mol Pharmacol* 39: 239-245, 1991.
 105. **Jones TR, Charette L, Garcia ML and Kaczorowski GJ.** Interaction of iberiotoxin with beta-adrenoceptor agonists and sodium nitroprusside on guinea pig trachea. *J Appl Physiol (1985)* 74: 1879-1884, 1993.
 106. **Kanagy NL.** Increased vascular responsiveness to alpha 2-adrenergic stimulation during NOS inhibition-induced hypertension. *Am J Physiol* 273: H2756-H2764, 1997.

107. **Kanterman RY, Felder CC, Brenneman DE, Ma AL, Fitzgerald S and Axelrod J.** Alpha 1-adrenergic receptor mediates arachidonic acid release in spinal cord neurons independent of inositol phospholipid turnover. *J Neurochem* 54: 1225-1232, 1990.
108. **Katholi RE, Whitlow PL, Hageman GR and Woods WT.** Intrarenal adenosine produces hypertension by activating the sympathetic nervous system via the renal nerves in the dog. *J Hypertens* 2: 349-359, 1984.
109. **Katholi RE, Winternitz SR and Oparil S.** Decrease in peripheral sympathetic nervous system activity following renal denervation or unclipping in the one-kidney one-clip Goldblatt hypertensive rat. *J Clin Invest* 69: 55-62, 1982.
110. **Katritch V, Cherezov V and Stevens RC.** Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* 33: 17-27, 2012.
111. **Kaufmann J, Martinka P, Moede O, Sendeski M, Steege A, Fahling M, Hultstrom M, Gaestel M, Moraes-Silva IC, Nikitina T, Liu ZZ, Zavaritskaya O and Patzak A.** Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/re-oxygenation in renal interlobar arteries. *Acta Physiol (Oxf)* 213: 920-932, 2015.
112. **Kazi RN, Munavvar AS, Abdullah NA, Khan AH and Johns EJ.** Influence of high dietary sodium intake on the functional subtypes of alpha-adrenoceptors in the renal cortical vasculature of Wistar-Kyoto rats. *Auton Autacoid Pharmacol* 29: 25-31, 2009.
113. **Kelleher SP, Robinette JB, Miller F and Conger JD.** Effect of hemorrhagic reduction in blood pressure on recovery from acute renal failure. *Kidney Int* 31: 725-730, 1987.
114. **Khan MA, Sattar MA, Abdullah NA and Johns EJ.** Alpha1B-adrenoceptors mediate adrenergically-induced renal vasoconstrictions in rats with renal impairment. *Acta Pharmacol Sin* 29: 193-203, 2008.
115. **Khan ZP, Ferguson CN and Jones RM.** Alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia* 54: 146-165, 1999.
116. **Kim IM, Tilley DG, Chen J, Salazar NC, Whalen EJ, Violin JD and Rockman HA.** Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14555-14560, 2008.
117. **Kim J and Padanilam BJ.** Renal nerves drive interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 24: 229-242, 2013.
118. **Kim J and Padanilam BJ.** Renal denervation prevents long-term sequelae of ischemic renal injury. *Kidney Int* 87: 350-358, 2015.

119. **King DJ, Devaney NM and Gilbert JK.** A double-blind placebo controlled trial of a selective beta 2 adrenoceptor antagonist (ICI 118551) in chronic anxiety. *Int Clin Psychopharmacol* 2: 191-200, 1987.
120. **Kintscher U and Mahfoud F.** [Therapy of hypertension--2015]. *Dtsch Med Wochenschr* 140: 835-842, 2015.
121. **Kitazawa T and Kitazawa K.** Size-dependent heterogeneity of contractile Ca²⁺ sensitization in rat arterial smooth muscle. *J Physiol* 590: 5401-5423, 2012.
122. **Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, Shulman NB and Stamler J.** Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med* 334: 13-18, 1996.
123. **Knepper SM, Buckner SA, Brune ME, DeBernardis JF, Meyer MD and Hancock AA.** A-61603, a potent alpha 1-adrenergic receptor agonist, selective for the alpha 1A receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 97-103, 1995.
124. **Kobuchi S, Shintani T, Sugiura T, Tanaka R, Suzuki R, Tsutsui H, Fujii T, Ohkita M, Ayajiki K and Matsumura Y.** Renoprotective effects of gamma-aminobutyric acid on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur J Pharmacol* 623: 113-118, 2009.
125. **Kong JQ, Taylor DA and Fleming WW.** Functional distribution and role of alpha-1 adrenoceptor subtypes in the mesenteric vasculature of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1153-1159, 1994.
126. **Kopin IJ.** Biosynthesis and metabolism of catecholamines. *Anesthesiology* 29: 654-660, 1968.
127. **Kopp UC.** Neural control of renal function. Chapter 8. *Morgan and Claypool Life Sciences*, 2011. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57250/#S8.1>
128. **Kopp UC.** Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 308: R79-R95, 2015.
129. **Kopp UC, Cicha MZ and Smith LA.** Endogenous angiotensin modulates PGE(2)-mediated release of substance P from renal mechanosensory nerve fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R19-R30, 2002.
130. **Kopp UC, Farley DM and Smith LA.** Renal sensory receptor activation causes prostaglandin-dependent release of substance P. *Am J Physiol* 270: R720-R727, 1996.

131. **Kopp UC, Farley DM and Smith LA.** Bradykinin-mediated activation of renal sensory neurons due to prostaglandin-dependent release of substance P. *Am J Physiol* 272: R2009-R2016, 1997.
132. **Kopp UC, Smith LA and Dibona GF.** Renorenal reflexes: neural components of ipsilateral and contralateral renal responses. *Am J Physiol* 249: F507-F517, 1985.
133. **Kozłowska H, Szymka U, Schlicker E and Malinowska B.** Atypical beta-adrenoceptors, different from beta 3-adrenoceptors and probably from the low-affinity state of beta 1-adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 140: 3-12, 2003.
134. **Kramer RS, Herron CR, Groom RC and Brown JR.** Acute Kidney Injury Subsequent to Cardiac Surgery. *J Extra Corpor Technol* 47: 16-28, 2015.
135. **Kristiansen K.** Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103: 21-80, 2004.
136. **Kullmar M and Zarbock A.** Renal Replacement Therapy in Acute Kidney Injury - Indication and Implementation. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 53: 150-157, 2018.
137. **Kwon O, Hong SM and Ramesh G.** Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F25-F33, 2009.
138. **Lai EY, Fahling M, Ma ZF, Kallskog O, Persson PB, Patzak A, Persson AEG and Hultstrom M.** Norepinephrine increases calcium sensitivity of mouse afferent arteriole, thereby enhancing angiotensin II-mediated vasoconstriction. *Kidney International* 76: 953-959, 2009.
139. **Lambert E and Schlaich M.** The role of renal sympathetic nerves in ischemia reperfusion injury. *Auton Neurosci* 2017.
140. **Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, Palczewski K and Filipek S.** G protein-coupled receptors--recent advances. *Acta Biochim Pol* 59: 515-529, 2012.
141. **Le Dorze M, Legrand M, Payen D and Ince C.** The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care* 15: 503-508, 2009.
142. **Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D and Ince C.** Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med* 14: 502-516, 2008.

143. **Li YW, Guyenet PG and Bayliss DA.** Voltage-dependent calcium currents in bulbospinal neurons of neonatal rat rostral ventrolateral medulla: modulation by alpha2-adrenergic receptors. *J Neurophysiol* 79: 583-594, 1998.
144. **Linas SL, Shanley PF, Whittenburg D, Berger E and Repine JE.** Neutrophils accentuate ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol* 255: F728-F735, 1988.
145. **Liu ZZ, Mathia S, Pahlitzsch T, Wennysia IC, Persson PB, Lai EY, Hogner A, Xu MZ, Schubert R, Rosenberger C and Patzak A.** Myoglobin facilitates angiotensin II-induced constriction of renal afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* 312: F908-F916, 2017.
146. **Luhrs L, Manlapaz C, Kedzie K, Rao S, Cabrera-Ghayouri S, Donello J and Gil D.** Function of brain alpha2B-adrenergic receptor characterized with subtype-selective alpha2B antagonist and KO mice. *Neuroscience* 339: 608-621, 2016.
147. **Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG and Lefkowitz RJ.** Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283: 655-661, 1999.
148. **Ma MC, Huang HS, Wu MS, Chien CT and Chen CF.** Impaired renal sensory responses after renal ischemia in the rat. *J Am Soc Nephrol* 13: 1872-1883, 2002.
149. **MacNulty EE, McClue SJ, Carr IC, Jess T, Wakelam MJ and Milligan G.** Alpha 2-C10 adrenergic receptors expressed in rat 1 fibroblasts can regulate both adenylylcyclase and phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine by interacting with pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem* 267: 2149-2156, 1992.
150. **Majesky MW, Daemen MJ and Schwartz SM.** Alpha 1-adrenergic stimulation of platelet-derived growth factor A-chain gene expression in rat aorta. *J Biol Chem* 265: 1082-1088, 1990.
151. **Malek M and Nematbakhsh M.** Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev* 4: 20-27, 2015.
152. **Marfurt CF and Echtenkamp SF.** Sensory innervation of the rat kidney and ureter as revealed by the anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP) from dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 311: 389-404, 1991.
153. **Marti D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, Moreno L, Villagrasa V, Baretino D and D'Ocon P.** Correlation between mRNA levels and functional role of alpha1-adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of alpha1L

- as a functional isoform of the alpha1A-adrenoceptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1923-H1932, 2005.
154. **Marucci G, Angeli P, Buccioni M, Gulini U, Melchiorre C, Sagratini G, Testa R and Giardina D.** (+)-Cyclazosin, a selective alpha1B-adrenoceptor antagonist: functional evaluation in rat and rabbit tissues. *Eur J Pharmacol* 522: 100-107, 2005.
155. **Matsushita K, van d, V, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J and Gansevoort RT.** Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 375: 2073-2081, 2010.
156. **Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG and Levin A.** Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 11: R31, 2007.
157. **Meltzer LT, Wiley JN and Heffner TG.** The alpha 2-adrenoceptor antagonists idazoxan and yohimbine can unmask the postsynaptic dopamine agonist effects of B-HT 920. *Eur J Pharmacol* 170: 105-107, 1989.
158. **Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, Cournburn M, Schaelte G, Boning A, Niemann B, Roesner J, Kletzin F, Strouhal U, Reyher C, Laufenberg-Feldmann R, Ferner M, Brandes IF, Bauer M, Stehr SN, Kortgen A, Wittmann M, Baumgarten G, Meyer-Treschan T, Kienbaum P, Heringlake M, Schon J, Sander M, Treskatsch S, Smul T, Wolwender E, Schilling T, Fuernau G, Hasenclever D and Zacharowski K.** A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med* 373: 1397-1407, 2015.
159. **Michel MC and Rascher W.** Neuropeptide Y: a possible role in hypertension? *J Hypertens* 13: 385-395, 1995.
160. **Minneman KP.** Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca²⁺. *Pharmacol Rev* 40: 87-119, 1988.
161. **Miura M, Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub MH and Barnes PJ.** Role of potassium channels in bronchodilator responses in human airways. *Am Rev Respir Dis* 146: 132-136, 1992.
162. **Moein S, Javanmard SH, Abedi M, Izadpanahi MH and Gheisari Y.** Identification of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Long-term Hypoxia-treated Kidney Cells. *Adv Biomed Res* 6: 15, 2017.
163. **Mulvany MJ and Halpern W.** Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 260: 617-619, 1976.

164. **Muramatsu I, Morishima S, Suzuki F, Yoshiki H, Anisuzzaman AS, Tanaka T, Rodrigo MC, Myagmar BE and Simpson PC.** Identification of alpha 1L-adrenoceptor in mice and its abolition by alpha 1A-adrenoceptor gene knockout. *Br J Pharmacol* 155: 1224-1234, 2008.
165. **Nagelkerke A, Mujcic H, Wouters B and Span PN.** 18S is an appropriate housekeeping gene for in vitro hypoxia experiments. *Br J Cancer* 103: 590-592, 2010.
166. **Ninomiya I, Matsukawa K and Nishiura N.** Central and baroreflex control of sympathetic nerve activity to the heart and kidney in a daily life of the cat. *Clin Exp Hypertens A* 10 Suppl 1: 19-31, 1988.
167. **Nishio E, Nakata H, Arimura S and Watanabe Y.** Alpha-1-Adrenergic receptor stimulation causes arachidonic acid release through pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein and JNK activation in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 277-282, 1996.
168. **Nisoli E, Tonello C, Landi M and Carruba MO.** Functional studies of the first selective beta 3-adrenergic receptor antagonist SR 59230A in rat brown adipocytes. *Mol Pharmacol* 49: 7-14, 1996.
169. **Norman K and Nappe TM.** Alpha Receptor Agonist Toxicity. Chapter introduction. *StatPearls Publishing LLC*, 2018. Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500023/>
170. **O'Donnell SR and Wanstall JC.** The classification of beta-adrenoceptors in isolated ring preparations of canine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 81: 637-644, 1984.
171. **O'Rourke MF, Iversen LJ, Lomasney JW and Bylund DB.** Species orthologs of the alpha-2A adrenergic receptor: the pharmacological properties of the bovine and rat receptors differ from the human and porcine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 735-740, 1994.
172. **Oberhauser V, Vonend O and Rump LC.** Neuropeptide Y and ATP interact to control renovascular resistance in the rat. *J Am Soc Nephrol* 10: 1179-1185, 1999.
173. **Oellerich WF and Malik KU.** Neuropeptide Y modulates the vascular response to periarterial nerve stimulation primarily by a postjunctional action in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 1321-1329, 1993.
174. **Ostopovici-Halip L, Curpan R, Mracec M and Bologna CG.** Structural determinants of the alpha2 adrenoceptor subtype selectivity. *J Mol Graph Model* 29: 1030-1038, 2011.

175. **Owen MP, Taphorn MC and Walmsley JG.** Adrenergic control of intrarenal arteries of rabbits. *Am J Physiol* 256: H607-H612, 1989.
176. **Pahlitzsch T, Liu ZZ, Al Masri A, Braun D, Dietze S, Persson PB, Schunck WH, Blum M, Kupsch E, Ludwig M and Patzak A.** Hypoxia-reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 314: F430-F438, 2018.
177. **Papademetriou V, Rashidi AA, Tsioufis C and Doulas M.** Renal Nerve Ablation for Resistant Hypertension How Did We Get Here, Present Status, and Future Directions. *Circulation* 129: 1440-1451, 2014.
178. **Park J.** Cardiovascular risk in chronic kidney disease: role of the sympathetic nervous system. *Cardiol Res Pract* 2012: 319432, 2012.
179. **Park KM, Chen A and Bonventre JV.** Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem* 276: 11870-11876, 2001.
180. **Pedersen KR, Ravn HB, Povlsen JV, Schmidt MR, Erlandsen EJ and Hjortdal VE.** Failure of remote ischemic preconditioning to reduce the risk of postoperative acute kidney injury in children undergoing operation for complex congenital heart disease: a randomized single-center study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 143: 576-583, 2012.
181. **Peng M, Li Y, Luo Z, Liu C, Laties AM and Wen R.** Alpha2-adrenergic agonists selectively activate extracellular signal-regulated kinases in Muller cells in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1721-1726, 1998.
182. **Perez DM, Piascik MT, Malik N, Gaivin R and Graham RM.** Cloning, expression, and tissue distribution of the rat homolog of the bovine alpha 1C-adrenergic receptor provide evidence for its classification as the alpha 1A subtype. *Mol Pharmacol* 46: 823-831, 1994.
183. **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.
184. **Phillips JK and Hill CE.** Neuroreceptor mRNA expression in the rat mesenteric artery develops independently of innervation. *Int J Dev Neurosci* 17: 377-386, 1999.
185. **Phillips JK, Vidovic M and Hill CE.** Variation in mRNA expression of alpha-adrenergic, neurokinin and muscarinic receptors amongst four arteries of the rat. *J Auton Nerv Syst* 62: 85-93, 1997.

186. **Piascik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL, Jr. and Perez DM.** The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 1583-1589, 1995.
187. **Pierce KL and Lefkowitz RJ.** Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* 2: 727-733, 2001.
188. **Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI and Kobilka BK.** Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450: 383-387, 2007.
189. **Rath G, Balligand JL and Dessy C.** Vasodilatory mechanisms of beta receptor blockade. *Curr Hypertens Rep* 14: 310-317, 2012.
190. **Recordati G, Genovesi S and Cerati D.** Renorenal reflexes in the rat elicited upon stimulation of renal chemoreceptors. *J Auton Nerv Syst* 6: 127-142, 1982.
191. **Recordati G, Moss NG, Genovesi S and Rogenes P.** Renal chemoreceptors. *J Auton Nerv Syst* 3: 237-251, 1981.
192. **Rhee SW and Rusch NJ.** Molecular determinants of beta-adrenergic signaling to voltage-gated K(+) channels in the cerebral circulation. *Microcirculation* 25: 2018.
193. **Richman JG and Regan JW.** Alpha 2-adrenergic receptors increase cell migration and decrease F-actin labeling in rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274: C654-C662, 1998.
194. **Ruan Y, Kan H, Parmentier JH, Fatima S, Allen LF and Malik KU.** Alpha-1A adrenergic receptor stimulation with phenylephrine promotes arachidonic acid release by activation of phospholipase D in rat-1 fibroblasts: inhibition by protein kinase A. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 576-585, 1998.
195. **Salman IM, Ameer OZ, Sattar MA, Abdullah NA, Yam MF, Najim HS, Khan AH and Johns EJ.** Role of the renal sympathetic nervous system in mediating renal ischaemic injury-induced reductions in renal haemodynamic and excretory functions. *Pathology* 42: 259-266, 2010.
196. **Salomonsson M, Brannstrom K and Arendshorst WJ.** Alpha(1)-adrenoceptor subtypes in rat renal resistance vessels: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F138-F147, 2000.
197. **Satake N, Shibata M and Shibata S.** The inhibitory effects of iberiotoxin and 4-aminopyridine on the relaxation induced by beta 1- and beta 2-adrenoceptor activation in rat aortic rings. *Br J Pharmacol* 119: 505-510, 1996.

198. **Sattar MA, Abdullah NA, Khan MA and Johns EJ.** Alpha1A- and alpha1D-adrenoceptors are the major functional subtypes of renal alpha1-adrenoceptors in streptozotocin-induced diabetic and normal Sprague-Dawley rats. *Auton Autacoid Pharmacol* 28: 1-10, 2008.
199. **Schlaich MP, Sobotka PA, Krum H, Whitbourn R, Walton A and Esler MD.** Renal Denervation as a Therapeutic Approach for Hypertension Novel Implications for an Old Concept. *Hypertension* 54: 1195-1201, 2009.
200. **Schlaich MP, Socratous F, Hennebry S, Eikelis N, Lambert EA, Straznicky N, Esler MD and Lambert GW.** Sympathetic activation in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 20: 933-939, 2009.
201. **Sears MR and Lotvall J.** Past, present and future--beta2-adrenoceptor agonists in asthma management. *Respir Med* 99: 152-170, 2005.
202. **Sevak R, Paul A, Goswami S and Santani D.** Gastroprotective effect of beta3 adrenoceptor agonists ZD 7114 and CGP 12177A in rats. *Pharmacol Res* 46: 351-356, 2002.
203. **Shafaroudi MM, McBride M, Deighan C, Wokoma A, Macmillan J, Daly CJ and McGrath JC.** Two "knockout" mouse models demonstrate that aortic vasodilatation is mediated via alpha2a-adrenoceptors located on the endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 804-810, 2005.
204. **Sharfuddin AA and Molitoris BA.** Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 7: 189-200, 2011.
205. **Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O and Lefkowitz RJ.** Beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 281: 1261-1273, 2006.
206. **Shi Y, Wu Z, Cui N, Shi W, Yang Y, Zhang X, Rojas A, Ha BT and Jiang C.** PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular KATP channel activation by beta-adrenergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1205-R1214, 2007.
207. **Shibata K, Foglar R, Horie K, Obika K, Sakamoto A, Ogawa S and Tsujimoto G.** KMD-3213, a novel, potent, alpha 1a-adrenoceptor-selective antagonist: characterization using recombinant human alpha 1-adrenoceptors and native tissues. *Mol Pharmacol* 48: 250-258, 1995.
208. **Shimokawa T, Tsutsui H, Miura T, Nishinaka T, Terada T, Takama M, Yoshida S, Tanba T, Tojo A, Yamagata M and Yukimura T.** Renoprotective effect of yohimbine on ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury through alpha2C-adrenoceptors in rats. *Eur J Pharmacol* 781: 36-44, 2016.

209. **Sobotka PA, Mahfoud F, Schlaich MP, Hoppe UC, Bohm M and Krum H.** Sympatho-renal axis in chronic disease. *Clinical Research in Cardiology* 100: 1049-1057, 2011.
210. **Solano-Flores LP, Rosas-Arellano MP and Ciriello J.** Fos induction in central structures after afferent renal nerve stimulation. *Brain Res* 753: 102-119, 1997.
211. **Steinhausen M, Weis S, Fleming J, Dussel R and Parekh N.** Responses of in vivo renal microvessels to dopamine. *Kidney Int* 30: 361-370, 1986.
212. **Strosberg AD.** Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci* 2: 1198-1209, 1993.
213. **Surprenant A, Horstman DA, Akbarali H and Limbird LE.** A point mutation of the alpha 2-adrenoceptor that blocks coupling to potassium but not calcium currents. *Science* 257: 977-980, 1992.
214. **Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC and Molitoris BA.** Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F191-F198, 2003.
215. **Thorin E, Huang PL, Fishman MC and Bevan JA.** Nitric oxide inhibits alpha2-adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilation. *Circ Res* 82: 1323-1329, 1998.
216. **Toumaniantz G, Seze C, Serpillon S, Menoret S, Tesson L, Anegone I and Gauthier C.** [Vascular beta-adrenergic remodeling in rat transgenic model over-expressing endothelial beta3-adrenoceptors]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 98: 836-840, 2005.
217. **Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Beverelli F, Le Marec H, Berdeaux A and Gauthier C.** Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 128: 69-76, 1999.
218. **Uhlen S, Muceniece R, Rangel N, Tiger G and Wikberg JE.** Comparison of the binding activities of some drugs on alpha 2A, alpha 2B and alpha 2C-adrenoceptors and non-adrenergic imidazoline sites in the guinea pig. *Pharmacol Toxicol* 76: 353-364, 1995.
219. **Uhlen S, Porter AC and Neubig RR.** The novel alpha-2 adrenergic radioligand [3H]-MK912 is alpha-2C selective among human alpha-2A, alpha-2B and alpha-2C adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1558-1565, 1994.
220. **van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE and Lefkowitz RJ.** Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 17: 698-714, 1996.

221. **Venugopal V, Laing CM, Ludman A, Yellon DM and Hausenloy D.** Effect of remote ischemic preconditioning on acute kidney injury in nondiabetic patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a secondary analysis of 2 small randomized trials. *Am J Kidney Dis* 56: 1043-1049, 2010.
222. **Vetterlein F, Petho A and Schmidt G.** Distribution of capillary blood flow in rat kidney during postischemic renal failure. *Am J Physiol* 251: H510-H519, 1986.
223. **von Euler US.** [Synthesis, storage, and release of the adrenergic neurotransmitter]. *Klin Wochenschr* 49: 524-529, 1971.
224. **Vonend O, Okonek A, Stegbauer J, Habel S, Quack I and Rump LC.** Renovascular effects of sympathetic cotransmitters ATP and NPY are age-dependent in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 66: 345-352, 2005.
225. **Wang D, Jose P and Wilcox CS.** Beta(1) Receptors protect the renal afferent arteriole of angiotensin-infused rabbits from norepinephrine-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 17: 3347-3354, 2006.
226. **Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AGW, Tate CG and Schertler GFX.** Structure of a beta(1)-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454: 486-492, 2008.
227. **Webb RC.** Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27: 201-206, 2003.
228. **Westfall TC, Yang CL and Curfman-Falvey M.** Neuropeptide-Y-ATP interactions at the vascular sympathetic neuroeffector junction. *J Cardiovasc Pharmacol* 26: 682-687, 1995.
229. **Wier WG and Morgan KG.** Alpha1-adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 150: 91-139, 2003.
230. **Willinger CC, Schramek H, Pfaller K and Pfaller W.** Tissue distribution of neutrophils in postischemic acute renal failure. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 62: 237-243, 1992.
231. **Wolff DW, Buckalew VM, Jr. and Strandhoy JW.** Renal alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor mediated vasoconstriction in dogs: comparison of phenylephrine, clonidine, and guanabenz. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 5: S793-S798, 1984.
232. **Worthley SG, Tsioufis CP, Worthley MI, Sinhal A, Chew DP, Meredith IT, Malaiapan Y and Papademetriou V.** Safety and efficacy of a multi-electrode renal sympathetic denervation system in resistant hypertension: the EnligHTN I trial. *European Heart Journal* 34: 2132-2140, 2013.

233. **Wyss JM and Donovan MK.** A direct projection from the kidney to the brainstem. *Brain Res* 298: 130-134, 1984.
234. **Xiao YY and Han L.** The mRNA expression of alpha1-adrenergic receptor subtypes in the outer lung tissues of hypoxia pulmonary hypertension rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 42: 502-506, 2004.
235. **Xu B, Zheng H, Liu XF and Patel KP.** Activation of afferent renal nerves modulates RVLM-projecting PVN neurons. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 308: H1103-H11111, 2015.
236. **Xue JL, Daniels F, Star RA, Kimmel PL, Eggers PW, Molitoris BA, Himmel-farb J and Collins AJ.** Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. *J Am Soc Nephrol* 17: 1135-1142, 2006.
237. **Yamamoto Y and Koike K.** Alpha(1)-Adrenoceptor subtypes in the mouse mesenteric artery and abdominal aorta. *Br J Pharmacol* 134: 1045-1054, 2001.
238. **Ye S, Ozgur B and Campese VM.** Renal afferent impulses, the posterior hypothalamus, and hypertension in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 51: 722-727, 1997.
239. **Ye SH, Zhong HQ, Yanamadala V and Campese VM.** Renal injury caused by intrarenal injection of phenol increases afferent and efferent renal sympathetic nerve activity. *American Journal of Hypertension* 15: 717-724, 2002.
240. **Zaglia T and Mongillo M.** Cardiac sympathetic innervation, from a different point of (re)view. *J Physiol* 595: 3919-3930, 2017.
241. **Zhang H and Faber JE.** Trophic effect of norepinephrine on arterial intima-media and adventitia is augmented by injury and mediated by different alpha1-adrenoceptor subtypes. *Circ Res* 89: 815-822, 2001.
242. **Zhong H and Minneman KP.** Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 375: 261-276, 1999.
243. **Zimmerman RF, Ezeanuna PU, Kane JC, Cleland CD, Kempananjappa TJ, Lucas FL and Kramer RS.** Ischemic preconditioning at a remote site prevents acute kidney injury in patients following cardiac surgery. *Kidney Int* 80: 861-867, 2011.

7. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

7.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Olivia Moede, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Differentielle Expression von adrenergen Rezeptoren in arteriellen Gefäßen von Mausnieren und ihr Einfluss auf den Gefäßtonus“ 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) 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/der Betreuer/in, 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.“

Datum

Unterschrift

7.2 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Olivia Moede hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: J. Kaufmann, P. Martinka, O. Moede, M. Sendeski, A. Steege, M. Föhling, M. Hultström, M. Gaestel, I. C. Moraes-Silva, T. Nikitina, Z. Z. Liu, O. Zavaritskaya und A. Patzak, „Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/re-oxygenation in renal interlobar arteries“, Acta Physiologica (Oxf) 213: 920-932, 2015.

Beitrag im Einzelnen:

Ich habe mRNA-Expression der adrenergen Rezeptoren von Interlobararterien gemessen. Hierzu präparierte ich die Gefäße, isolierte die mRNA, schrieb diese in cDNA um, erstellte Effektivitätskurven für die PCR der Gene und wertete die qPCR für die einzelnen Rezeptoren aus. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Tabelle 2 des oben genannten Artikels dargestellt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

Publikation 1: J. Kaufmann, P. Martinka, O. Moede, M. Sendeski, A. Steege, M. Föhling, M. Hultström, M. Gaestel, I. C. Moraes-Silva, T. Nikitina, Z. Z. Liu, O. Zavaritskaya und A. Patzak, „Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/re-oxygenation in renal interlobar arteries“, *Acta Physiologica (Oxf)* 213: 920-932, 2015.

10. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die maßgeblich zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein Dank gilt insbesondere den Personen, ohne die die vorliegende Arbeit niemals zustande gekommen wäre:

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Patzak für die Betreuung dieser Arbeit. Der konstruktive Austausch und die regelmäßigen fachlichen und persönlichen Gespräche waren mir stets eine große Hilfe und Motivation. Ich danke ihm weiterhin für die Unterstützung bei den Funktionsuntersuchungen an den renalen Mikrogefäßen.

Außerdem danke ich Ulrike Neumann für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der molekularbiologischen Untersuchungen. Die Zusammenarbeit war stets von gegenseitiger Unterstützung und einer freundlichen und angenehmen Atmosphäre geprägt. Ebenfalls für die Hilfe bei den molekularbiologischen Untersuchungen gilt mein Dank Andrea Gerhardt, Jeanette Schmidt und Dr. Marion Ludwig.

Ich danke weiterhin Dr. Jana Kaufmann für die Unterstützung bei den funktionellen Messungen an den Interlobararterien.

Mein Dank gilt meiner gesamten Familie für die stetige Unterstützung auch in schwierigen Zeiten und die aufbauenden Ratschläge, die mich fortwährend motiviert und ermutigt haben. Insbesondere danke ich Samuel Kallai für die Hilfe bei der Erstellung der Grafiken und den Formatierungen sowie meiner lieben Schwester Laura Moede für die konstruktive Kritik und die wertvollen Hinweise. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Heinrich Rau, Dr. Henriette Haserodt, Dr. Stefan Kühne und Florian Dammasch für die hilfreichen Korrekturvorschläge.