

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Ligandenunabhängige Aktivierung heptahelikaler
Transmembranrezeptoren**
—
**Der Bayliss-Effekt als Paradebeispiel für
Mechanosensitivität**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Holger Schneider

aus Stuttgart

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. S. Steffens PD Dr. D. Brügger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. rer. nat. Michael Mederos y Schnitzler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	14.11.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Der myogene Tonus - Begriffe, Phänomen, Physiologie und Pathophysiologie	6
1.2	Glattmuskuläre Kontraktionsmechanismen zur Ausbildung eines myogenen Tonus	9
1.3	Ein gemeinsamer Mechanosensor für beide Kontraktionswege	13
1.4	Mechanosensitivität ist pharmakologisch hemmbar	13
1.5	Alternative Mechanosensoren	15
1.6	Zur Rolle des Endothels	16
1.7	Zur Geschichte der untersuchten Rezeptoren	17
1.7.1	Die Angiotensinrezeptoren	17
1.7.2	Die Endothelinrezeptoren	18
1.7.3	Die Vasopressinrezeptoren	18
1.7.4	Die alpha-Adrenozeptoren	19
1.7.5	Die beta-Adrenozeptoren	20
1.8	Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2	Reagenzien und Reaktionskits	22
2.1.3	Pharmaka	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Tiere	24
2.2.2	Gewebemikrodissektion für RNA-Isolierung oder Arteriographie	24
2.2.2.1	Gehirnarterien und Arachnoidea mater (Spinnengewebshaut)	24
2.2.2.2	A. carotis und Pulmonalarterien	24
2.2.2.3	Mesenterialarterien und A. mesenterica superior	25
2.2.2.4	A. renalis, Aorta abdominalis und Fettgewebe	25
2.2.3	Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA	26
2.2.4	cDNA-Synthese und quantitative PCR	26
2.2.4.1	Grundlagen der qPCR	26
2.2.4.2	Fehlerquellen	28
2.2.4.3	Durchführung der qPCR	33
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.6	Arteriographie (isobare Konstriktionsmessung)	34
2.2.7	Statistik	38

3	Ergebnisse	40
3.1	Heptahelikale Rezeptoren nach Lokalisation	40
3.1.1	Evaluation der Primerkombinationen	40
3.1.2	Determination der geeigneten Haushaltsgene	41
3.1.3	Prüfung der Daten auf ihre zugrunde liegende statistische Verteilung	42
3.1.4	Übersichtsprofil der RNA-Level verschiedener heptahelikaler Transmembranproteine in verschiedenen Gefäßbetten.	43
3.1.5	Prüfung der Diskriminationsfähigkeit des WILCOXON-Rangsummentests für Ziel- und Kontrollgewebe	44
3.1.6	Charakteristika der RNA-Level von Leitungs- und Widerstandsgefäßen	45
3.1.6.1	Leitungs- versus Widerstandsgefäße	45
3.1.6.2	Rezeptorsubtyp-RNA-Level innerhalb eines Gefäßgebietes	49
3.2	Die Rolle von $G_{q/11}$ -koppelnden Rezeptoren für die myogene Vasokonstriktion in isolierten Mesenterialarterien	51
3.2.1	Test der Daten auf Normalverteilung	51
3.2.2	Qualitative Auffälligkeiten bei der Messung des myogenen Tonus	52
3.2.3	Der myogene Tonus unter Losartan	57
3.2.4	Der myogene Tonus in Mesenterialarterien unter Vierfachantagonisierung	58
3.2.5	Der myogene Tonus unter Prazosinapplikation	60
3.2.6	Der myogene Tonus unter Dreifachantagonisierung	61
3.2.7	Vergleich der depolarisationsinduzierten Konstriktionen	65
4	Diskussion	66
4.1	7TMR-Rezeptoren-Expressionsprofile	66
4.1.1	AT_1 -Angiotensinrezeptoren	66
4.1.2	Endothelinrezeptoren	72
4.1.3	V_{1A} -Vasopressinrezeptor	78
4.1.4	α_1 -Adrenozeptoren	82
4.1.5	α_2 -Adrenozeptoren	89
4.1.6	β_2 -Adrenozeptor	95
4.1.7	Andere Ansätze zur differierenden Physiologie sukzessiver Gefäßabschnitte	100
4.2	Fundamentale Eigenschaften des Phänomens myogener Tonus	101
4.2.1	Die bisigmoide MT_1 -Kurve	101
4.2.2	Linksverschiebung der myogenen Antwort und Änderung der Kurvenform bei wiederholter Druckapplikation	108
4.3	Hemmung des myogenen Tonus	111

4.3.1	Zur besonderen Rolle der inversen Agonisten bei der Hemmung von Mechano- sensitivität	111
4.3.2	Losartan	113
4.3.3	Pharmakologische Inhibition des myogenen Tonus	114
4.3.3.1	Hemmung von α_1 -Adrenozeptoren durch Prazosin	116
4.3.3.2	Erhöhung der Ruhekontraktilität durch die RCB-Kombination	117
4.3.3.3	Hemmung von AT_1 -Angiotensin-II-Rezeptoren durch Candesartan	117
4.3.3.4	Hemmung des ET_A -Endothelinrezeptors durch BQ-123	119
4.3.3.5	Hemmung des V_{1A} -Vasopressinrezeptors durch Relcovaptan	121
4.3.4	Nicht-Additivität von kombinierter pharmakologischer Inhibition des myogenen Tonus	121
4.4	Ausblicke	125
5	Zusammenfassung	127
6	Kongressbeiträge	129
7	Internetquellen	130
	Literatur	130
8	Danksagungen	158

Abkürzungsverzeichnis

7TMR	Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor
ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i> , Angiotensin I in Angiotensin II überführendes Enzym
ACE-I	<i>angiotensin-converting enzyme inhibitor</i> , ACE-Hemmer
ASIC2	<i>acid sensing (proton-gated) ion channel 2</i> , säuresensitiver (protonengesteuerter) Ionenkanal 2
BK _{Ca}	<i>large ("big") conductance calcium-activated K⁺ channel</i> , kalziumgesteuerter Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca _v	spannungsgesteuerter Kalziumkanal
cDNA	<i>complementary DNA</i> , DNA, die aus RNA revers transkribiert wurde
CPI-17	17 kDa <i>protein-kinase-C-potentiated protein phosphatase 1 inhibitor protein</i>
DAG	Diazylglyzerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> , durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase
FRET	FÖRSTER-Resonanz-Energietransfer
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GPCR	<i>G-Protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor

GEF	<i>guanine-nucleotide exchange factor</i> , Faktor zum Austausch von Guaninnukleotiden
HKG	<i>house-keeping-gene</i> , Haushaltsgen
IK _{Ca}	<i>intermediate conductance calcium-activated K⁺ channel</i> , kalziumgesteuerter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
kD	Kilodalton, 1000 Dalton
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase (MAPK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase</i> , Proteinkinase von MAPK und ERK
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i> , Myosinleichtkettenkinase
MLCP	<i>myosin light chain phosphatase</i> , Myosinleichtkettenphosphatase
MT	myogener Tonus
MYPT1	<i>myosin light chain phosphatase targeting subunit 1</i> , Zieluntereinheit 1 der MLCP
PCR	<i>polymerase- chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PSS	<i>physiological salt solution</i> , physiologische Salzlösung
Raf	c-Raf oder Raf-1, Homolog des viralen v-raf; abgeleitet von <i>rapidly growing fibrosarcomas</i> , schnell wachsende Fibrosarkome, was die onkogene Potenz des Virus spiegeln soll (Wellbrock <i>et al.</i> , 2004)
RGS5	<i>regulator of g-protein signaling 5</i> , Regulator des G-Protein-Signalwegs 5
RhoA	<i>ras-homolog gene family, member A</i> , Mitglied A der Genfamilie der Ras-Homologe

RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i> ; Analysenregion im Videomikroskop
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffderivate
RT	reverse Transkriptase
RT (-)	ohne reverse Transkriptase
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SMC	<i>smooth muscle cell</i> , glatte Muskelzelle
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
TMEM16A	<i>transmembrane protein 16A</i> , Transmembranprotein 16A
TRPC3/6/7	„ <i>canonical</i> “ <i>transient receptor potential channel 3/6/7</i> , TRP-Kanal 3/6/7 der kanonischen Subfamilie
TRPM4	„ <i>melastatin</i> “ <i>transient receptor potential channel 4</i> , TRP-Kanal 4 der Melastatin-ähnlichen Subfamilie
TRPV4	„ <i>vanilloid</i> “ <i>transient receptor potential channel 4</i> , TRP-Kanal 4 der Vanilloidrezeptor-ähnlichen Subfamilie
UTP	Uridintriphosphat

1 Einleitung

1.1 Der myogene Tonus - Begriffe, Phänomen, Physiologie und Pathophysiologie

William Maddock Bayliss beschrieb 1902 erstmals eine Konstriktion von Arterien auf intravasale Druckerhöhung (Bayliss, 1902). Dieses Phänomen ist heute im deutschsprachigen Raum unter den Namen „BAYLISS-Effekt“ und im angloamerikanischen Sprachraum unter dem Begriff „*myogenic tone*“ (myogener Tonus) bekannt. Als myogen wird die Reaktion bezeichnet, da sie weder von neuronalen noch von endothelialen Faktoren abhängt (Falcone *et al.*, 1991; Gschwend *et al.*, 2003; Anschütz & Schubert, 2005). Alleinigiger Träger der Kontraktion auf Druckerhöhung sind die glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) der Gefäßmedia. Die Druckerhöhung wird an den glatten Muskelzellen wahrscheinlich in Form einer erhöhten Wandspannung wahrgenommen. Diese stellt also den eigentlich wahrgenommenen physikalischen Stimulus dar (Davis & Hill, 1999).

Auf eine schrittweise Druckerhöhung wird am isolierten Gefäß zunächst eine Dilatation beobachtet, die dann in eine Konstriktion umschlägt (siehe auch Abbildung 1).

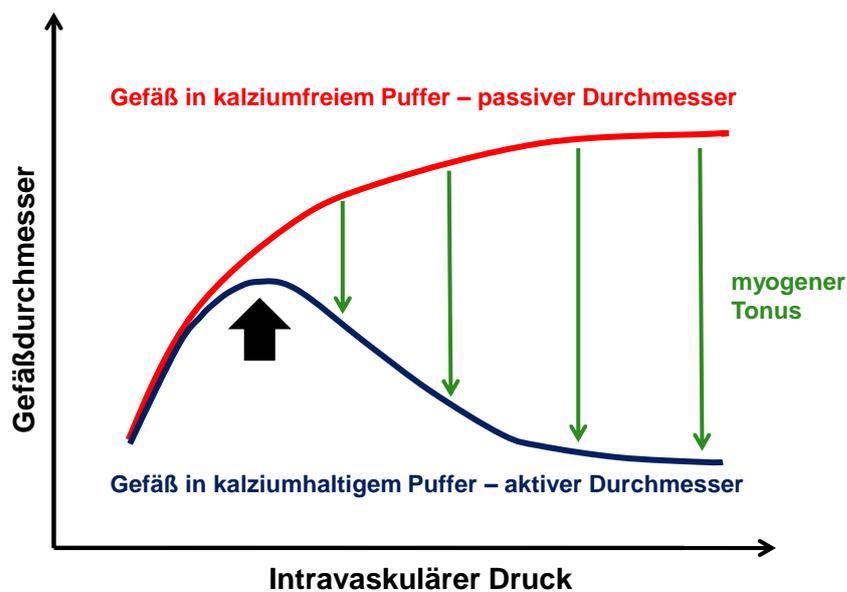


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reaktion eines Widerstandsgefäßes auf eine sukzessive intravaskuläre Druckerhöhung; Die obere rote Kurve stellt den Durchmesser Verlauf in einer kalziumfreien Lösung dar: Das Gefäß dilatiert passiv. Die untere blaue Kurve stellt den Durchmesser Verlauf in kalziumhaltiger Lösung dar: Das Gefäß dilatiert zunächst ebenfalls, konstringiert dann aber ab einem bestimmten Druck (mit dickem schwarzem Pfeil gekennzeichnet). Die relative Differenz zwischen beiden Durchmesser Verläufen kann als myogener Tonus angegeben werden (grüne Pfeile). Abbildung modifiziert nach Davis und Hill, 1999.

Das Begriffspaar Konstriktion und Dilatation bezeichnet dabei das Verhalten des Gefäßes, Kontraktion und Relaxation beschreiben das Verhalten der einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen.

In der Literatur werden uneinheitlich zwei Begriffe verwendet, die beide das Phänomen einer durch Druckerhöhung bedingten Konstriktion bezeichnen sollen: Myogener Tonus (*myogenic tone*) (Osol *et al.*, 2002; Garry *et al.*, 2007; Anfinogenova *et al.*, 2011) und myogene Antwort (*myogenic response*) (Gschwend *et al.*, 2003; Anschütz & Schubert, 2005; Bidani *et al.*, 2009; Bulley *et al.*, 2012); andere Autoren verwenden die Begriffe synonym (Gannon *et al.*, 2008).

Zunächst muss der myogene Tonus vom basalen Tonus abgegrenzt werden.

Der Begriff „basaler Tonus“ bezeichnet den Ruhezustand eines Gefäßes *in vivo* bei konstantem intravasculärem Druck, auf den aufbauend es auf vasoaktive Stimuli in zwei Richtungen reagieren kann - mit Dilatation und Konstriktion. Das Gefäß liegt in seinem physiologischen Ruhezustand also bereits etwas konstringiert vor, kann den Konstriktionsgrad aber noch steigern oder ihn vermindern. Da mit einer Dilatation eine Durchblutungssteigerung einhergeht, ist diese Option der Gefäßreaktion als Blutflussreserve bezeichnet worden (Folkow, 1989). Auch an der Ausbildung des basalen Tonus sind wahrscheinlich mechanosensitive Vorgänge beteiligt (Davis & Hill, 1999; Schubert *et al.*, 2008).

Der Begriff „myogener Tonus“ bezeichnet eine Konstriktion auf Steigerung des intravasculären Drucks. Die Konstriktion beruht auf einer Zunahme der glattmuskulären Kontraktilität, ist also als Steigerung des basalen Tonus zu verstehen. Diese Steigerung beruht allein auf Mechanosensitivität der glatten Muskelzellen, stellt also keine Reaktion auf chemische Stimuli dar.

Der myogene Tonus stellt damit eine Reaktion dar, der basale Tonus einen physiologischen Ruhezustand eines Organs.

Problematisch ist nun, dass die Begriffe „basaler Tonus“ und „myogener Tonus“ häufig gleichgesetzt werden, da beide Tonusformen von der glatten Gefäßmuskulatur ausgehen (Garry *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2008).

Mit der Verwendung der Begriffs „myogene Antwort“ soll zum einen die Vermengung mit dem Begriff des basalen Tonus vermieden und zum anderen unterstrichen werden, dass hier die physiologischen Werte von intravasculärem Druck und Wandspannung verlassen wurden und eine Gegenregulation eingesetzt hat. Dies umfasst sowohl eine Dilatation als auch eine Konstriktion des Gefäßes (Schubert *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2009). Dieser Begriff ist semantisch näher am reaktiven Charakter des Organreflexes, beinhaltet aber beide möglichen Durchmesseränderungen eines Gefäßes. Die myogene Antwort ist gewissermaßen als myogene Autoregulation aufzufassen. Teleologisch wird diese druckabhängige Durchmesserregulation mit dem Bestreben erklärt, einen konstanten Blutfluss durch das jeweilige Organgebiet zu erreichen.

Möglicherweise können basaler Tonus und myogener Tonus/konstriktorischer Anteil der myogenen Antwort auch als ein Kontinuum der Gefäßreaktionen auf steigende intraluminale Druckwerte und damit auf steigende Wandspannungswerte aufgefasst werden.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich ausschließlich auf die Untersuchung kontraktile Reflexe der glatten Gefäßmuskulatur, die durch intravasale Druckerhöhungen ausgelöst werden. Diese Reflexe werden in der vorliegenden Arbeit zum einen als basaler Tonus (im physiologischen Druckbereich) und zum anderen als myogener Tonus (über den physiologischen Druckbereich hinaus) bezeichnet. Die Dilatation auf Drucksenkung wird nicht behandelt, da deren Signalkaskade bisher unklar ist, im Gegensatz zur Signalkaskade der Konstriktion auf Druckerhöhung (siehe auch Kapitel 1.2). Auch die Zusammenführung

beider Reaktionen auf ein zentrales Sensorelement, wie sie der Begriff myogene Antwort suggeriert, stellt meist nur eine Vereinfachung ohne empirischen Beleg dar.

Im Gegenteil zeigen neuere Befunde, dass die Dilatation auf Drucksenkung vielmehr vom Endothel auszugehen scheint (Bagher *et al.*, 2012), siehe auch Kapitel 1.6.

Die beschriebenen Begriffe sind nicht für jeden Abschnitt im arteriellen Stromgebiet gleichermaßen relevant. Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlichen Physiologie großlumiger und kleinlumiger arterieller Gefäße. Unterschieden werden auf der einen Seite großlumige Leitungsgefäße wie die Aorta, denen vorwiegend der Transport großer Blutvolumina pro Zeiteinheit zukommt. Die Leitungsgefäße verhalten sich weitgehend passiv auf Druckänderungen. In ihnen herrschen mittlere arterielle Druckverhältnisse zwischen 100 und 110 mmHg (Davis *et al.*, 1986).

Auf der anderen Seite stellen die kleinlumigen Widerstandsgefäße die Abschnitte, über denen auf den Gesamtquerschnitt bezogen der größte Druckabfall im Kreislaufsystem erfolgt. Anatomisch umfasst der Begriff Widerstandsgefäße kleine Arterien und Arteriolen (Christensen & Mulvany, 2001). In kleinen Arterien herrschen mittlere Druckverhältnisse zwischen 50 und 100 mmHg, in Arteriolen zwischen 20 und 50 mmHg (Davis *et al.*, 1986). Widerstandsgefäße sind entscheidend für den peripheren Strömungswiderstand. Sie kontrollieren die Durchblutung der nachgeschalteten Organe über die Modulation ihrer Gefäßdurchmesser. Diese Durchmessermodulation erfolgt unter anderem auch aktiv auf Druckänderungen. Eine Änderung des Gefäßdurchmessers führt nach dem HAGEN-POISEUILLE-Gesetz zu einer überproportionalen Änderung des Strömungswiderstandes. Somit kann der systemische Widerstand hocheffektiv über den Durchmesser der Widerstandsgefäße moduliert werden.

Widerstandsgefäße zeigen einen ausgeprägten myogenen Tonus. In Leitungsgefäßen ist der myogene Tonus entweder nur gering ausgeprägt oder er fehlt vollkommen, so auch in der pulmonalarteriellen Strombahn (Davis, 1993; Naik *et al.*, 2005). Diese zeigt ein passives Verhalten auf Druckveränderung im rechten Ventrikel. Damit kann bei Belastung eine stärkere Durchblutung der Lungenstrombahn gewährleistet werden. Käme es zur myogenen Konstriktion auf pulmonalarterielle Druckerhöhung, würde Blut in der Lungenstrombahn sequestriert. Damit würden rechter und linker Ventrikel funktionell entkoppelt. Eine dynamische Kreislaufregulation in Belastungssituationen wäre unmöglich.

In der Niere scheint die Hauptaufgabe des myogenen Tonus im Schutz der Glomeruluskapillaren vor Druckspitzen und damit vor Ruptur oder strukturellen Schäden zu bestehen. Für den Schutz vor Druckabfall und damit Gewährleistung einer konstanten glomerulären Filtrationsrate (GFR) wird der Effekt der myogenen Antwort wesentlich durch den Mechanismus der tubulo-glomerulären Rückkopplung ergänzt (Loutzenhiser *et al.*, 2006). Dies unterstreicht, dass die Dilatation auf Druckabfall nicht einfach semantisch über den Begriff der myogenen Antwort auf den gleichen Mechanismus zurückgeführt werden kann, der zur Kontraktion der glatten Muskelzellen auf Druckerhöhung führt.

Wird der Schutz der Kapillaren durch den myogenen Tonus durchbrochen, resultieren Organschäden. Als Beispiel sei die Nephrosklerose bei arterieller Hypertonie genannt (Bidani *et al.*, 2009). Dabei kommt es zu strukturellen Schäden der kleinen Gefäße. Diese behindert wahrscheinlich die Gefäße in ihrer Konstriktionsfähigkeit und damit auch in der Ausbildung eines myogenen Tonus (Christensen *et al.*, 1997). In der Folge kommt es zum Durchbruch von Blutdruckspitzen durch die arterioläre Sperre und zur sukzessiven Schädigung der kapillären Schlingen der Nierenglomeruli, die letztlich zum Nierenversagen

führt.

Ein pathologisch erhöhter myogener Tonus führt dagegen über die konsekutiv verminderte Perfusion zu Gewebeischämien. Diese Problematik zeigt sich beispielsweise im Gefolge von Subarachnoidalblutungen und ist einer der Gründe für die hohe Letalität dieser Erkrankung (Ishiguro *et al.*, 2002). Eine wesentliche Pfeiler zur Therapie der Vasokonstriktion bei Subarachnoidalblutung ist deshalb der Einsatz von Dilatanzen, sog. Kalziumkanalblockern wie Nimodipin (Velat *et al.*, 2011).

Kalziumkanalblocker hemmen den myogenen Tonus und damit dessen protektive Funktion für das nachgeschaltete Kapillarbett. Durch den überhöhten Kapillardruck wird der kapilläre Filtrationskoeffizient gesteigert. Es resultieren Ödeme im Gewebe, eine wichtige Nebenwirkung der Therapie mit Kalziumkanalblockern (Gustafsson, 1987).

Die genannten Beispiele zeigen, dass sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung des myogenen Tonus krankhafte Zustände nach sich ziehen kann. Dies verdeutlicht, dass für künftige Strategien zur differenzierteren therapeutischen Modulation des myogenen Tonus ein genaues Verständnis der dem myogenen Tonus zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nötig ist.

1.2 Glattmuskuläre Kontraktionsmechanismen zur Ausbildung eines myogenen Tonus

Die Kontraktionsmechanismen der glatten Muskelzellen auf Druckerhöhung zeigen deutliche Überschneidungen mit den Kontraktionsmechanismen auf chemische Stimuli (Davis & Hill, 1999; Coats *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2008; Cole & Welsh, 2011).

Die Kontraktibilität glatter Muskelzellen kann prinzipiell auf zwei Wegen beeinflusst werden, kalziumabhängig und kalziumunabhängig.

Folgend werden diejenigen kalziumabhängigen Teilkomponenten skizziert, deren Beteiligung am myogenen Tonus etabliert ist. Dabei werden die Teilkomponenten in Analogie zur Signalkaskade nach Aktivierung $G_{q/11}$ -Protein-koppelnder Rezeptoren in eine hypothetische Reihenfolge gebracht. Diese ist übersichtshalber auf Abbildung 2 zu finden.

Seit 1993 ist etabliert, dass der myogene Tonus mit einer Aktivierung von G-Proteinen einhergeht (Osol *et al.*, 1993). G_q - und G_{i1} -Proteine als Unterformen der genannten G-Proteine werden innerhalb einer Minute reaktiv auf Zelldehnung aktiviert (Gudi *et al.*, 1998b). Im Fall der $G_{q/11}$ -Proteine, kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$) (Osol *et al.*, 1993; Coats *et al.*, 2001). Diese katalysiert die Bildung der intrazellulären Botenstoffe (*second messenger*) Diazylglyzerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). Dabei ist wichtig, dass bei steigendem intraluminalen Druck die genannten Botenstoffe vermehrt synthetisiert werden (Narayanan *et al.*, 1994). DAG selbst aktiviert die Proteinkinase $C\alpha$ ($PKC\alpha$) (Laher & Bevan, 1987; Hill *et al.*, 1990; Osol *et al.*, 1991; Dessy *et al.*, 2000; Yeon *et al.*, 2002).

$PKC\alpha$ wiederum scheint exklusiv im kalziumabhängigen Schenkel der SMC-Kontraktion zu wirken (Johnson *et al.*, 2009), z.B. durch Potenzierung der Leitfähigkeit von spannungsgesteuerten L-Typ-Kalziumkanälen (*voltage gated calcium channels*, Ca_v) (Hill *et al.*, 1996; Yeon *et al.*, 2002). DAG hat weiterhin die Fähigkeit, neben TRPC3 und TRPC7 auch TRPC6, einen unselektiven Kationenkanal der

transient receptor potential (TRP)-Familie, zu aktivieren (Hofmann *et al.*, 1999). Dessen Präsenz in der SMC-Membran ist für den myogenen Tonus essentiell (Welsh *et al.*, 2002; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Wichtig ist es, festzuhalten, dass TRPC6 nicht *per se* mechanosensitiv ist, sondern erst durch DAG aktiviert werden muss (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Ein weiterer Ionenkanal dieser Familie, TRPM4, scheint ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade des myogenen Tonus zu sein (Earley *et al.*, 2004). TRPM4 wird unter anderem durch PKC aktiviert (Earley *et al.*, 2007).

Der unselektive Kationeneinstrom durch TRP-Kanäle erklärt die lange bekannte initiale Depolarisation der SMC-Zellmembran (Harder, 1984), die zu den ersten zellulären Ereignissen vor der Ausbildung des myogenen Tonus zählt. Die Depolarisation führt zur Öffnung von Ca_V (McCarron *et al.*, 1997; Coats *et al.*, 2001). Dabei ist der Einstrom von extrazellulärem Kalzium für das Zustandekommen eines myogenen Tonus weitaus wichtiger als die IP_3 -vermittelte Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (McCarron *et al.*, 1997; Coats *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2008). Der folgende Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) führt zur Aktivierung der Myosinleichtkettenkinase (MLCK) (Zou *et al.*, 1995); dies führt zu einer Zunahme der phosphorylierten Fraktion der regulatorischen leichten 20 kDa-Kette des Myosins (MLC_{20}) (Zou *et al.*, 1995; Dessy *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2009). MLC_{20} -phosphoryliertes Myosin ist die Grundlage für die folgend erhöhte Aktomyosinkoppelung. Es resultiert makroskopisch eine Kontraktion der glatten Muskelzellen (Karakı *et al.*, 1997; Somlyo & Somlyo, 2003).

Teminiert wird der $G_{q/11}$ -Signalweg im myogenen Tonus unter anderem durch RGS5-vermittelte GTP-Hydrolyse am $G_{\alpha_{q/11}}$ -Protein (Ketsawatsomkron *et al.*, 2012). Auch die Aktivierung von BK_{Ca} -Kaliumkanälen durch Dehnung, Depolarisation und Kalziumeinstrom führt über die resultierende Hyperpolarisation zu einer Limitierung des myogenen Tonus (Hill *et al.*, 2010).

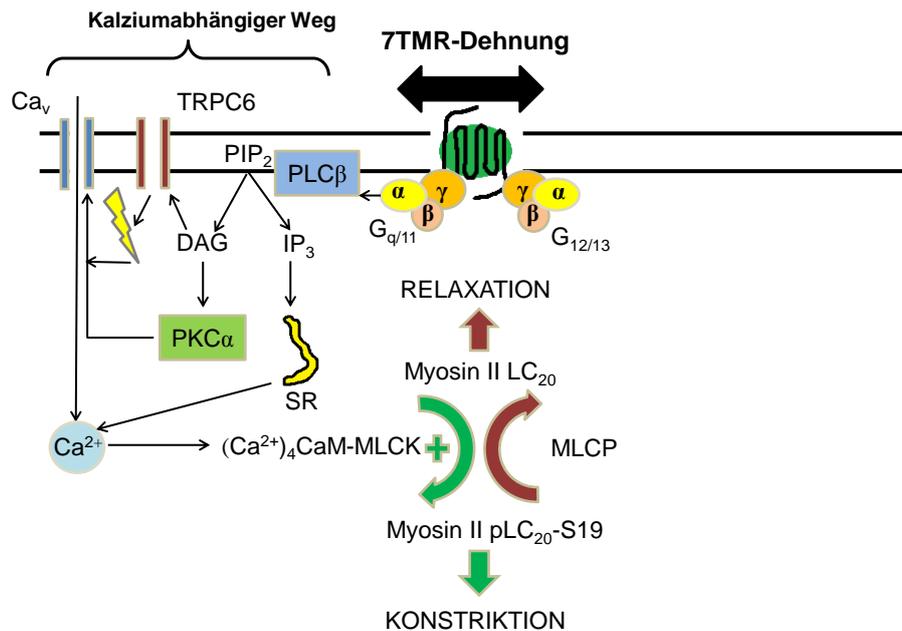


Abbildung 2: Der kalziumabhängige Kontraktionsweg, initiiert durch ligandenunabhängige Aktivierung eines mechanosensitiven 7TMR. Dehnung eines mechanosensitiven 7TMR führt zur Aktivierung eines G_{q/11}-Proteins. Dessen α-Untereinheit tauscht GDP gegen GTP aus, dissoziiert von der βγ-Untereinheit und aktiviert die Phospholipase Cβ (PLCβ). Diese spaltet membranäres Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diazylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). IP₃ führt formal zur Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dieser Schritt scheint jedoch für den myogenen Tonus von geringer Bedeutung zu sein. DAG aktiviert zum einen unselektive Kationenkanäle vom Typ TRPC6 und zum anderen die Proteinkinase Cα (PKCα). Der Strom durch den TRPC6-Kanal induziert eine Depolarisation (symbolisiert durch den gelben Blitz), die wiederum spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (Ca_v) aktiviert. Deren Leitfähigkeit wird darüberhinaus noch durch PKCα gesteigert. Die nun vermehrt zytosolisch vorhandenen Kalziumionen bilden mit Calmodulin einen Komplex ((Ca²⁺)₄CaM), der die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) aktiviert. Diese phosphoryliert nun vermehrt die regulatorische Kette des Myosin II (Myosin II LC₂₀) an Serin 19 (S19). Damit wird die Aktomyosininteraktion gesteigert, was zu einem gesteigerten Kontraktionszustand der glatten Muskelzelle und Konstriktion führt. Funktioneller Gegenspieler der MLCK ist die Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP), die eine Abspaltung des Phosphats vom phosphorylierte Serin 19 katalysiert. Dadurch wird der Kontraktionszustand der glatten Muskelzelle vermindert und es resultiert eine Dilatation. Abbildung modifiziert nach Cole & Welsh, 2011

Neben dem kalziumabhängigen Kontraktionsweg existiert im glatten Muskel ein kalziumunabhängiger Weg, der auf Abbildung 3 in einer Übersicht dargestellt ist. Er vermittelt eine gesteigerte Kalziumsensitivität, d.h. eine gesteigerte Kontraktilität bei gleicher [Ca²⁺]_i durch eine größere Phospho-MLC₂₀-Fraktion (Somlyo & Somlyo, 2003; Siehler, 2009). Auch dieser Mechanismus scheint eine gewichtige Rolle für den myogenen Tonus zu spielen. So führt Dehnung der Basilararterie zur vermehrten membranären Translokation von *ras homolog gene family, member A* (RhoA) (Yeon *et al.*, 2002), was mit einer Aktivierung des zur Kalziumsensitivierung führenden Signalweges gleichzusetzen ist (Gong *et al.*, 1997). In der Folge aktiviert RhoA die Rho-Kinase (ROK) (VanBavel *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002; Yeon *et al.*, 2002; Inscho *et al.*, 2009). Diese vermittelt die Phosphorylierung der MYPT1-Untereinheit (*myosin light chain phosphatase targeting subunit 1*) der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) an

T855, wodurch die MLCP gehemmt wird. Die Phospho-MYPT1-Fraktion ist dabei abhängig vom intraluminalen Druck. Die Aktivierung des Regulators CPI-17 (*protein-kinase-C-potentiated protein phosphatase 1 inhibitor protein*, Molekulargewicht 17 kDa) durch PKC, der wiederum eine Hemmung der MLCP-Untereinheit PP1c δ vermittelt, scheint für die MLCP-Hemmung im Zuge des myogenen Tonus nicht relevant zu sein (Johnson *et al.*, 2009). Gleichwohl ist die Aktivierung von PKC für den myogenen Tonus essentiell (siehe oben). Die vermehrte MLCP-Hemmung führt zu einer größeren Phospho-MLC₂₀-Fraktion, was die Konstriktion des Gefäßes kalziumunabhängig steigert.

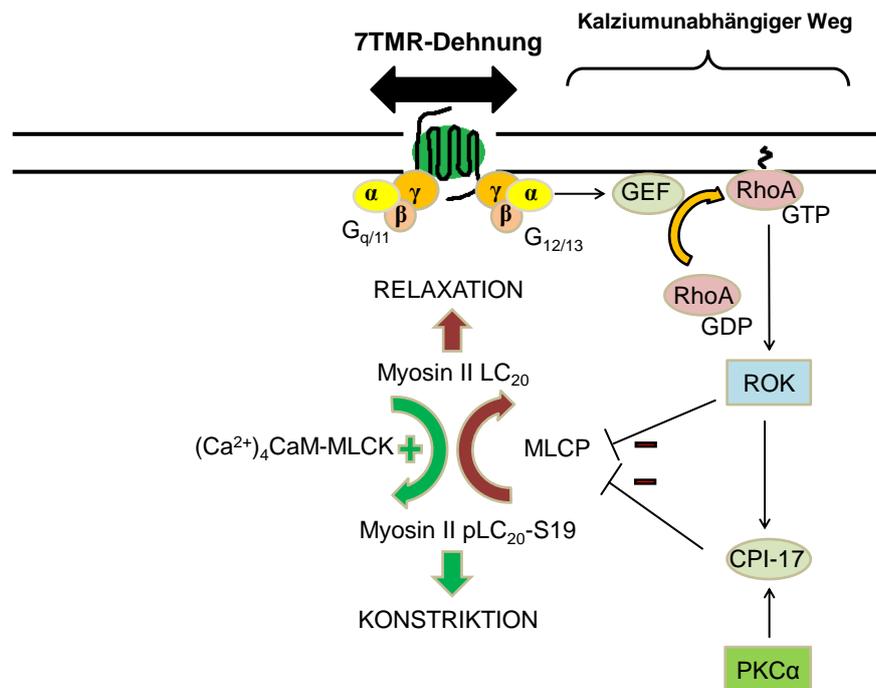


Abbildung 3: Der kalziumunabhängige Kontraktionsweg, initiiert durch ligandenunabhängige Aktivierung eines mechanosensitiven 7TMR. Dehnung eines mechanosensitiven 7TMR führt zur Aktivierung eines G_{12/13}-Proteins. Dessen α -Untereinheit tauscht GDP gegen GTP aus, dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Untereinheit und aktiviert einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF). Dieser induziert seinerseits den Austausch von RhoA-gebundenem GDP in GTP und damit die Aktivierung und Translokation von RhoA an die Membran. Aktiviertes RhoA aktiviert wiederum die Rho-Kinase (ROK). Diese kann direkt die Myosinleichtkettenphosphatase hemmen, aber auch indirekt über Aktivierung von dessen Inhibitor CPI-17. Dieser wiederum wird auch durch die PKC α aktiviert. Der kalziumunabhängige Kontraktionsweg führt also zu einem funktionellen Überwiegen der Myosinleichtkettenkinase (MLCK) und befördert damit die Konstriktion. Abbildung modifiziert nach Cole & Welsh, 2011

Der kalziumabhängige Weg konvergiert also auf MLCK, der kalziumunabhängige auf MLCP. Beide regulieren die Level an Phospho-MLC₂₀ und damit das Ausmaß an Aktomyosin-Interaktion.

Die Ausführungen sind dabei nicht erschöpfend. Wie in anderen differenziert regulierten physiologischen Prozessen (z.B. Hämostase) laufen auch bei der glattmuskulären Kontraktion antagonistische Prozesse parallel ab. Dies ermöglicht eine hohe Sensitivität auf externe Stimuli. Die relative Potenz eines Prozesses kann durch dessen Modulation schnell in einen Effekt umgesetzt werden. Konkret ist dies in den Systemen der MLCK und der MLCP realisiert. MLCK fördert die Kontraktion, MLCP hemmt diese. Da die beiden

Enzyme nicht in einem digitalen Zustand (on/off) sondern analog reguliert vorliegen, leuchtet ein, dass der momentane kontraktile Zustand einer Muskelzelle das Integral aller kontraktionsfördernden und -hemmenden Stimuli darstellt.

1.3 Ein gemeinsamer Mechanosensor für beide Kontraktionswege

Die myogene Kontraktion wird also über zwei vermutlich parallel ablaufende Signalkaskaden gesteuert. Diese Kaskaden sind stromabwärts gut erforscht. Welches stromaufwärts gelegene Element jedoch die jeweilige Kaskade auf Druckerhöhung initiiert, also als Sensor fungiert, ist noch nicht sicher geklärt. Auf dem kalziumabhängigen Weg ist das am weitesten proximal in der Kaskade stehende Ereignis mit Beteiligung am myogenen Tonus die Aktivierung eines G-Proteins. Auf dem kalziumunabhängigen Weg ist es die Aktivierung von RhoA.

In jüngster Zeit fanden sich vermehrt experimentelle Hinweise, die eine proximale Verbindung zwischen beiden Ereignissen erlauben: Verschiedene heptahelikale Transmembranrezeptoren (7TMR) erwiesen sich in diversen Ansätzen als mechanosensitiv (Zou *et al.*, 2004; Makino *et al.*, 2006; Chachisvilis *et al.*, 2006; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Abdul-Majeed & Nauli, 2011). Interessanterweise waren dies häufig 7TMR mit $G_{q/11}$ -Signaltransduktion, deren Aktivierung zu einer Konstriktion von glatten Muskelzellen führt. Für viele vasokonstriktorisch wirkende 7TMR ist eine Signaltransduktion sowohl über $G_{q/11}$ - als auch über $G_{12/13}$ -Proteine etabliert (Siehler, 2009). $G_{12/13}$ -Proteine wiederum vermitteln die Aktivierung von RhoA über p115-RhoGEF (Kristiansen, 2004). Die Hypothese von mechanosensitiven $G_{q/11}$ -koppelnden 7TMR erlaubt es folglich, G-Protein-Aktivierung und RhoA-Aktivierung, also kalziumabhängigen und kalziumunabhängigen Schenkel der myogenen Konstriktion, auf elegante Weise zu verknüpfen. Dies würde die derzeit noch disparat stehenden, am myogenen Tonus beteiligten Schritte zu einem ganzheitlichen Modell mit einem gemeinsamen Mechanosensor verknüpfen.

Auch würde eine therapeutische (siehe auch Kapitel 1.1) Aktivitätsmodulation sensorischer 7TMR eine attraktive Option darstellen, die, da sie weit proximal lokalisiert ist, andere physiologische Mechanismen zur Regulation der glattmuskulären Kontraktilität unbeeinträchtigt lässt.

1.4 Mechanosensitivität ist pharmakologisch hemmbar

Weitere experimentelle Befunde waren für die Konzeption der vorliegenden Arbeit entscheidend: Die Hemmung der Mechanosensitivität eines Rezeptors ist über spezifische Antagonisten oder inverse Agonisten möglich. Chachisvilis und Mitarbeiter konnten die mechanisch induzierte Konformationsänderung am Bradykinin- B_2 -Rezeptor durch den Antagonisten Icatibant (HOE 140) hemmen (Chachisvilis *et al.*, 2006). Auch Zou und Kollegen gelang es, die Mechanosensitivität des Angiotensin II- AT_1 -Rezeptors durch den inversen Agonisten Candesartan zu inhibieren (Zou *et al.*, 2004). Diese Arbeitsgruppe konnte ferner ein molekulares Modell zum Mechanismus liefern: Der AT_1 -Rezeptor liegt hiernach im Neutralzustand mit einer Basalaktivität vor. Je nach chemischer oder mechanischer Aktivierung kann er zwei unterschiedliche aktive Konformationen annehmen. Die Bindung von Candesartan induziert eine Konformation, die gegenüber dem Neutralzustand keine Aktivität mehr aufweist. Ferner wird dadurch auch

der Übergang in eine aktive Konformation, sei es durch chemische oder durch mechanische Stimulation, verhindert (Yasuda *et al.*, 2008; Akazawa *et al.*, 2009), siehe auch Kapitel 4.3.1.

Schließlich gelang es auch Mederos y Schnitzler und Mitarbeitern, Mechanosensitivität diverser 7TMR zu hemmen: Mechanosensitive M₅-Azetylcholinrezeptoren (Cholinozeptoren) wurden mit Atropin und Pirenzepin erfolgreich gehemmt, H₁-Histaminrezeptoren mit Diphenhydramin, ET_A-Endothelinrezeptoren mit Darusentan und AT₁-Angiotensin-II-Rezeptoren mit Losartan und Candesartan (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Eine Zusammenfassung der bisher hemmbaren, mechanosensitiven Rezeptoren und der pharmakologischen Klassifizierung der Hemmstoffe liefert Tabelle 2. Dabei fällt auf, dass sofern konstitutiv aktive Formen des Rezeptors untersucht wurden, fast ausschließlich inverse Agonisten als Hemmstoffe für Mechanosensitivität fungieren. Es wurden noch keine konstitutiv aktiven ET_A-Rezeptormutanten auf die Unterdrückung ihrer Basalaktivität durch Darusentan getestet.

7TMR	Hemmstoff	Hemmstoffklassifizierung	Referenz
B ₂ R	Icatibant	inverser Agonist*	Fathy <i>et al.</i> , 1999
AT ₁ R	Losartan/Candesartan	inverser Agonist	Parnot <i>et al.</i> , 2000; Zou <i>et al.</i> , 2004
M ₅ R	Atropin/Pirenzepin	inverser Agonist	Burstein <i>et al.</i> , 1997
H ₁ R	Diphenhydramin	inverser Agonist	Bakker <i>et al.</i> , 2001
ET _A R	Darusentan	bisher nur als Antagonist untersucht	Riechers <i>et al.</i> , 1996

Tabelle 2: Bisher bekannte mechanosensitive und pharmakologisch hemmbare 7TMR und ihre Hemmstoffe. B₂R = B₂-Bradykininrezeptor; AT₁R = AT₁-Angiotensinrezeptor; M₅R = M₅-Azetylcholinrezeptor; H₁R = H₁-Histaminrezeptor; ET_AR = ET_A-Endothelinrezeptor; *Icatibant wirkt je nach Aktivität des B₂-Rezeptors entweder als partieller Agonist (bei niedriger Rezeptoraktivität) oder als inverser Agonist (bei hoher Rezeptoraktivität)

In der vorliegenden Arbeit wird auf diesen Ergebnissen aufbauend versucht, durch Hemmung hochexprimierter 7TMR eine Reduktion des myogenen Tonus zu erreichen. Dafür werden Mesenterialarterien, die einen ausgeprägten myogenen Tonus zeigen, diversen Rezeptorantagonisten und inversen Rezeptoragonisten ausgesetzt. Eine mögliche Reduktion des myogenen Tonus wird über Arteriographie, d.h. über isobare Konstriktionsmessung erfasst.

Zuvor wird ermittelt, welche 7TMR in Gefäßen mit myogenem Tonus hochexprimiert sind. Als Maß hierfür dienen die intrazellulären RNA-Level des jeweiligen Rezeptors. Weiter wird untersucht, ob die jeweiligen RNA-Level sich in Gefäßen mit nur geringem myogenen Tonus (Leitungsgefäße) und Widerstandsgefäßen unterscheiden. Dieses Vorgehen folgt den Befunden von Mederos y Schnitzler und Mitarbeitern, die eine lineare positive Korrelation von Mechanosensitivität und Rezeptordichte zeigten (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Der Effekt der über Druckerhöhung aktivierten Einzelrezeptoren summiert sich also intrazellulär zur Antwort der glatten Muskelzelle. Dabei ist entscheidend, dass der Rezeptor in ausreichend hoher Anzahl vorliegt, um der glatten Muskelzelle Mechanosensitivität zu verleihen.

Rezeptoren, die sich anhand ihrer RNA-Level als mögliche Kandidaten für Mechanosensoren in Widerstandsgefäßen entpuppen, werden dann über die im folgenden Kapitel „Material und Methoden“ beschriebene Arteriographie untersucht.

1.5 Alternative Mechanosensoren

Die Literatur kennt zahlreiche postulierte Messwertnehmer, die die Wandspannung der glatten Muskelzellen registrieren und deren kontraktile Status entsprechend adaptieren sollen. In Tabelle 3 werden diejenigen Strukturen aufgelistet, deren Beteiligung - als Sensor oder in der Signalkaskade eng auf den Sensor folgendes Element - am myogenen Tonus (MT) belegt ist und die sich nicht in den schematischen Abläufen unter Abschnitt 1.2 eingeordnet finden. Ein Überblick zu einigen der erwähnten Strukturen findet sich ferner in Hill *et al.*, 2009 und Kauffenstein *et al.*, 2012.

Struktur	Beschreibung	Referenz
Integrine	Aktivierung von RhoA, Verstärkung des Kalziumeinstroms, Blockade durch Antikörper verringert MT	Davis <i>et al.</i> , 2001 Juliano, 2002 Martinez-Lemus <i>et al.</i> , 2005
Mikrotubuli	Inhibition der Mikrotubulipolymerisation verstärkt den MT; Assoziation an Integrine	Platts <i>et al.</i> , 1999 Davis <i>et al.</i> , 2001
Caveoline	Caveoline aktivieren RhoA; Caveolin-Aktivierung durch den Integrin-Signalweg; Caveolin-gendefiziente Mäuse zeigen verringerten MT	Dubroca <i>et al.</i> , 2007 Radel <i>et al.</i> , 2007
Tyrosinkinasen (MAPK)	MAPK-Aktivierung durch Drucksprung; Reduktion des MT durch Tyrosinkinasenhemmung; Assoziation mit Integrinen	Davis <i>et al.</i> , 2001 Murphy <i>et al.</i> , 2002 Spurrell <i>et al.</i> , 2003
NADPH-Oxidase	ROS-Generierung auf Druckerhöhung; Arteriolen sensitiver auf ROS als Arterien; Aktivierung durch Sphingosin-1-Phosphat; MT gehemmt bei dysfunktioneller NADPH-Oxidase	Nowicki <i>et al.</i> , 2001 Keller <i>et al.</i> , 2006 Lai <i>et al.</i> , 2011
Mechanosensitive Ionenkanäle	ENaC, ASIC2, BK _{Ca} (limitierend für MT, Aktivierung durch Integrine, Hemmung durch 20-HETE, ROS und PKC), TMEM16A	Jernigan & Drummond, 2005 VanLandingham <i>et al.</i> , 2009 Gannon <i>et al.</i> , 2008 Hill <i>et al.</i> , 2010 Brakemeier <i>et al.</i> , 2003 Bulley <i>et al.</i> , 2012
Zelluläre Phospholipiddoppelschicht	Änderung der biophysikalischen Eigenschaften der Membran durch Dehnung führt zu Konformationsänderung integraler Membranproteine	Gudi <i>et al.</i> , 1998a

Sphingosinkinase	Generierung von Sphingosin-1-Phosphat, Aktivierung des kalziumunabhängigen und des kalzi-umabhängigen Kontraktionsweges; MT reduziert bei Sphingosinkinase-defizienz	Bolz <i>et al.</i> , 2003 Schubert <i>et al.</i> , 2008
Phospholipase A ₂	Generierung von Arachidonsäure, Umwandlung in 20-HETE durch die ω -Hydroxylase, PKC-Aktivierung, Ca _v -Aktivierung, BK _{Ca} -Hemmung; Reduktion des MT durch Hemmung der 20-HETE-Bildung	Lehtonen & Kinnunen, 1995 Gebremedhin <i>et al.</i> , 2000 Harder <i>et al.</i> , 2011
ATP- und UTP-Freisetzung	Spezifische Inhibition von P ₂ Y ₆ -Rezeptoren reduziert MT; Nukleotidase-Defizienz erhöht MT	Koltsova <i>et al.</i> , 2009 Kauffenstein <i>et al.</i> , 2010

Tabelle 3: Aufgelistet sind alternative Mechanosensoren und Mediatoren für den myogenen Tonus aus der Literatur; MAPK = *mitogen activated protein kinase*; NADPH = Nikotinsäureamidadeninukleotidphosphat; ROS = *reactive oxygen species*; ENaC = *epithelial Na⁺ channel*; ASIC2 = *acid sensing (proton-gated) ion channel 2*; BK_{Ca} = *large ("big") conductance calcium-activated K⁺ channel*; 20-HETE = 20-Hydroxyeikosatetraensäure; TMEM16A = *transmembrane protein 16A*; ATP = Adenosintriphosphat; UTP = Uridintriphosphat

1.6 Zur Rolle des Endothels

Da der modulierende Einfluss des Endothels auf den Gefäßdurchmesser ein etabliertes Konzept ist, war es naheliegend auch über eine Endothelabhängigkeit des myogenen Tonus zu spekulieren und entsprechende Experimente durchzuführen.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind widersprüchlich (Harder, 1987; Katusic *et al.*, 1987; Rubanyi, 1988; Falcone *et al.*, 1991; Hwa & Bevan, 1986; Kuo *et al.*, 1990; MacPherson *et al.*, 1991; McCarron *et al.*, 1989; Anschütz & Schubert, 2005). Übersichtsarbeiten haben diesbezüglich versucht, die Widersprüche methodisch zu erklären (Bevan & Laher, 1991; Meininger & Davis, 1992). So hätten Studien, die eine Endothelabhängigkeit des myogenen Tonus postulieren vornehmlich auf unspezifische Methoden zur Endothelentfernung wie Detergenzienperfusion zurückgegriffen. Diese können auch die Integrität der glatten Muskelzellen beeinträchtigen. Arbeitsgruppen jedoch, die das Endothel vorsichtig mechanisch entfernten, schienen das Endothel selektiv auszuschalten bei erhaltener Funktion der glatten Muskelzellen (Meininger & Davis, 1992).

Die überwiegende Zahl an Arbeiten verneint eine Endothelabhängigkeit des myogenen Tonus (Hwa & Bevan, 1986; McCarron *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1990; Falcone *et al.*, 1991; MacPherson *et al.*, 1991;

Anschütz & Schubert, 2005). Diese Summenaussage umfasst verschiedene Spezies und verschiedene Gefäßgebiete. Somit scheint die eigentliche, für die Sensorik des myogenen Tonus kritische mechanosensitive Komponente nicht Teil der Endothelzellen zu sein. Bevan und Laher betonen jedoch ausdrücklich, dass eine zusätzliche modulierende Rolle des Endothels nicht ausgeschlossen ist (Bevan & Laher, 1991). Dies zeigt sich auch in der Studie von Scotland und Kollegen, die eine Beeinflussung des myogenen Tonus durch einen *endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor* postulieren (Scotland *et al.*, 2001).

In der Tat zeigen neuere Befunde, dass für die Dilatation auf Drucksenkung dem Endothel eine entscheidende Rolle zukommt. Dabei führen niedrigere intravaskuläre Druckverhältnisse (<50 mmHg) über Aktivierung von TRPV4-Kanälen zu einer Frequenzsteigerung spontan auftretender endothelialer intrazellulärer Kalziumkonzentrationsspitzen (sog. *sparklets*, Fünkchen). Diese Fünkchen aktivieren wiederum endotheliale IK_{Ca} (*intermediate conductance calcium-activated K^+ channel*, kalziumgesteuerter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit)-Kanäle. Da die Endothelzellen im Bereich der IK_{Ca} -Kanäle über *gap junctions* genannte Proteine mit glatten Muskelzellen verbunden sind, kann der Kaliumstrom auch auf die glatten Muskelzellen übergehen und dort eine Relaxation induzieren (Bagher *et al.*, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wird von einer sekundären Bedeutung des Endothels für den myogenen Tonus ausgegangen. Diese ist durch eine Modulation der Tonusamplitude gekennzeichnet - im Sinne einer Kontraktionshemmung durch das Endothel. Das zelluläre Element am Anfang der zur Vasokonstriktion führenden Signalkaskade ist jedoch die glatte Muskelzelle, weshalb sie in für den folgenden Teil der Arbeit in den Vordergrund rücken soll.

1.7 Zur Geschichte der untersuchten Rezeptoren

Nachfolgend soll ein kurzer Abriss zur Wissenschaftsgeschichte der in der vorliegenden Arbeit behandelten Rezeptoren gegeben werden. Dabei sollen vor allem Verwirrungen in der Nomenklatur, wie sie sich bei den Adrenorezeptoren im Lauf der Geschichte ergeben haben, skizziert werden und dem Leser hierzu eine Orientierungshilfe geboten werden.

1.7.1 Die Angiotensinrezeptoren

Erste Konzepte von distinkten Angiotensin II-Rezeptorpopulationen kamen durch heterogene Dissoziationsprofile für radioaktiv markiertes Angiotensin II zustande, was durch zwei unterschiedlich affine Bindungsstellen erklärbar war (McQueen *et al.*, 1984). Ferner zeigten sich für Membranpräparate verschiedener Organe unterschiedliche zelluläre Effekte durch Angiotensin II (Peach & Dostal, 1990). Unterschiedliche Affinitäten für die Liganden Losartan (DuP 753) und PD 123177 (EXP 655) waren letztlich maßgeblich für die Erstbeschreibung des AT_1 - und des AT_2 -Rezeptors (Chiu *et al.*, 1989). Klonierungsstudien zum murinen AT_1 -Rezeptor führten schließlich zur Identifizierung zweier distinkter Subtypen (Sasamura *et al.*, 1992). Diese Subtypisierung ist derzeit ausschließlich bei Rodentia wie Mäusen und Ratten beschrieben; der Mensch hat nur einen AT_1 -Rezeptor. Mit der Klonierung des AT_2 wurde der letzte der bisher bekannten Angiotensin-Rezeptoren auch auf chromosomaler Basis bestätigt (Kambayashi *et al.*, 1993). Für die beiden AT_1 -Subtypen konnte festgestellt werden, dass sie sich der gleichen

intrazellulären Signalkaskade bedienen (Zhou *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1995; Tian *et al.*, 1996). Derzeit herrscht überwiegend der Konsens, dass beide AT₁-Subtypen nicht pharmakologisch differenziert werden können (Chiu *et al.*, 1993; Saavedra, 1999). Allerdings existieren Arbeiten, die für den AT_{1A} eine höhere Affinität zu Losartan postulieren und für AT_{1B} eine relative Selektivität für höhere Konzentrationen von PD 123319, das eigentlich einen Antagonisten an AT₂-Rezeptoren darstellt (Guimaraes & Pinheiro, 2005).

1.7.2 Die Endothelinrezeptoren

Die Einsicht, dass wenigstens zwei Endothelinrezeptoren existieren müssen, kam durch eine biphasische Blutdruckantwort (initial kurzzeitiger Blutdruckabfall, dann -anstieg) auf Endothelin-1 (ET-1)-Injektion an Ratten zustande (Yanagisawa *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1989). Auch unterschiedliche Effekte endogener Liganden (ET-1 bis ET-3) förderten die Hypothese von Endothelinrezeptorsubtypen. Endothelinrezeptoren gliedern sich in ET_A und ET_B (Arai *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990). Erstere sind vor allem auf glatten Muskelzellen der Gefäße lokalisiert, letztere sowohl auf glatten Muskelzellen als auch auf Endothelzellen (Schneider *et al.*, 2007). ET_A-Rezeptor-RNA findet sich ubiquitär (Regard *et al.*, 2008), d.h. allen Geweben des murinen Organismus. Die Autoren führen dies auf die Präsenz von Gefäßen in nahezu allen untersuchten Gewebetypen zurück. Gegenwärtig herrscht der Konsens, dass ET_A-Stimulation Konstriktion vermittelt; dahingegen bewirkt ET_B-Stimulation Dilatation, wenn sich der Rezeptor auf Endothelzellen befindet, Konstriktion wenn er sich auf glatten Muskelzellen befindet (Schneider *et al.*, 2007). Für den ET_B wird darüber hinaus vermutet, dass er an der Entfernung von zirkulierendem ET-1 aus dem Kreislauf beteiligt ist, sog. Endothelin-*Clearance* (Fukuroda *et al.*, 1994). Der Grund, warum gerade dieser Rezeptorsubtyp diese Funktion erfüllen sollte, könnte seine höhere Expression sein (Schneider *et al.*, 2007).

1.7.3 Die Vasopressinrezeptoren

Die zellulären Effekte von Arginin-Vasopressin werden über Vasopressinrezeptoren vermittelt. Diese wurden primär in hepatische, bzw. vaskuläre V₁- und renale V₂-Rezeptoren (Michell *et al.*, 1979; Briley *et al.*, 1994; Hirasawa *et al.*, 1994a) gegliedert, basierend auf den nachgeschalteten Signalkaskaden (Briley *et al.*, 1994). Um der von der hepatischen V₁-Pharmakologie abweichenden Bindungscharakteristik des Hypophysenvorderlappens Rechnung zu tragen, wurde in Abgrenzung zum hepatischen/vaskulären V_{1A} der V_{1B} eingeführt (Jard *et al.*, 1986; Thibonnier, 1992). Kurz nacheinander wurden die erfolgreichen Klonierungen des V_{1A} und des V₂ publiziert (Morel *et al.*, 1992; Lolait *et al.*, 1992), zwei Jahre später auch die des V_{1B} (Sugimoto *et al.*, 1994), ehemals auch hypophysärer V₃ (Holmes *et al.*, 2003) genannt. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf den V_{1A}, da nur für ihn, im Gegensatz zum V_{1B}, das Vorkommen auf glatten Muskelzellen beschrieben ist. Ferner ist auch die nachgeschaltete Signalkaskade, im Gegensatz zu der des V₂ (Maybauer *et al.*, 2008), mit den Beobachtungen zum myogenen Tonus vereinbar: U. a. Aktivierung der G_{q/11}-Signalkaskade mit nachfolgender intrazellulärer IP₃- und Ca²⁺-Akkumulierung (Briley *et al.*, 1994) und letztlich glattemuskulärer Kontraktion.

1.7.4 Die alpha-Adrenozeptoren

Der Leser sei für eine vollumfassende Darstellung der komplizierten Geschichte der Adrenozeptoren an andere Stellen verwiesen (Bylund *et al.*, 1994; Docherty, 1998; Langer, 1999).

Das derzeit gültige Konzept der Unterteilung von Adrenozeptoren in alpha- und beta-Adrenozeptoren geht auf die Arbeit von Ahlquist 1948 zurück. Für die Unterteilung maßgeblich war die Beobachtung, dass die Potenz verschiedener Sympathomimetika je nach Effekt am betrachteten Organ variiert. Der entscheidende Schluss war, dass dies auf unterschiedliche Rezeptoren am Zielorgan zurückzuführen sein müsse (Ahlquist, 1948).

Die α -Adrenozeptoren wurden zunächst in α_1 und α_2 unterteilt (Langer, 1974).

Die alpha-1-Adrenozeptoren wurden 1986 wiederum unterteilt (Morrow & Creese, 1986), wobei die initiale pharmakologische Unterscheidung nur α_{1A} und α_{1B} differenzieren konnte. Als zunehmend molekularbiologische Methoden zur Rezeptorcharakterisierung angewandt wurden, konnten zunächst vier α_1 -Subtypen kloniert werden, α_{1b} , α_{1c} , α_{1a} und α_{1d} , in der genannten Reihenfolge (Cotecchia *et al.*, 1988; Schwinn *et al.*, 1990; Lomasney *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1991). Wenig später wurde jedoch klar, dass der klonierte α_{1c} -Adrenozeptor identisch war mit dem pharmakologisch charakterisierten α_{1A} , der klonierte α_{1a} identisch mit dem ebenfalls klonierten α_{1D} . Konsequenterweise wurde der ursprüngliche α_{1a} in der Nomenklatur gestrichen. Dem pharmakologischen Korrelat des α_{1A} wurde stattdessen die genetische Sequenz des vormaligen α_{1c} zugeordnet. Die jetzige Situation, in der ein α_{1C} in der Reihe der Adrenozeptoren (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) zu fehlen scheint, ist wahrscheinlich durch methodische Unterschiede der Originalcharakterisierungen bedingt. Die Entwicklung der Nomenklatur findet sich in Tabelle 4 aufgelistet.

Pharmakologische Entitäten bis 1990	Bezeichnung der Genprodukte bis 1995	Aktueller Name
α_{1A}	α_{1c}	α_{1A}
α_{1B}	α_{1b}	α_{1B}
	α_{1a} ($\equiv \alpha_{1D}$)	(weggefallen)
	α_{1d}	α_{1D}

Tabelle 4: Die Nomenklatur der α_1 -Adrenozeptoren im Wandel der Zeiten. Ein α_{1C} -Rezeptor wurde aus der Nomenklatur im Zuge einer Bereinigung von Genprodukten und pharmakologischen Entitäten gestrichen.

Darüber hinaus wird diskutiert, ob ein α_{1L} existiert, der sich gegenüber den anderen Subtypen durch seine niedrige (engl. *low*) Affinität zu Prazosin auszeichnet. Hierzu fehlt jedoch bisher ein eigenständiges Gen (Hieble *et al.*, 1995).

Alpha-2-Adrenozeptoren werden seit 1981 unterteilt (Bylund, 1985). Die entsprechenden Gene wurden für α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} identifiziert (Kobilka *et al.*, 1987; Regan *et al.*, 1988; Lomasney *et al.*, 1990). Die Nomenklatur richtete sich dabei zunächst nach den menschlichen Chromosomen, auf denen die Gene gefunden wurden. Die Gegenüberstellung der alten und aktuellen Bezeichnungen findet sich in Tabelle 5 auf der nächsten Seite.

Historischer Name	Aktueller Name
α_2 -C10	α_{2A}
α_2 -C2	α_{2B}
α_2 -C4	α_{2C}

Tabelle 5: Alte und neue Nomenklatur der α_2 -Adrenozeptoren

Ein zuvor über ein divergentes Ligandenbindungsprofil postulierter α_{2D} (Lanier *et al.*, 1991) scheint eine Variante des humanen α_{2A} darzustellen, der bei einigen Modellorganismen wie Ratten gefunden wird (Harrison *et al.*, 1991).

α_2 -Adrenozeptoren vermitteln die präsynaptische Autoinhibition der Noradrenalinfreisetzung aus Nervenendigungen des Sympathikus. Experimente an α_2 -Adrenozeptor-gendefizienten Mäusen (*knockout*-Mäuse) und axonalen Membranfraktionen ergaben, dass hierfür α_{2A} und α_{2C} relevant sind (Daniel *et al.*, 1995; Hein *et al.*, 1999). Auch an isolierten Gefäßen sind entsprechende Nervenendigungen noch vorhanden. Der Nachweis von α_{2A} und α_{2C} in isolierten Gefäßen kann also auch auf Nervenendigungen zurückgeführt werden (Rump *et al.*, 1991).

α_2 -Adrenozeptoren wurden bisher auf folgenden Zelltypen im Gefäß lokalisiert:

1. Endothelzellen: α_{2A} -Stimulation auf Endothelzellen zieht eine NO-abhängige Dilatation nach sich (Wong *et al.*, 2010)
2. glatten Muskelzellen: α_{2B} -Gendefizienz verhindert einen Blutdruckanstieg auf unselektive α_2 -Stimulation (Link *et al.*, 1996)
3. Nervenendigungen: Stimulation von α_{2A} und α_{2C} führt zu einer verringerten Noradrenalinfreisetzung aus Nervenendigungen des Sympathikus (Daniel *et al.*, 1995; Molderings & Göthert, 1995; Hein *et al.*, 1999).

Damit können PCR-Signale, die aus der Gesamt-RNA eines Gefäßes amplifiziert wurden, prinzipiell von drei verschiedenen Zelltypen stammen. Dies verkompliziert die Auswertung von α_2 -Adrenozeptorexpressionsdaten aus ganzen Gefäßen deutlich.

Anders als bei α_1 -Adrenozeptoren findet die Signaltransduktion von α_2 -Adrenozeptoren vor allem *via* $G_{i/o}$ -Proteine statt (Fain & García-Sáinz, 1980; Jones *et al.*, 1991). Auch für Rezeptoren mit $G_{i/o}$ -Signaltransduktion ist mittlerweile mit dem FPR₁-Formylpeptid-Rezeptor ein mechanosensitiver Vertreter beschrieben worden (Makino *et al.*, 2006). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit den α_2 -Adrenozeptoren eine weitere Familie gleichartig koppelnder 7TMR auf ihr Expressionsniveau in Leitungs- und Widerstandsgefäßen untersucht.

1.7.5 Die beta-Adrenozeptoren

Die beta-Adrenozeptoren waren die ersten, bei denen eine Unterteilung vorgenommen wurde, nämlich in β_1 und β_2 (Lands *et al.*, 1967); ein dritter beta-Adrenozeptor kam knapp 20 Jahre später hinzu (Arch *et al.*, 1984). Kurz darauf folgte auch die Identifizierung der korrespondierenden Gene (Dixon

et al., 1986; Frielle *et al.*, 1987; Emorine *et al.*, 1989). Die Signaltransduktion der Beta-Adrenozeptoren findet über G_s-Proteine statt (Bylund *et al.*, 1994). Auch für G_s-koppelnde 7TMR sind mittlerweile mechanosensitive Eigenschaften beschrieben; so z.B. für den D₅-Dopaminrezeptor (Abdul-Majeed & Nauli, 2011) und den PTH₁-Parathormonrezeptor (Zhang *et al.*, 2009). Auf dieser Basis wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem β_2 -Adrenozeptor ein weiterer Rezeptor mit G_s-Signaltransduktion auf sein Expressionslevel in kleinen und großen Arterien untersucht. Entsprechende Hinweise im Sinne eines zahlreicheren Vorkommens in kleinen Gefäßen sollten dann unter Umständen Anlass zu weitergehenden Untersuchungen geben.

1.8 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit putativen vaskulären Mechanosensoren im Kontext des BAYLISS-Effekts. Dabei werden als mögliche Mechanosensoren heptahelikale Transmembranrezeptoren fokussiert (Zou *et al.*, 2004; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008; Akazawa *et al.*, 2009; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2011; Storch *et al.*, 2012). Es ist ferner bekannt, dass die vaskulären RNA-Level eines Rezeptors gut mit den jeweiligen Rezeptoreffekten korrelieren (Hosoda *et al.*, 2005).

In diesem Zusammenhang sollen folgende Aufgaben bearbeitet werden:

1. Quantifizierung des Expressionsniveaus von putativ mechanosensitiven heptahelikalen Transmembranrezeptoren (7TMR) über deren RNA-Level in verschiedenen Gefäßbetten.
2. Evaluation spezifischer Hemmstoffe für hochexprimierte putativ mechanosensitive 7TMR auf ihre Fähigkeit zur Hemmung des myogenen Tonus.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Substanz	Hersteller	Artikelnummer
CaCl ₂ * 2H ₂ O	Sigma-Aldrich	C5080
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich	G7528
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Sigma-Aldrich	494429
EDTA (Ethylen-Diamin-Tetraazetat, Tritriplex III)	Merck	8418
KCl	Carl Roth	6781.1
KH ₂ PO ₄	Merck	4873
MgSO ₄ * 7H ₂ O	Sigma-Aldrich	M5921
NaCl	Carl Roth	9265.1
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich	S6014

2.1.2 Reagenzien und Reaktionskits

Substanz	Hersteller	Artikelnummer
6x Orange DNA Loading Dye (Auftragspuffer für Gelelektrophorese)	Fermentas	R0611
Agarose NEEO Ultra	Carl Roth	2267.3
Chloroform	Sigma-Aldrich	C2432
Essigsäure 99,8 %	Riedel-de-Haën	33209
Ethanol	Merck	1.00983.1000
Ethidiumbromid	Carl Roth	2218.3
Isopropanol	Sigma-Aldrich	59300
Nukleasefreies Wasser	Fermentas	R0582
O'GeneRuler Low Range DNA Ladder (DNA-Größenleiter)	Fermentas	SM1203
TRI-Reagent (Phenol, Guanidiniumisothiozyanat)	Sigma-Aldrich	T9424
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck	8382
Reaktionskit	Hersteller	Artikelnummer
Absolute QPCR Sybr Green Mix (DNA-Polymerase, Sybr-Green I, dNTPs, Puffer)	Thermo Fisher	AB-1158/B
DNase I	Fermentas	EN0521
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Reverse Transkription)	Fermentas	K1632

2.1.3 Pharmaka

Substanz	Hersteller	Artikelnummer	Lösungs- mittel	Konzentration Stammlösung	End- konzentration
BQ-123	Merck/Calbiochem	05-23-3831	Wasser	10 mM	1 μ M
Candesartan	AstraZeneca	Direkt vom Hersteller Astra-Zeneca; LOT-Nr. HB 562	DMSO	10 mM	1 μ M
Losartan	Merck	Direkt vom Hersteller Merck; LOT-Nr. MLN-206	Wasser	10 mM	10 μ M
Prazosin	Sigma-Aldrich	P7791	Wasser	10 mM	1 μ M
Relcovaptan (SR 49059)	Tocris	2310	DMSO	200 μ M	20 nM

Für die Stammlösung wurden BQ-123, Losartan und Prazosin in Wasser gelöst, Candesartan und Relcovaptan in DMSO.

Nach der Lösung wurden die Pharmaka aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. Für jeden Versuch wurde ein neues Aliquot aufgetaut. Die Aliquots waren dabei so konzentriert, dass für das Lösungsmittels DMSO eine Endkonzentration von 0,01 % nicht überschritten wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

Die verwendeten Mäuse waren alle vom Stamm FVB/N (Charles River Laboratories, Sulzfeld). Es wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht, um nicht zyklusabhängige Schwankungen in den Plasmakonzentrationen von vasoaktiven Sexualsteroiden berücksichtigen zu müssen. Das Alter der Tiere war $13,7 \pm 0,5$ Wochen (Mittelwert \pm SEM, $n=39$), das Gewicht $29,3 \pm 0,4$ Gramm.

2.2.2 Gewebemikrodissektion für RNA-Isolierung oder Arteriographie

2.2.2.1 Gehirnarterien und Arachnoidea mater (Spinnwebhaut) Die zu untersuchende Maus wurde mittels zervikaler Dislokation getötet und dekapitiert. Nun wurde die Kopfhaut entlang der Medianlinie dorsal aufgeschnitten, sodass der Blick auf die Kalotte freigegeben war. Anschließend wurde eine Schere mit ihrer Spitze in das Foramen magnum eingeführt und die Schädelhöhle entlang der Ränder der Ossa occipitalia, parietalia und frontalia beidseits bis auf Orbitahöhe eröffnet. Nach Durchtrennung der Ossa nasales konnte der Kalottendeckel vom Gehirn gehoben werden. Es erfolgte die Durchtrennung des Lobus olfactorius, des N. opticus und des N. trigeminus sodass sich das Gehirn in ein bereitgestelltes, verschließbares Gefäß mit Pufferlösung (PSS, begast mit Carbogen auf einen pH von 7,4, Temperatur $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) überführen ließ. Das Gefäß wurde auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurde eine Petrischale, deren Boden mit einem Silikonpolymer (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning, Wiesbaden) ausgegossen war, auf Eis gestellt und mit der gleichen Pufferlösung gefüllt. Das Gehirn wurde mit seiner Basis nach obenweisend mit Stechkanülen auf der Petrischale festgesteckt. Schließlich konnten die relevanten Arterien (A. cerebri anterior, A. cerebri media, A. cerebri posterior, A. superior cerebellaris) unter einem Binokularmikroskop mit Kaltlichtquelle (SteREO Discovery.V8, Carl Zeiss, Jena) disseziert werden. Der Arbeitsabstand betrug 10 cm. Zur Dissektion wurden mikrochirurgische Pinzetten (Dumont #55 Forceps, #5 Forceps - Inox Biologie, Fine Science Tools, Heidelberg) und eine Schere mit einer effektiven Schneide von 3 mm verwendet (Vannas Spring Scissors, Fine Science Tools, Heidelberg). Für die Befreiung des Gefäßes von Arachnoidea mater wurde das zu entfernende Gewebe durch einen vom Gefäß weg gerichteten Zugvektor unter Spannung gebracht, was die saubere Durchtrennung der an der Gefäßwand ansetzenden Struktur ermöglichte. Die Arachnoidea wurde im selben Schritt wie die Gehirnarterien isoliert und als Kontrollgewebe in der qPCR analysiert. Zur Entnahme wurde auf möglichst große, zusammenhängende Stücke geachtet. Gehirnarterien und Arachnoidea wurden schließlich in TRI-Reagens gegeben und wie unter 2.2.3 beschrieben prozessiert. TRI-Reagens ist ein kommerziell erhältliches Reagens zur RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi (1987), das unter anderem Phenol und Guanidiniumisothiozyanat enthält.

2.2.2.2 A. carotis und Pulmonalarterien Nach zervikaler Dislokation und Dekapitation wurde das Herz-Lungenpaket der Maus entnommen. Dieses wurde mittels Stechkanülen an der Trachea, an den Lungenflügeln und an der Herzspitze am Boden der Präparierschale befestigt. Nach Identifizierung der Aorta wurden am Hals die Carotiden aufgesucht, von Bindegewebe freipräpariert und in TRI-Reagens gegeben. Das gleiche initiale Organpaket diente auch zur Grundlage der Pulmonalarterienisolierung. Hier

wurden der rechte Vorhof und die Aorta am Präparat entfernt, um bessere Sicht auf die Pulmonalarterien zu haben. Diese wurden dann vom sie umgebenden Bindegewebe befreit und in TRI-Reagens gegeben.

2.2.2.3 Mesenterialarterien und A. mesenterica superior Nach zervikaler Dislokation und Dekapitation wurde eine c-förmige Laparotomie durchgeführt und die Bauchdecke nach lateral geklappt. Das Rektum wurde aufgesucht, identifiziert und distal durchtrennt. Nun konnte die Ansatzstelle des Mesenteriums durch Zug am Rektumstumpf dargestellt werden. Der Mesenterialansatz wurde folgend bis zum Duodenum durch Zug an der jeweils noch adhärenen Darmstruktur dargestellt und das Mesenterium dann scharf am Darm abgesetzt. Schließlich konnte das Mesenterium nach Durchtrennung der A. mesenterica superior entnommen werden. Im Anschluss wurde das Mesenterium auf einer Petrischale befestigt. Die Befestigung erfolgte an der A. mesenterica superior und am Fettgewebe der terminalen Verzweigungen, sodass das Mesenterium aufgespreizt dargestellt war. Im Folgenden wurden dritt- oder höhergradige Verzweigungen der A. mesenterica superior vom umgebenden Fettgewebe befreit. Die isolierten Gefäße wurden nun entweder in TRI-Reagens gegeben oder für die Arteriographie verwendet. Anschließend wurde die A. mesenterica superior ohne ihre abgehenden Äste freipräpariert und in TRI-Reagens gegeben.

Die Verhältnisse vor und nach der Dissektion zeigt Abbildung 4.

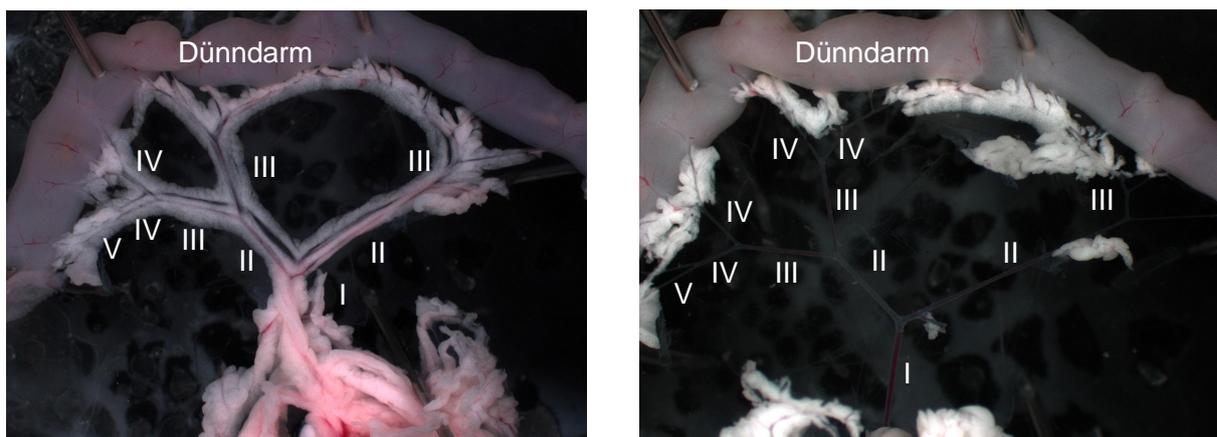


Abbildung 4: Mesenterialarterien vor (links) und nach Entfernung (rechts) des mesenterialen Fettgewebes. Dabei sind Mesenterialarterien von der ersten (I) bis zur fünften Ordnung (V) dargestellt. Zur Veranschaulichung der anatomischen Verhältnisse wurde der Dünndarm, anders als im Routinevorgehen, an den Arterien belassen.

2.2.2.4 A. renalis, Aorta abdominalis und Fettgewebe Nach zervikaler Dislokation und Dekapitation wurde eine c-förmige Laparotomie durchgeführt und die Bauchdecke nach lateral geklappt. Die Nieren wurden aufgesucht und gemeinsam mit der Bauchaorta herausgetrennt. Die Bauchaorta wurde distal der iliakalen Bifurkation und proximal unterhalb der A. mesenterica superior durchtrennt. Das Organpaket wurde an beiden Enden der Aorta sowie an den Nieren befestigt. Die Gefäße wurden sauber disseziert und in TRI-Reagens gegeben. Abdominales Fettgewebe wurde aus dem selben Organpaket wie die Nierenarterien und die Bauchaorta isoliert. Dabei wurde auf zusammenhängende größere Stücke geachtet.

2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA

Die unter 2.2.1. beschriebenen Organe in 400 µl TRI-Reagens wurden mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (TissueRuptor, Qiagen, Hilden) disruptiert und homogenisiert. Die Disruption und Homogenisierung erfolgte mit Einmalartikeln, um Kontamination zu verhindern. Die hierauf folgenden Arbeitsschritte stellen im Wesentlichen eine adaptierte Version des originalen Protokolls von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987) dar:

1. Addition von 600 µl TRI-Reagens
2. 5 Minuten Ruhe bei Raumtemperatur für die Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe
3. Addition von 200 µl Chloroform (Volumenverhältnis 1:5 zu TRI-Reagens)
4. 15 Sekunden Schütteln
5. Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000 g und 4 °C
6. Überführen der obersten, wässrigen Phase in ein frisches Reaktionsgefäß
7. Addition von 500 µl Isopropanol (Volumenverhältnis 1:2 zu TRI-Reagens)
8. 10 Minuten Ruhe bei Raumtemperatur
9. Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 g und 4 °C
10. Abpipettieren des Überstandes
11. Lösen des Pellets in 1 ml 75% (v/v) Ethanol (Volumenverhältnis 1:1 zu TRI-Reagens)
12. Zentrifugation für 5 Minuten bei 7500 g und 4 °C
13. Zweimaliges Wiederholen der drei letzten Schritte
14. Nach Abpipettieren des Überstandes Trocknung der RNA für 5 Minuten bei Raumtemperatur, Evaporation des Ethanols
15. Addition von 50 µl nukleasefreiem Wasser
16. Erhitzen der RNA für 15 Minuten auf 65 °C in einem Thermoblock (Pepqlab, Erlangen)

2.2.4 cDNA-Synthese und quantitative PCR

2.2.4.1 Grundlagen der qPCR

Die quantitative PCR (qPCR) stellt eine Modifikation der klassischen PCR-Reaktion nach Mullis dar (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986). Dabei wird in Echtzeit das Entstehen der PCR-Produkte beobachtet. Je mehr DNA im Ansatz, desto früher erscheinen PCR-Produkte in der Reaktion.

Die quantitative PCR wurde mit Hilfe eines LightCycler 480-Systems (Roche-Applied-Science, Mannheim) durchgeführt. Dieses basiert auf der Registrierung von Fluoreszenzemission durch Sybr Green I, die wiederum proportional zur Anzahl der doppelsträngigen DNA-Moleküle im Reaktionsansatz ist.

Hierzu wird eine Ratio aus der Fluoreszenz bei Emissionswellenlänge 510 nm und der Anregungswellenlänge bei 465 nm gebildet.

Die in den PCR-Zyklen entstehenden Produkte akkumulieren, die entstehende sigmoidale Fluoreszenzkurve erreicht ein Maximum in ihrer Steigungszunahme, d.h. ihre zweite Ableitung hat ein lokales Maximum (*2nd derivative maximum*-Methode). Man kann zu diesem Zeitpunkt von der log-linearen Phase der Reaktion sprechen. Der angesprochene Zeitpunkt wird entsprechend der aktuellen PCR-Zyklusnummer in einen CP-Wert (*cycle point*) transformiert. Diese Detektionsmethode basiert auf der Annahme, dass die Form der Amplifikationskurve einen besseren Hinweis auf die vorhandene DNA-Konzentration gewährt als die Fluoreszenz des PCR-Ansatzes. Nichtsdestotrotz wird jedem Ansatz zum gleichen CP-Punkt eine gleiche DNA-Menge unterstellt (s.u.) (zitiert nach: LightCycler 480 Instrument Operator's Manual, Version 3.0, 2008, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg). Je nach Ausgangsmenge der DNA im PCR-Ansatz ist der Betrag des CP-Wertes größer (geringere Ausgangsmenge) oder kleiner (höhere Ausgangsmenge). Für eine vergleichende Darstellung von relativen Konzentrationsunterschieden in mehreren Amplifikationskurven siehe auch Abbildung 6.

Die mathematische Grundlage jeder PCR-Reaktion ist eine einfache Exponentialfunktion

$$N(\text{CP}) = N_0 \cdot E^{\text{CP}} \quad (1)$$

wobei

$N(\text{CP})$ = Anzahl der DNA-Doppelstrangmoleküle zum CP-Zeitpunkt

N_0 = DNA-Ausgangsmenge

E = Effizienz der PCR-Reaktion

E errechnet sich zu:

$$E = 10^{\frac{-1}{a}} \quad (2)$$

wobei

a = Steigung der Standardkurve ($\frac{\partial \text{CP}}{\partial \log \text{Konzentration}}$)

Da davon ausgegangen werden kann, dass $N(\text{CP}) = 10^{11}$ bis 10^{12} Moleküle, also konstant, kann man nach N_0 auflösen und die Ausgangsmenge von GOI (*gene of interest*, im Fokus stehendes Gen) und

Referenz ins Verhältnis setzen:

$$\frac{N_0(\text{GOI})}{N_0(\text{Referenz})} = \frac{E_{\text{Referenz}}^{\text{CP(Referenz)}}}{E_{\text{GOI}}^{\text{CP(GOI)}}} \quad (3)$$

2.2.4.2 Fehlerquellen Im Folgenden sind mögliche Fehlerquellen im Durchführen einer qPCR-Reaktion aufgelistet. Beschrieben werden ferner die Maßnahmen, die getroffen wurden, um die Fehler zu minimieren.

Kontamination der RNA mit genomischer DNA Um falsch-positive Resultate durch eine Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurde zunächst versucht, intronüberspannende Primerkombinationen zu generieren. Da aber für die Quantifizierung mehrerer interessierender mRNAs eine intronüberspannende Primerkombination nicht möglich war, wurden alle RNA-Isolate mit einer DNase (DNase I, Fermentas, St.Leon-Rot) behandelt. Dies geschah, um genomische Kontamination und somit falsch-positive Resultate zu vermeiden. Dabei wurde im Wesentlichen dem Protokoll des Herstellers Folge geleistet, eine Ausnahme stellt die finale Inaktivierung der DNase dar: Diese wurde durch 30-minütige Inkubation bei 65 °C gewährleistet. Die Adaptation erfolgte, um nicht den EDTA-haltigen Inaktivierungspuffer verwenden zu müssen, für den Interferenzen mit der nachgeschalteten PCR-Reaktion befürchtet wurden.

Für jede RNA-Umschreibung in cDNA wurden RNA-Proben nach der DNase-Behandlung und vor der Umschreibung in cDNA asserviert und ebenfalls einer PCR-Reaktion unterzogen. Hierbei fanden Primer Verwendung, die kein Intron überspannten. Dieser Schritt sollte gewährleisten, dass die DNase alle genomische Kontamination zu beseitigen imstande war. Es entstand zu keiner Zeit ein spezifisches Produkt, was als hinreichende Beseitigung jeglicher Kontamination gewertet wurde.

Um die für die PCR-Reaktion essentielle cDNA zu gewinnen wurde ebenfalls ein kommerziell erhältliches Set verwendet (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, St.Leon-Rot). Die Umschreibung wurde nach Protokoll vorgenommen. Um Kontaminationen der reverse-Transkriptase-Reaktion zu erkennen, wurden Transkriptionen auch ohne RNA-Template durchgeführt und einer PCR unterzogen (sog. RT(-)-Kontrolle).

Bindung der Primer an SNP-Stellen oder Generierung mehrerer Produkte Die PCR-Primer wurden unter Zuhilfenahme der UniversalProbe Library (Roche Applied-Science, Mannheim) auf Basis der murinen mRNA-Sequenzen erstellt.

Anschließend wurden die Primer mit Hilfe einer PCR *in silico* auf der Seite des UCSC-Genome-Browsers (Center for Biomolecular Science & Engineering, University of California, Santa Cruz, CA, USA) auf SNPs (*single nucleotide polymorphisms*, Einzelnukleotid-Polymorphismen) in ihren Bindungsregionen evaluiert. Ferner wurden die Primer dahingehend selektiert, dass unter Berücksichtigung des sequenzierten Mausgenoms nur ein PCR-Produkt entstand.

Tabelle 6 listet die Primer (Metabion, Martinsried) auf, die letztlich ausgewählt wurden.

Genprodukt	Kennung	linker Primer	rechter Primer	Amplikongröße [bp]
Endothelinrezeptor A	Ednra	tgtgagcaagaaattcaaaaattg	atgaggcttttgactgggtg	72
Endothelinrezeptor B	Ednrb	cggtatgcagattgctttga	aacagagagcaaacacgagga	92
Angiotensin II-Rezeptor 1A	Agtr1a	actcacagcaacctccaag	ctcagacactgttcaaatgcac	62
Angiotensin II-Rezeptor 1B	Agtr1b	cagtttcaacctctacgccagt	gggtggacaatggctagta	75
Arginin-Vasopressinrezeptor 1A	Avpr1a	gggataccaatttcgtttg	aagccagtaacgccgtgat	66
Adrenozeptor α_{1A}	Adra1a	ctgaaggtccgcttctct	gccctggagcttcgttat	68
Adrenozeptor α_{1B}	Adra1b	ttcttcacgctctccact	gggttgaggcagctgttg	107
Adrenozeptor α_{1D}	Adra1d	ttttctctgctcctct	agcgggttcacacagctatt	110
Adrenozeptor α_{2A}	Adra2a	tagaactgactttctccgttctc	aacatacacgctcttctcaagc	60
Adrenozeptor α_{2B}	Adra2b	gctgcccttgaactcaciaa	cagccagcagatggttaciaa	113
Adrenozeptor β_2	Adrb2	gaagattccacgcccaciaa	cttgaggaccttcggagt	77
Glattmuskuläres α -Aktin	Acta2	gacaccaccaccagagt	acatagctggagcagctct	73
Hypoxanthin-Phosphoribosyl- transferase 1	Hprt1	tctctcagaccgctttt	cctggttcacatcgctaatac	90
Tyrosin 3-Monooxygenase, Tryptophan 5-Monooxygenase activation Protein, Zeta polypeptid	Ywhaz	taaaaggtctaaggccgcttc	caccacacgcacgatgac	60
Succinat-Dehydrogenase- komplex, Untereinheit A	Sdha	ccctgagcattgcagaatc	tcttctccagcatttcctta	70
β -Aktin	Actb	ggatgcagaaggagattactgc	ccaccgatccacacagagta	94

Tabelle 6: Auflistung der Basensequenzen der für die quantitative RT-PCR eingesetzten Primer mit den dazugehörigen Gennamen (Kennung) und der Größe des entstehenden PCR-Produktes (Amplikon).

Kontamination der PCR-Reagenzien mit genomischer DNA

Zur Auswertung wurde berücksichtigt, ob die mitgeführte Wasserprobe (*no template control*, NTC, Wasser an Stelle von cDNA) ein spezifisches Produkt ergab. War dies der Fall, so wurde die Reaktion als kontaminiert gewertet und verworfen.

Fälschliche Bewertung eines PCR-Produkts als spezifisch

Um zu bestätigen, dass in einer Probe ein spezifisches PCR-Produkt entstanden war, wurde erstens die Schmelztemperatur dieses Produktes mit der Schmelztemperatur verglichen, die bei der Bestimmung der Primereffizienz aus seriellen Verdünnungen einer Positivkontrolle ermittelt worden war (siehe auch Unterabschnitt 3.1.1). Zweitens wurden die entstandenen Produkt in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Vergleich mit einer DNA-Größenleiter auf ihre Länge kontrolliert.

Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Schmelztemperatur der PCR-Produkte aus der Effizienzbestimmung der Agtr1b-Primer. Eine Schmelzkurve zeigt an, bei welcher Temperatur das Amplikon in DNA-Einzelstränge dissoziiert. Die Schmelztemperatur ist hierbei abhängig von Länge und GC-Gehalt des PCR-Produkts und individuell für jede Primerkombination.

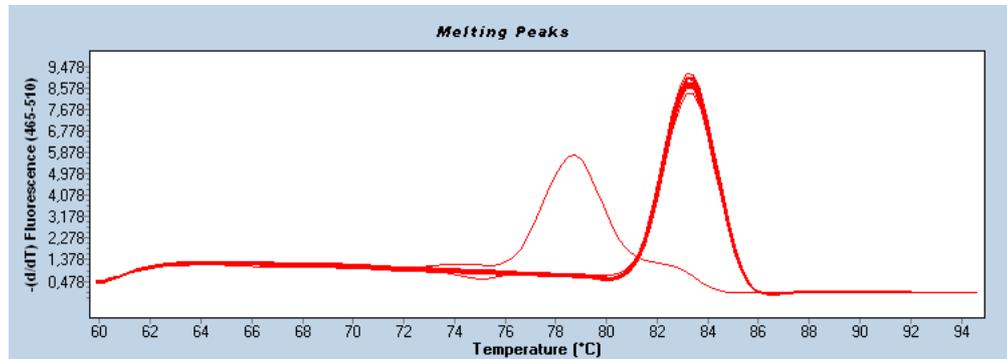


Abbildung 5: Schmelzkurven der Agtr1b-PCR-Produkte. Die überlagerten, in Rot dargestellten Kurven entsprechen den seriellen Verdünnungen einer Agtr1b-positiven cDNA-Probe, in denen sich das gleiche PCR-Produkt befindet. Die Einzelkurve links davon entspricht der Negativkontrolle ohne cDNA (NTC). Auf der Abszisse aufgetragen ist die Temperatur in °C, auf der Ordinate die negativierte erste Ableitung der Sybr-Green-I-Fluoreszenz über eine kontinuierliche Temperaturerhöhung. Bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung kommt es bei 83,4 °C zu einer starken Abnahme der Fluoreszenz, bedingt durch die Dissoziation der PCR-Produkte in Einzelstränge und damit resultierender Abnahme der doppelstrangabhängigen Sybr-Green-I-Fluoreszenz. Die Abnahme der Fluoreszenz wird in der negativierten ersten Ableitung zu einem Kurvenmaximum transponiert. Der Temperaturwert am Maximum der Kurve entspricht der Schmelztemperatur. In der NTC-Kontrolle entsteht die Fluoreszenzabnahme durch Dissoziation von Primer-Dimeren bei einer viel niedrigeren Temperatur (78,8 °C). Damit können über die Schmelztemperatur verschiedene PCR-Produkte differenziert werden.

Verzerrung der relativen Quantifizierungen durch fälschliche Annahme einer PCR-Effizienz von 2

Aus Gleichung (3) wird ersichtlich, dass zur relativen Quantifizierung eine genaue Effizienzbestimmung jeder individuellen Primerkombination essentiell ist, da sich ein Fehler exponentiell fortpflanzt.

Eine ideale PCR-Reaktion verläuft mit einer Effizienz von 2, was einer Verdopplung der DNA-Matrize pro Zyklus entspricht. Die Effizienz jeder Primerkombination muss jedoch empirisch bestimmt werden und kann nicht pauschal als 2 festgesetzt werden.

Die Effizienzbestimmung für jede Primerkombination erfolgte in Triplikaten mit mindestens fünf seriellen Verdünnungsschritten einer Kalibrator-cDNA im Sinne einer relativen Standardkurve. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven aus der Effizienzbestimmung für die Agtr1b-Primerkombination. Zur Darstellung einer Effizienzkurve siehe Abschnitt 3.1.1.

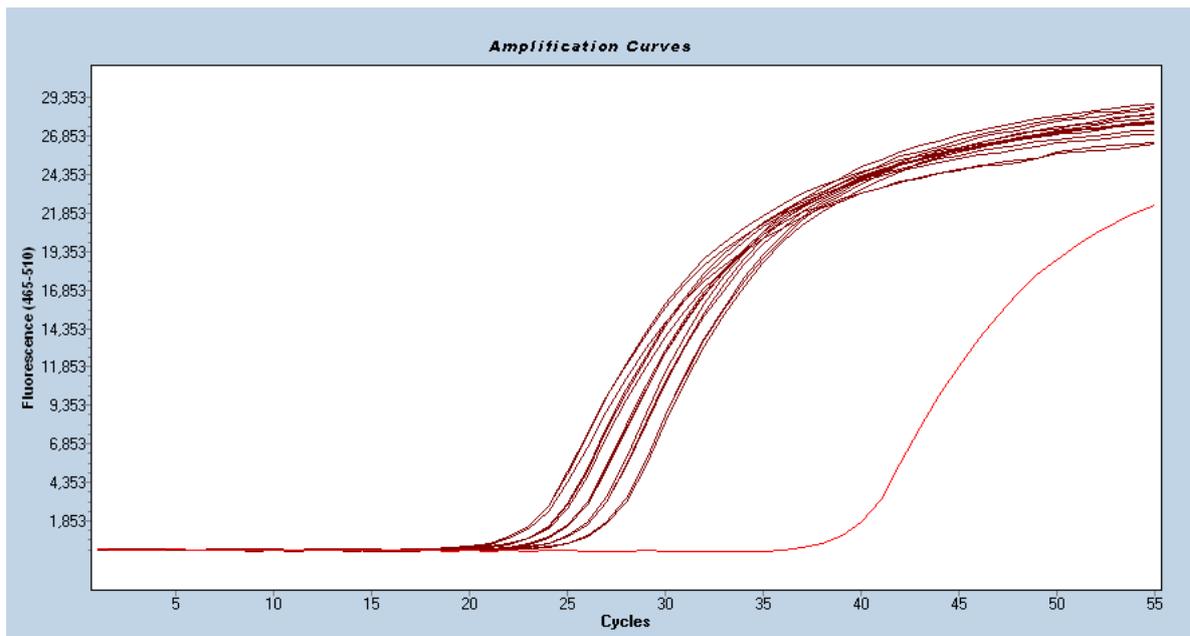


Abbildung 6: Amplifikationskurven aus der Effizienzbestimmung für die Agtr1b-Primerkombination. Die Abszisse zeigt den CP-Wert, die Ordinate die relative Fluoreszenz. Die dunkelroten Kurven entsprechen den Fluoreszenzverläufen der PCR-Reaktionen aus seriellen Verdünnungen der Kalibrator-cDNA. Dabei wurde jede PCR-Reaktion dreimal wiederholt, was die Überlagerungen der Einzelkurven bedingt. Der Abstand zwischen den fünf Triplikaten entspricht jeweils einem CP-Wert, da der Verdünnungsfaktor 2 beträgt. Für die gleiche Fluoreszenz wird für jede Verdünnungsstufe also ein PCR-Zyklus mehr benötigt (also eine Verdoppelung der DNA-Menge im Ansatz) als in der vorangegangenen Verdünnungsstufe, was die CP-Differenz von 1 erklärt. Die hellrote Kurve rechts entspricht der Wasserprobe (NTC). Da die Schmelztemperatur des hier entstandenen Produkts sich deutlich von der Schmelztemperatur der restlichen Produkte unterscheidet (siehe auch Abbildung 5), kann die NTC-Probe als nicht kontaminiert gewertet werden.

Die Effizienzbestimmungen wurden für jede Primerkombination einmalig mit einer murinen Kalibrator-cDNA aus Leber, Niere und Lunge durchgeführt. Nach Daten von Peirson und Kollegen wurde keine Überlegenheit von einer erneuten Effizienzbestimmung für jede individuelle Untergruppe (Gewebetyp) angenommen (Peirson *et al.*, 2003).

Die Quantitäten der untersuchten Transkripte wurden also auf das geometrische Mittel der drei Haushaltsgene Hprt1, Sdha und Ywhaz normiert, dies jeweils unter Berücksichtigung der dem Einzelfall zugrunde liegenden PCR-Effizienz.

Verzerrung des Vergleichs verschiedener Gewebe durch Auswahl von Haushaltsgenen, die in den Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden

Da im beschriebenen Experiment eine relative Quantifizierung vorgenommen wurde, mussten neben der RNA-Level der zu analysierenden G-Proteingekoppelten Rezeptoren auch die RNA-Level eines sog. Haushaltsgens (*house keeping gene*, HKG), in diesem Fall drei verschiedene, bestimmt werden.

Ein Haushaltsgen wird in jeder Zelle transkribiert, wobei es für verschiedene Gewebe unterschiedliche Ansätze gibt (Vandesompele *et al.*, 2002). Die geeigneten Haushaltsgene wurden mit Hilfe der GENORM-Software bestimmt (Vandesompele *et al.*, 2002).

Das Vorgehen zur Bestimmung der Expressionsstabilität für das Referenzgen j war wie folgt:

1. Bildung eines log2-transformierten Quotienten aus der relativen Quantität des HKG j mit dem HKG k innerhalb eines Gewebes: $\log_2\left(\frac{a_{1j}}{a_{1k}}\right)$;
 a =Quantität,
 $1 \in [1; m]$ = Menge aller Gewebe,
 $j, k \in [1; n]$ = Menge aller HKG
2. Durchführung dieser Zweierkombination für alle Gewebe; Bildung der Menge
 $A_{jk} = \left\{ \log_2\left(\frac{a_{1j}}{a_{1k}}\right), \log_2\left(\frac{a_{2j}}{a_{2k}}\right), \dots, \log_2\left(\frac{a_{mj}}{a_{mk}}\right) \right\} = \left\{ \log_2\left(\frac{a_{ij}}{a_{ik}}\right) \right\}_{i=1 \rightarrow m}$
3. Bildung der Standardabweichung dieser Menge $V_{jk} = \sigma(A_{jk})$
4. Bildung des arithmetischen Mittels aller Standardabweichungen aller weiteren möglichen A-Mengen des Gens j = Stabilitätsmaß $M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n-1}$
5. Berechnung aller anderen M-Werte, Vergleich und Elimination des Gens mit dem höchsten M-Wert.

Vereinfacht gesprochen wurde die gewebeübergreifende Transkriptionsstabilität von Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (Hprt1), Tyrosin-3-Monooxygenase, Tryptophan-5-Monooxygenase activation Protein, Zeta-Polypeptid (Ywhaz), Succinat-Dehydrogenase, Untereinheit A (Sdha) und β -Aktin (Actb) bestimmt. Dabei ergaben sich größere Schwankungen der Actb-Spiegel, so dass dieses Gen in der Folge ausgeschlossen wurde. Die Level der verbliebenen drei Haushaltsgene wurden über ihr geometrisches Mittel zu einem einzigen Normierungswert zusammengefasst.

Das Geometrische Mittel berechnet sich wie folgt:

$$\bar{x}_{\text{geom}} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n} \quad (4)$$

wobei

\bar{x}_{geom} = geometrisches Mittel

$\{x_1; x_2; \dots; x_n\}$ = Messwerte

n = Anzahl der Messwerte

Der Vorteil des geometrischen Mittels gegenüber dem arithmetischen liegt darin, dass auch kleine Werte stärker ins Gewicht fallen, also eine große numerische Spanne von Messwerten zu einem Wert zusammengefasst werden kann.

Das Ergebnis der Normalisierung kann in Analogie zu einem architektonischen Konstrukt gesehen werden, das an drei Punkten durch vertikale Stelzen horizontal stabilisiert wird: Gibt der Boden unter einer Stelze nach, so vermögen die restlichen zwei trotzdem den Totkollaps der Konstruktion zu verhindern. Gleichmaßen bleibt der Bezugspunkt für PCR-Normierungen stabiler, wenn zwei Haushaltsgene numerische Schwankungen des dritten abpuffern können. Dies garantiert nicht nur Stabilität des Referenzpunktes bei Bestimmung zu verschiedenen Zeitpunkten, auch die zelluläre Heterogenität der verglichenen Gewebe wird berücksichtigt.

2.2.4.3 Durchführung der qPCR Ein Reaktionsansatz für eine quantitative PCR enthielt folgende Reagenzien:

- ▷ 8 µl template cDNA (1:10-Verdünnung einer RNA-Umschreibung in cDNA)
- ▷ 2 µl Primer à 10 µM für das zu untersuchende Transkript, Endkonzentration 1 µM
- ▷ 10 µl Sybr-Green I-Mastermix (Reaktionspuffer mit 3 mM MgCl₂, DNA-Polymerase, dNTPs)

Die Primer wurden initial 5 Minuten bei 85 °C erhitzt, kurz mit dem Vortexer gemischt, auf Eis gestellt und dann zum Reaktionsansatz pipettiert. Um auch für GC-reiche Matrizen eine möglichst optimale Separierung in DNA-Einzelstränge zu erzielen, wurde auch die cDNA erst für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt, gevortext und auf Eis gestellt bevor sie zum Reaktionsansatz in eine Mikrotiterplatte (96-well-Platte) pipettiert wurde. Die 96-well-Platte (LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Roche) wurde zum Schluß bei 3000 U/min 2 Minuten lang zentrifugiert. Schließlich wurde die PCR-Reaktion in der *real-time*-PCR-Maschine gestartet.

Um unspezifischen Amplifikationen vorzubeugen, wird die in dieser Arbeit verwendete DNA-abhängige DNA-Polymerase in ihrem aktiven Zentrum blockiert. Um die PCR-Reaktion zu starten, muss diese erst 15 Minuten bei 95°C inkubiert werden, um die Dissoziation des blockierenden Moleküls zu gewährleisten.

Temperatur und Dauer der einzelnen PCR-Phasen waren wie folgt:

1. Präinkubation:

Temperatur [°C]	Aquisitionsmodus	Dauer [s]	Steigung [°C/s]
95	aus	900	4,4

2. Amplifikation, 55 Wiederholungen (Zyklen):

Temperatur [°C]	Aquisitionsmodus	Dauer [s]	Steigung [°C/s]
95	aus	10	4,4
55	aus	10	2,2
72	am Schrittlende einmal	10	4,4

3. Schmelzkurve:

Temperatur [°C]	Aquisitionsmodus	Dauer [s]	Steigung [°C/s]	Aquisitionen [s ⁻¹]
95	aus	10	4,4	
60	aus	60	2,2	
95	kontinuierlich	-	0,11	5

4. Kühlung:

Temperatur [°C]	Aquisitionsmodus	Dauer [s]	Steigung [°C/s]
40	aus	30	2,2

Schritt 1 diente zur Dissoziation des die DNA-Polymerase blockierenden Antikörpers.

Während Schritt 2 wurde die eigentliche Amplifikationsreaktion durchgeführt.

In Schritt 3 wurden die spezifischen Schmelztemperaturen für jedes während Schritt 2 entstandene PCR-Produkt registriert.

Pro PCR-Lauf können 96 Reaktionen parallel analysiert werden. Die Auswertung erfolgte mit der geräteigenen Software LightCycler 480 (Roche-Applied-Science, Mannheim).

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose wurde mit TAE-Puffer (TRIS-Azetat-EDTA-Puffer, 40 mM TRIS, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH = 8,5) in einen Erlenmeierkolben gegeben und dieser in einer Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt, bis die Lösung makroskopisch klar war. Nachdem 10 µl einer einprozentigen Ethidiumbromidlösung in der Gelkammer deponiert worden war, wurde das handwarme, noch flüssige Agarosegemisch darauf gegossen, mit einer Pipettenspitze gut gerührt und die Stechkämme in dem Gemisch platziert. Die Aushärtung fand für 30 Minuten bei Raumtemperatur statt. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer (PerfectBlue Gelsystem Mini L, Peqlab, Erlangen) gegeben und mit TAE-Puffer bedeckt. Anschließend wurden in die äußeren und die mittlere Geltasche jeweils 5 µl Größenleiter pipettiert. Die PCR-Produkte wurden jeweils mit 5 µl Auftragsfarbe versehen und 15 µl dieses Gemisches (30 µl bei großen Geltaschen) in die inneren Taschen appliziert. Am Netzgerät (Electrophoresis power supply, Peqlab, Erlangen) wurde eine Spannung von 150 Volt angelegt. Nach 1 Stunde und 5 Minuten Laufzeit wurde das Gel unter einer UV-Lichtquelle (Infinity Darkroom-CN-3000, Vilber-Lourmat, Eberhardzell) dargestellt und ein Foto hiervon gespeichert.

2.2.6 Arteriographie (isobare Konstriktionsmessung)

Über eine Arteriographie wird die Durchmesseränderung von isolierten und kanülierten kleinen Arterien auf diverse, extern kontrollierte Stimuli registriert. Der Begriff „isobare Konstriktionsmessung“ impliziert in diesem Zusammenhang die Kontrolle des intravasalen Drucks.

Zentral war in der vorliegenden Arbeit ein aus folgenden Modulen bestehendes Arteriographiesystem (DMT 111P, DMT, Aarhus, Dänemark):

- ▷ *pressure myograph unit* (Einheit mit Organbad für die kanülierte Arterie und Anschlussstellen für Druckapplikation, Begasung und Superfusion)
- ▷ Inversmikroskop (Zeiss Achromat 10X / 0.25 Objektiv, integrierte CCD-Kamera, Infrarotlichtquelle)
- ▷ *pressure myo interface* (Schnittstelle zur Integration der Messwerte der *pressure myograph unit*)

▷ *pressure regulator* (Druckgenerator mittels Pressluft)

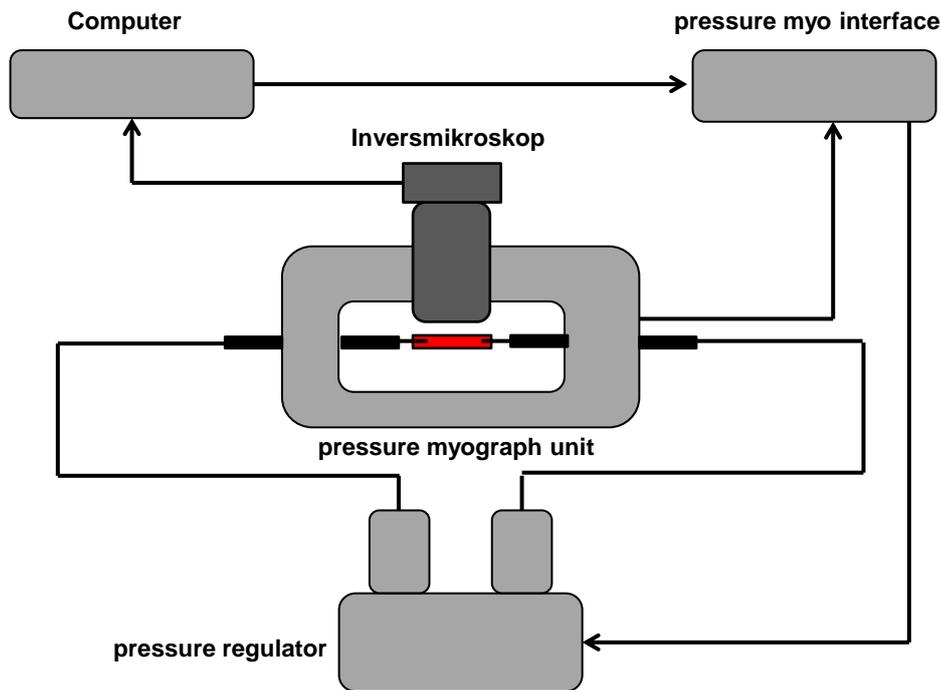


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des DMT 111P. In der *pressure myograph unit* befindet sich das begaste Organbad mit der kanülierten Arterie (rot). Der Druck an beiden Enden der Arterie wird vom *pressure regulator* generiert. Gesteuert wird die Druckapplikation über das *pressure myo interface*, das auch Rückkopplung von Drucksensoren in der *pressure myograph unit* erhält. Die *pressure myograph unit* ist auf dem Inversmikroskop befestigt, das ein Videosignal an den Computer liefert, wo die Bildauswertung vorgenommen wird.

Der Durchmesser wurde mittels Videomikroskopie am Computer erfasst und aufgezeichnet (MyoView, DMT, Aarhus, Dänemark). Die *pressure myograph unit* wurde entlüftet mit 37°C-warmer, zuvor begaster PSS-Lösung. Die Lösung wurde zuvor erwärmt, um die Gasblasenbildung durch Erwärmen während des Messprozesses zu minimieren. Mesenterialarterien dritt- oder höhergradiger Ordnung wurden nach der Dissektion direkt in die Messkammer überführt. Die isolierten Gefäße wurden mit dünn ausgezogenen (DMZ Universal Puller, Zeitz Instruments Germany, Martinsried, Programm Pa 04 [Werkseinstellungen]) Glaskapillaren (GB 120T-8P Borosilikat, Science Products, Hofheim) kanüliert, vorsichtig von lumenalem Blut durch Spülen mit PSS befreit und mit zwei Nylonfäden (Suture Nylon Black, S&T, Neuhausen, CH) pro Seite befestigt. Die *pressure myograph unit* wurde an die PC-Schnittstelle (*pressure myo interface*) angeschlossen, das Gefäß bei 5 mmHg equilibriert. Eine Temperatursonde mit entsprechendem Regelkreis garantierte konstante 37 °C. Das Organbad wurde kontinuierlich mit Carbogen begast. Der intraluminale Druck wurde auf 40 mmHg angehoben und PSS-Lösung mit 60 mM KCl eingewaschen (REGLO Digital Peristaltikpumpe, Ismatec, Glattbrugg, CH). Wenn hierauf eine Verkürzung des Außendurchmessers um mindestens 30% erfolgte, wurde das Gefäß für funktionell intakt erklärt und weiteren Analyseschritten unterzogen. Die Stimulation mit KCl steht im Gegensatz zu anderen Tests auf Intaktheit (sog. *viability assays*) nicht im Verdacht, den myogenen Tonus pharmakologisch zu erhöhen (Liu *et al.*, 1994). Anschließend wurde mit der Registrierung des myogenen Tonus begonnen. Diese wurde unter Applikation

einer Druckleiter, d.h. eines schrittweise ansteigenden intraluminalen Gefäßdruckes durchgeführt. Als abhängige Variable wurde der Gefäßaußendurchmesser registriert. Tabelle 7 listet Dauer und Druck pro Stufe im Einzelnen auf.

Druck [mmHg]	Dauer [s]
5	120
10	120
20	120
30	120
40	120
50	120
60	120
70	120
80	120
90	300
100	300
110	300
120	300

Tabelle 7: Auflistung der Druckleiter für die isobare Konstriktionsmessung mit den Druckstufen und der Dauer der jeweiligen Druckstufe.

Das obere Ende der Druckleiter wurde auf 120 mmHg festgesetzt, da in einer Studie zur Ermittlung des Blutdrucks bei Labormäusen über 24 Stunden 120 mmHg systolisch nicht überschritten wurden (Kaidi *et al.*, 2007).

Das Gefäß wurde dieser Druckleiter unter PSS ausgesetzt. Der erste Schritt diente nur zur Feststellung, ob das Gefäß einen myogenen Tonus ausbildet. Wenn dies nicht der Fall war, wurde das Gefäß verworfen. Nach Ausbildung eines Tonus wurde die Leiter ein zweites Mal appliziert. Dies geschah im PSS-Bad, wobei PSS entweder rein (Kontrollgruppe) oder mit gelösten Pharmaka appliziert wurde (Interventionsgruppen). Die Badlösung von Kontroll- und Interventionsgruppen wurde im zweiten Schritt konstant unter $1 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$ Flussgeschwindigkeit umgewälzt. Zum Schluß wurde jedes Gefäß der Druckleiter ein drittes Mal unterzogen, diesmal in kalziumfreier, EDTA-haltiger PSS-Lösung. Dieser Schritt diente zur Registrierung des passiven Gefäßaußendurchmessers.

Der myogene Tonus errechnete sich mit folgender Formel:

$$MT = \frac{\text{Durchmesser}_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}} - \text{Durchmesser}_{\text{PSS/PSS+Pharmakon}}}{\text{Durchmesser}_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}} \cdot 100\% \quad (5)$$

Nach Normierung auf den passiven Durchmesser ergeben sich also zwei *rationes*, im Folgenden MT_1 und MT_2 genannt.

Zur Veranschaulichung ist mit Abbildung 8 eine Originalspur abgebildet:

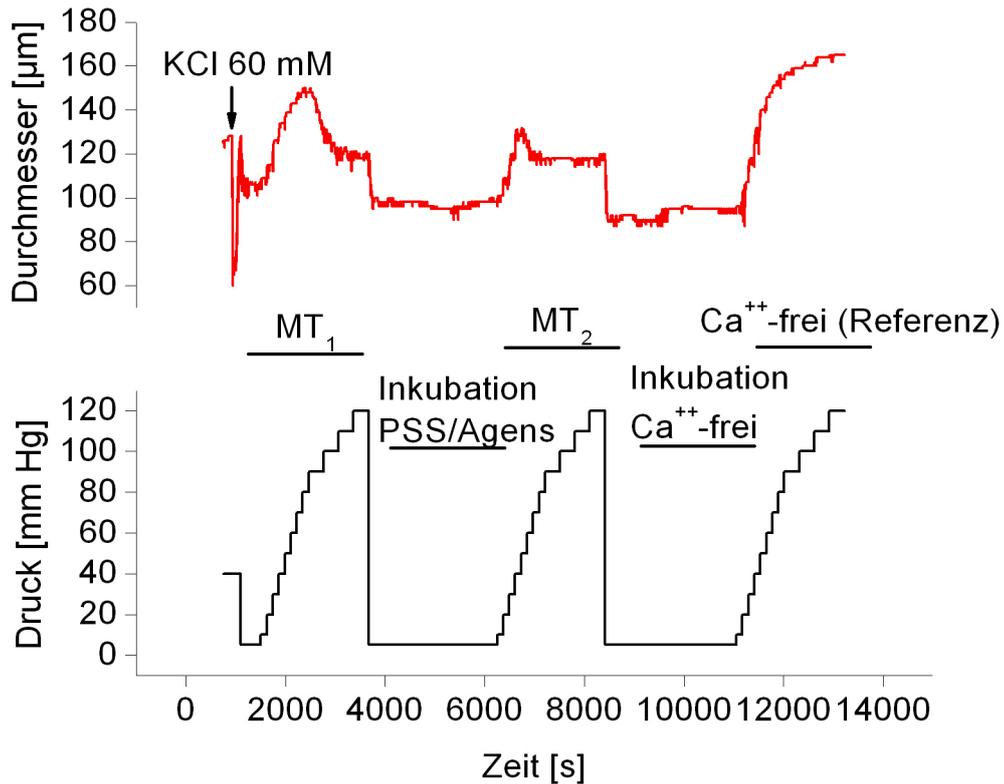


Abbildung 8: Gezeigt ist eine Originalspur einer isobaren Konstriktionsmessung (Arteriographie). Der obere Teil der Abbildung zeigt den Außendurchmesserverlauf des Gefäßes (rot) in μm . Der untere Teil der Abbildung zeigt den Verlauf der applizierten Druckleiter (schwarz) in mmHg. Dabei sind die Inkubationszeiten über den Druckleitern gekennzeichnet. Am Anfang wird das Gefäß bei 40 mmHg einer Lösung mit 60 mM KCl ausgesetzt. Es folgt eine gut sichtbare Konstriktion. Danach wird die KCl-Lösung wieder ausgewaschen und physiologische PSS-Lösung eingewaschen. Der Druck wird auf 5 mmHg reduziert. Nach einer Stabilisationsphase beginnt die erste Druckleiter. Der Durchmesser nimmt zunächst zu, reduziert sich dann aber unter noch steigendem Druck. Dieses Phänomen entspricht dem myogenen Tonus. Im Anschluss an die letzte Druckstufe von 120 mmHg wird der Druck wieder auf 5 mmHg reduziert und entweder mit PSS oder einem Pharmakon inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 35 Minuten folgt die zweite Druckleiter unter ständigem Austausch der Badlösung mit frischer Lösung (reines PSS oder pharmakonhaltiges PSS). Der Durchmesser nimmt wie zuerst zu, erreicht aber nur geringere Werte und reduziert sich auch zu einem früheren Druckzeitpunkt als unter der ersten Druckleiter. Der myogene Tonus scheint also während der zweiten Druckleiter ausgeprägter zu sein. Im Anschluss wird der Druck wieder auf 5 mmHg reduziert, eine kalziumfreie PSS-Lösung eingewaschen und 35 Minuten inkubiert. Die letzte nun folgende Druckleiter liefert somit nur den passiven Gefäßdurchmesser. Auf diesen werden die beiden Durchmesserwerte der vorangegangenen Druckleitern normiert (siehe auch Gleichung 5). So entstehen die Parameter MT_1 und MT_2 .

Es wurden drei Pufferlösungen (Knot & Nelson, 1998) mit verschiedenen Salzkonzentrationen verwandt (Konzentrationen in mM):

1. PSS: NaCl 119, KCl 4,7, KH_2PO_4 1,2, NaHCO_3 25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,2, Glukose 11,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,6
2. PSS 60 mM KCl: NaCl 63,7, KCl 60; übrige Salze wie PSS

3. PSS ohne Kalzium: EDTA 3, übrige Salze wie PSS nur ohne $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Pharmaka wurden in PSS gelöst.

2.2.7 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Für die Auswertung von Unterschieden in RNA-Leveln wurde der WILCOXON-Rangsummentest verwendet. Dabei galt ein zweiseitiges Signifikanzniveau von 0,05.

Die Unterschiede von pharmakologisch behandelten und unbehandelten Kontrollgefäßen, bei Linksverschiebungen und in den Kontraktilitäten wurden mit dem Student-t-Test für ungepaarte Stichproben für jede Druckstufe einzeln berechnet. Auch die Berechnungen zur Signifikanz von Unterschieden zweier Regressionsparameter wurden über einen zweiseitigen Student-t-Test durchgeführt. Dabei galt ein zweiseitiges Signifikanzniveau von 0,05.

Mathematische Regressionen (sog. *fits*) von Kurven des myogenen Tonus wurden entweder auf eine adaptierte Hill-Funktion hin durchgeführt oder auf eine bisigmoide Hill-Funktion.

Die Gleichung zur einfachen Hill-Funktion wurde mit

$$y = A_0 + \frac{(A_1 - A_0) \cdot x^n}{k^n + x^n} \quad (6)$$

modelliert, wobei

y = myogener Tonus

A_0 = Y-Wert für $x \rightarrow 0$

A_1 = Y-Wert für $x \rightarrow \infty$

k = Wendepunkt der Kurve, x -Wert der halbmaximalen Effekts (myogener Tonus)

n = Hillkoeffizient, bzw. Ausdruck für die Steigung zwischen A_0 und A_1

x = Druckwerte

A_0 und A_1 wurden als waagrechte Asymptoten eingeführt, um den Wertebereich der Hill-Funktion von [0..1] passend zu skalieren und zu verschieben.

Die Gleichung zur bisigmoiden Hill-Funktion wurde mit

$$y = A_0 + \frac{(A_1 - A_0) \cdot x^{n_1}}{l^{n_1} + x^{n_1}} + \frac{(A_2 - A_1 + A_0) \cdot x^{n_2}}{r^{n_2} + x^{n_2}} \quad (7)$$

modelliert, wobei

y = myogener Tonus

A_1 =Y-Wert am Plateau zwischen den beiden Teilgraphen,
bei Initialisierung $A_0 + (A_2 - A_0) \cdot 0.3$

l =Wendepunkt des linken Teilgraphen, x-Wert des ersten halbmaximalen Effekts

n_1 =Ausdruck für die Steigung im linken Teilgraphen

n_2 =Ausdruck für die Steigung im rechten Teilgraphen

r =Wendepunkt des rechten Teilgraphen, x-Wert des zweiten halbmaximalen Effekts

Analog zur einfachen Hill-Funktion bezeichnen A_0 und A_2 die y-Werte der waagrecht Asymptoten für $x \rightarrow 0$, bzw. $x \rightarrow \infty$.

Berechnungen zur statistischen Signifikanz des Unterschieds zweier Regressionsparameter wurden auf der Basis eines zweiseitigen Student-t-Tests mittels Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) vorgenommen.

Die Berechnung des WILCOXON-Rangsummentests und die Darstellung der QQ-Plots (Quantil-Quantil-Diagramme) wurden mittels STATA 9.1 (StataCorp, College Station, Texas, USA) durchgeführt.

Alle anderen statistischen Tests und graphischen Darstellungen wurden mittels Origin (OriginLab Corporation, Northampton, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Heptahelikale Rezeptoren nach Lokalisation

3.1.1 Evaluation der Primerkombinationen

Zunächst wurden Verdünnungsschritte einer cDNA-Positivkontrolle (cDNA-Pool aus muriner Leber, Niere und Lunge) um den Faktor 2 vorgenommen. Diese Dilutionen wurden in Dreifachbestimmung als PCR-Matrizen für alle Primerkombinationen eingesetzt. Die Primereffizienz errechnete sich aus der Steigung der Regressionsgeraden von CP-Wert *versus* logarithmierte Matrizenkonzentration (siehe auch Gleichung 2). Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Standardkurve für die Agtr1b-Primerkombination (Angiotensin II-Rezeptor 1b).

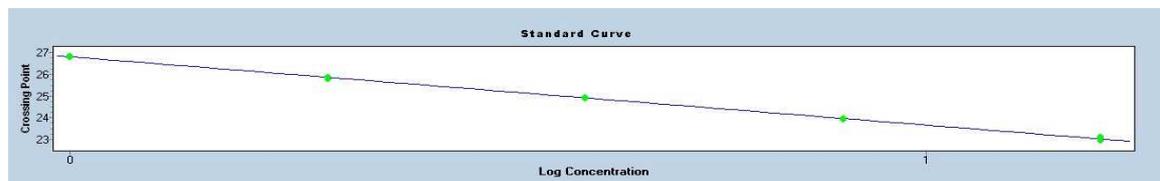


Abbildung 9: Effizienzkurve der Agtr1b-Primerkombination; Abszisse: Relative logarithmische Konzentration der cDNA-Matrize; Ordinate: Nach der *2nd derivative-maximum*-Methode ermittelte CP-Wert zu jeder cDNA-Konzentration; die gezeigte Effizienzkurve stammt aus der PCR-Reaktion, die auch Abbildung 6 zugrunde liegt. Die Regressionsgerade aufspannenden Punkte entsprechen Triplikaten jeder PCR-Reaktion, wobei die Einzelpunkte überlagert dargestellt sind. Die Effizienz berechnet sich aus der Steigung der Regressionsgeraden zu $10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}}$ (siehe auch Gleichung 2) und beträgt in diesem Fall 2,00.

In Tabelle 8 finden sich alle Effizienzwerte und Schmelztemperaturen der verwendeten Primerkombinationen.

Gen	Effizienzwert	T _m Produkt [°C]
Ednra	1,94	80,20
Ednrb	1,79	82,40
Agtr1a	1,99	79,92
Agtr1b	2,00	83,40
Avpr1a	2,00	81,80
Adra1a	1,95	87,45
Adra1b	1,99	85,55
Adra1d	1,96	84,12
Adra2a	1,90	79,70
Adra2b	2,00	85,78
Adrb2	1,97	87,08
Acta2	1,92	85,30
Hprt1	2,0	88,75
Ywhaz	1,94	84,28
Sdha	1,99	80,05
Actb	1,96	82,50

Tabelle 8: Errechnete Effizienzen der Primerkombinationen und experimentell bestimmte Schmelztemperaturen (T_m) der zu den Primerkombinationen gehörigen PCR-Produkte, sortiert nach Gennamen.

3.1.2 Determination der geeigneten Haushaltsgene

Initial wurden vier Haushaltsgene auf ihre Eignung zur Referenzgenen evaluiert. Dabei wurde die geNorm-Methode von Vandesompele und Kollegen angewandt (Vandesompele *et al.*, 2002). Grundlage für die Verwendung multipler Referenzpunkte ist die Schwankung der Nukleinsäuremenge der einzelnen Referenzgene zum einen in Proben desselben Gewebes und zum anderen in Proben verschiedener Gewebe. Zunächst wurden Haushaltsgene (HKG) mit höherer Variabilität identifiziert und aus dem Pool eliminiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die kritische Anzahl von drei HKG nicht unterschritten wurde (Vandesompele *et al.*, 2002).

Wird ein HKG eliminiert, ändern sich natürlich die Stabilitätsmaße (M-Werte) bei der Neubestimmung, da das instabilere HKG diese mitbestimmt hat. Die M-Werte für die HKG sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Gen	M-Wert mit Actb	M-Wert ohne Actb
Actb	1,691	
Hprt1	1,529	1,290
Ywhaz	1,404	1,620
Sdha	1,610	1,368

Tabelle 9: Errechnete M-Werte (Stabilitätsmaß) der Haushaltsgene (HKG). Mit Actb ist eine größere Instabilität aller HKG zu verzeichnen, da hohe Variabilität seiner Expressionslevel die paarweisen Vergleiche der Expressionslevel ebenfalls instabiler macht. Nach Elimination von Actb und Neukalkulation bessert sich der M-Wert von Hprt1 und Sdha. Der M-Wert von Ywhaz wird schlechter, bleibt jedoch unter dem Wert von Actb.

Es fiel auf, dass ein so häufig verwendetes HKG wie β -Aktin (Actb) die schlechtesten Stabilitätswerte erzielte. Actb-RNA-Level haben also eine hohe Variabilität zwischen den verglichenen Geweben. Actb

wurde als Referenzgen für ungeeignet befunden.

Der Referenzpunkt für die folgende Auswertung der PCR-Daten wurde aus dem geometrischen Mittel der HKG Hprt1, Ywhaz und Sdha gewonnen.

3.1.3 Prüfung der Daten auf ihre zugrunde liegende statistische Verteilung

Damit ein statistischer Test auf Unterschiede zwischen den Gefäßbetten erst möglich ist, muss zunächst die Verteilung der erhobenen Daten bestimmt werden.

Da aufgrund der erschwerten Zugänglichkeit des Materials jede PCR-Reaktion nur drei Mal wiederholt werden konnte, ist ein statistischer Test auf Normalverteilung für jedes einzelne Gefäßbett nicht sinnvoll, da diese drei Werte nicht hinreichend viele Datenpunkte darstellen. Eine gefäßbettübergreifende Prüfung auf Normalverteilung schien ebensowenig sinnvoll, da hierbei die Ungleichheit der untersuchten Gefäßbette unterschlagen würde. Letztere schließlich ist gerade Gegenstand der vorliegenden Abhandlung. Um jedoch keiner vorgefassten Meinung die Möglichkeit zu geben, die Auswertung zu beeinflussen, wurde trotzdem die Gesamtheit aller Gefäße auf die Möglichkeit einer gemeinsamen Normalverteilung der Expressionslevel für Agtr1a (Angiotensin II-Rezeptor 1a) untersucht. Dies geschah mittels eines *QQ-plots* (Quantil-Quantil-Diagramm). Sind die Daten normalverteilt, haben die Punkte der Gerade identische x- und y-Werte und liegen auf der Winkelhalbierenden. Im QQ-Plot von Abbildung 10 zeigt sich klar, dass keine Normalverteilung vorliegt.

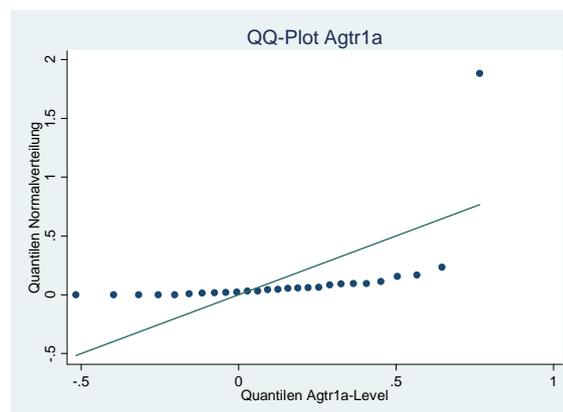


Abbildung 10: Gezeigt ist ein gefäßübergreifender sog. QQ-Plot (Quantil-Quantil-Diagramm) auf Normalverteilung der Agtr1a-Expressionswerte. Dabei werden die Messwerte in Quantilen transformiert. Diese werden den Quantilen der Standardnormalverteilung zugeordnet. Liegen die Punkte auf der Winkelhalbierenden (entspricht der eingezeichneten Geraden), kann die Gleichheit der beiden Verteilungen angenommen werden, in diesem Fall die Normalverteilung der Messwerte. Im vorliegenden Fall verlaufen die Punkte nicht entlang der Winkelhalbierenden. Damit kann für die Agtr1a-Expressionswerte keine Normalverteilung angenommen werden. Gesichert wurde die Vermutung durch den negativen Test nach SHAPIRO-WILK.

Ferner ergab auch der mathematische Test auf Normalverteilung nach SHAPIRO-WILK, dass keine Normalverteilung vorlag.

Daher wurde für die folgenden Auswertungen der WILCOXON-Rangsummen-Test gewählt, welcher durch seine nichtparametrische Natur den Vergleich von Daten jeglicher Verteilung, also auch nicht-

normalverteilter Daten, ermöglicht (Wilcoxon, 1945; Yuan *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2007; Ganly *et al.*, 2007). Die Nullhypothese war dabei die Äquivalenz der beiden verglichenen Gruppen, so dass das Signifikanzniveau im Sinne eines zweiseitigen Tests ermittelt wurde.

3.1.4 Übersichtsprofil der RNA-Level verschiedener heptahelikaler Transmembranproteine in verschiedenen Gefäßbetten.

Als Neuheit kann die vorliegende Arbeit insofern bezeichnet werden, als dass noch niemals vorher ein systematischer Ansatz verfolgt wurde, verschiedene Rezeptoren mit der selben Methodik in ihren RNA-Leveln in unterschiedlichen arteriellen Stromgebieten zu erfassen.

- ▷ Die angewandte Normalisierung der Rohdaten erlaubt zum einen den Vergleich zu verschiedenen Zeitpunkten erhobener RNA-Level innerhalb desselben Gefäßtyps.
- ▷ Zum anderen bietet die Normalisierung den Vorteil, dass sie ebenfalls die Schwankungen der Haushaltsgenlevel zwischen verschiedenen Gefäßtypen auf ein Minimum reduziert, und somit auch den Vergleich zwischen verschiedenen Stromgebieten ermöglicht.
- ▷ Schließlich ist die Vielfalt der Methoden, mit denen bisher eine Subtypisierung von verschiedenen Transmembranrezeptoren versucht wurde, ein Hindernis für eine Zusammenführung aller bisherigen Ergebnisse. Eine gemeinsame Methode, unter denselben Bedingungen durchgeführt, schließt auch diese Form der Schwankung aus und macht die Daten verschiedener Rezeptoren vergleichbar.

In Summe sind also folgende Anwendungen möglich:

- ▷ Vergleich Rezeptor 1 mit Rezeptor 2 in Organ A (verschiedene Rezeptoren, gleiches Organ)
- ▷ Vergleich Rezeptor 1 in Organ A mit Rezeptor 1 in Organ B (gleicher Rezeptor, verschiedene Organe)
- ▷ Vergleich Rezeptor 1 in Organ A mit Rezeptor 2 in Organ B (verschiedene Rezeptoren, verschiedene Organe)

Man kann von einem gefäßspezifischen RNA-Fingerabdruck sprechen, der für künftige, gezielte Beeinflussungen distinkter vaskulärer Organversorgungen in der experimentellen und klinischen Pharmakologie von Bedeutung sein könnte, siehe auch Abbildung 11. Damit genügt die vorliegende Untersuchung Forderungen, wie sie in einer jüngst erschienenen Übersichtsarbeit zur Bedeutung von 7TMR für den myogenen Tonus erhoben wurden (Kauffenstein *et al.*, 2012).

Weitergehend soll im nächsten Kapitel die physiologische Relevanz dieses Fingerabdrucks über eine Analyse des Verhaltens auf pharmakologische Hemmung der jeweiligen Rezeptoren untersucht werden.

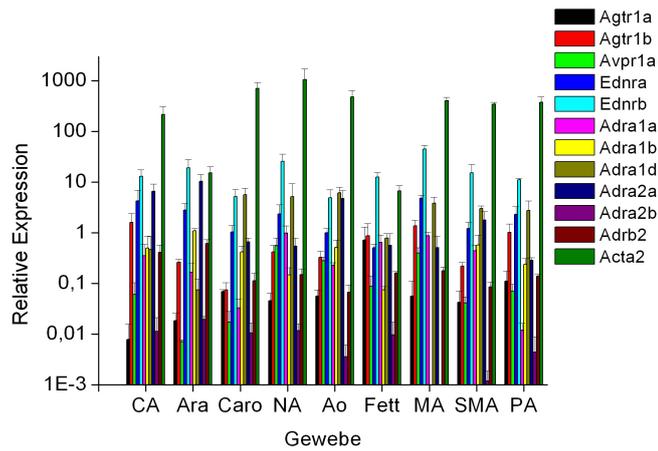


Abbildung 11: Das Ergebnis der qPCR ist ein gewebespezifischer Fingerabdruck für 7TMR und glattmuskuläres α -Aktin. Den untersuchten Geweben sind die RNA-Level der untersuchten Strukturen clusterartig zugeordnet. Die Ordinate mit den auf die RNA-Level der Referenzgene Hprt1, Ywhaz und Sdha normierten relativen Expressionsleveln ist logarithmisch skaliert. Jede PCR-Reaktion erfolgte zu Triplikaten und wurde insgesamt mindestens drei Mal durchgeführt. CA=Gehirnarterien, Ara=Arachnoidea mater, Caro=A. carotis, NA=A. renalis, Ao=Aorta abdominalis, Fett=abdominales Fettgewebe, MA=Mesenterialarterien, SMA=A. mesenterica superior, PA=A. pulmonalis

3.1.5 Prüfung der Diskriminationsfähigkeit des Wilcoxon-Rangsummentests für Ziel- und Kontrollgewebe

Das Übersichtsprofil (Abbildung 11) zeigt sich initial ohne eindeutiges Muster. Es war jedoch möglich, eine signifikant niedrigere Expression von glattmuskulärem (sm) α -Aktin in beiden Kontrollgeweben, verglichen mit den Gefäßen, zu beweisen, siehe dazu auch Tabelle 10. Glattmuskuläres α -Aktin stellt seit der Entwicklung von spezifischen Antikörpern ein Antigen zum diagnostischen histologischen Nachweis von glatten Muskelzellen dar (Skalli *et al.*, 1986). Zirka 40% des Gesamtproteins von glatten Muskelzellen werden von α -Aktin gestellt. Die Gewebespezifität im adulten Säugerorganismus unter normalen Umständen wird in Übersichtsarbeiten betont (Owens, 1995). Der statistische Test war also in der Lage, einen Überschuss von in der Literatur bereits bekannten, zelltypspezifischen Transkripten zu entdecken.

	CA	Caro	NA	Ao	MA	SMA	PA
Fett	p<0,05						
Ara	p<0,05						

Tabelle 10: Testung der RNA-Level für sm- α -Aktin der Gefäßgewebe gegen die Kontrollgewebe (Fettgewebe [Fett] und Arachnoidea [Ara]) auf statistisch signifikante Unterschiede im WILCOXON-Rangsummentest. sm- α -Aktin stellt dabei einen Marker für glatte Muskelzellen dar und sollte nur in geringem Ausmaß im Kontrollgewebe nachweisbar sein, dagegen in hohem Maße in den Gefäßgeweben. In allen Vergleichspaaren zeigt sich deutlich, dass der WILCOXON-Rangsummentest physiologisch plausible RNA-Unterschiede detektiert; p<0,05=statistisch signifikanter Unterschied

Desweiteren zeigte sich bei einem systematischen Test aller Gefäßgebiete gegeneinander kein Unterschied in den sm- α -Aktin-Spiegeln, siehe auch Tabelle 11. Dies kann als Beleg dafür herangezogen werden, dass sich in allen untersuchten Gefäßgebieten der relative Anteil an glatten Muskelzellen an der Gesamtzellmenge nicht signifikant unterschied. Dies wiederum erlaubt, Aussagen in Bezug auf die glatten

Muskelzellen und ihre Rezeptorausstattung gewebeübergreifend ohne Einschränkung zu treffen.

	CA	Caro	NA	Ao	MA	SMA	PA
CA	∅	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Caro	n.s.	∅	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NA	n.s.	n.s.	∅	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ao	n.s.	n.s.	n.s.	∅	n.s.	n.s.	n.s.
MA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	∅	n.s.	n.s.
SMA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	∅	n.s.
PA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	∅

Tabelle 11: Test der Gefäßgewebe auf Unterschiede in ihren relativen RNA-Level für sm- α -Aktin. Es zeigt sich, dass im Vergleich mit einem anderen Gefäßgebiet in keinem Gefäßgebiet ein Unterschied in den sm- α -Aktin-RNA-Leveln auszumachen ist. Glatte Muskelzellen stellen damit vergleichbare Anteile an den gesamten RNA-Leveln in jedem Gefäßgebiet. n.s. = statistisch nicht signifikanter Unterschied

3.1.6 Charakteristika der RNA-Level von Leitungs- und Widerstandsgefäßen

3.1.6.1 Leitungs- versus Widerstandsgefäße Es ist bekannt, dass Leitungsgefäße eine geringere myogene Reagibilität aufweisen als Widerstandsgefäße (Johnson & Intaglietta, 1976; Davis, 1993; DiSanto *et al.*, 1997). Welche molekularen Grundlagen dem zugrunde liegen, ist jedoch noch unklar. Deshalb wurden RNA-Level von heptahelikalen Transmembranrezeptoren in anatomisch assoziierten, funktionell aber verschiedenen Gefäßen verglichen. Die Hypothese hinter diesem Vergleich war, dass große Gefäße tendenziell weniger $G_{q/11}$ -koppelnde Rezeptoren aufweisen und damit weniger Sensormoleküle zur Transduktion von Information bei Druckänderung besitzen, was die Reagibilität entsprechend vermindert. Eine Analyse der Profiländerung von proximal nach distal wurde zunächst für folgende Paare durchgeführt, siehe auch Abbildung 12.

1. A. carotis vs. Gehirnarterien
2. Aorta vs. Nierenarterie
3. A. mesenterica superior vs. kleine Mesenterialarterien

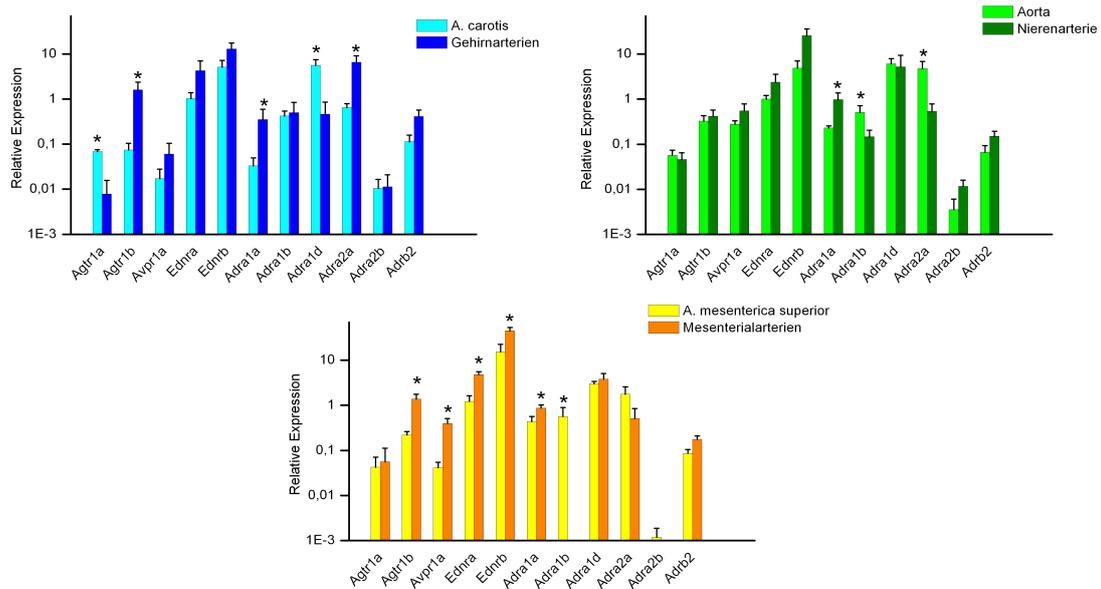


Abbildung 12: Vergleich der relativen Rezeptor-RNA-Level von Leitungs- und dem daraus entspringenden Widerstandsgefäß. Oben: A:carotis (Caro, hellblau) vs. Gehirnarterien (CA, dunkelblau), Mitte: Bauchaorta (Ao, hellgrün) vs. Nierenarterie (NA, dunkelgrün), Unten: A. mesenterica superior (SMA, gelb) vs. kleine Mesenterialarterien (MA, orange); Die Skalierung der Ordinate ist logarithmisch. Mit Sternen gekennzeichnete Rezeptor-RNA-Level zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäßen im WILCOXON-Rangsummentest

Zur Mustererkennung diente eine Darstellung der Ergebnisse in Tabelle 12.

	Caro vs. CA	Ao vs. NA	SMA vs. MA
Agtr1a	p<0,05		
Agtr1b	p<0,05		p<0,05
Avpr1a			p<0,05
Ednra			p<0,05
Ednrb			p<0,05
Adra1a	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Adra1b		p<0,05	p<0,05
Adra1d	p<0,05		
Adra2a	p<0,05	p<0,05	
Adra2b			
Adrb2			

Tabelle 12: Zur Mustererkennung sind die in Abbildung 12 gezeigten statistisch signifikanten Unterschiede in den Rezeptor-RNA-Leveln tabellarisch aufgeschlüsselt. Dabei ergeben sich Muster aus signifikanten Unterschieden, die auch in den anderen getesteten Paaren auftreten, wie im Fall von Adra1a (dessen Genprodukt für den α_{1A} -Adrenozeptor kodiert). Rezeptoren, deren RNA-Level paarübergreifende signifikante Unterschiede zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäß aufweisen, stellen gute Kandidaten für Mechanosensoren des myogenen Tonus dar. Voraussetzung hierfür ist eine höhere Expression im Widerstandsgefäß als im Leitungsgefäß (nicht anders herum). p<0,05 steht für einen statistisch signifikanten Unterschied im WILCOXON-Rangsummentest.

Nur hinsichtlich der RNA-Level des α_{1A} -Adrenozeptors (Adra1a) zeigte sich in allen drei Paaren ein statistisch signifikanter Unterschied. Hier war in allen Vergleichspaaren mehr spezifische RNA in den

Widerstandsgefäßen detektierbar als in den Leitungsgefäßen.

Anschließend wurde mit der A. pulmonalis ein *per definitionem* nicht myogenes (d.h. keinen myogenen Tonus ausbildendes) Gefäß (Naik *et al.*, 2005) mit einem myogenen Gefäß verglichen, siehe auch Abbildung 13.

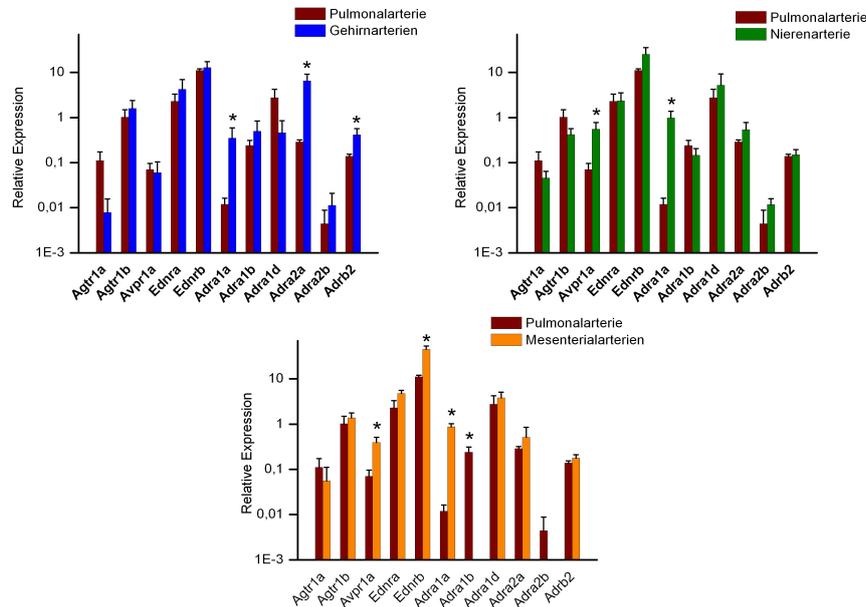


Abbildung 13: Vergleich der Widerstandsgefäße in ihren Rezeptor-RNA-Leveln mit der Pulmonalarterie (PA) als definitiv nicht-myogenem Gefäß. Dabei soll untersucht werden, ob sich die signifikanten Unterschiede aus Abbildung 12 auch hier wiederholen. Oben: Pulmonalarterie (PA, dunkelrot) vs. Gehirnarterien (CA, dunkelblau); Mitte: Pulmonalarterie (PA, dunkelrot) vs. Nierenarterie (NA, dunkelgrün); unten: Pulmonalarterie (PA, dunkelrot) vs. kleine Mesenterialarterien (MA, orange). Es zeigt sich, dass sich einige signifikante Unterschiede in den neuen Vergleichspaaren reproduzieren lassen. Insbesondere Adra1a sticht hier wieder hervor. Die Skalierung der Ordinate ist logarithmisch. Mit einem Stern gekennzeichnete Rezeptor-RNA-Level symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäßen im WILCOXON-Rangsummentest.

Tabelle 13 zeigt die Schnittmengen der Vergleichspaare. Auch hier waren die α_{1A} -Adrenozeptor-RNA-Level die einzigen, die bei allen paarweisen Vergleichen von myogenen mit nicht-myogenen Gefäßen statistisch signifikante Unterschiede zeigten.

	PA vs CA	PA vs NA	PA vs MA
Agtr1a			
Agtr1b			
Avpr1a		p<0,05	p<0,05
Ednra			
Ednrb			p<0,05
Adra1a	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Adra1b			p<0,05
Adra1d			
Adra2a	p<0,05		
Adra2b			
Adrb2	p<0,05		

Tabelle 13: Wie auch in Tabelle 12 werden auch für die Vergleichspaare PA vs. Widerstandsgefäß die statistisch signifikanten Unterschiede aus Abbildung 13 zur Mustererkennung tabuliert. Insbesondere die Ergebnisse des Vergleiches SMA vs. MA lassen sich reproduzieren. Wieder sticht Adra1a hervor. Dessen RNA-Level sind in jedem Widerstandsgefäß gegenüber allen getesteten Leitungsgefäßen erhöht. p<0,05 steht für einen statistisch signifikanten Unterschied im WILCOXON-Rangsummentest.

Abschließend wurden die kumulativen (summierten) Level aller $G_{q/11}$ -koppelnden heptahelikalen Rezeptoren in Widerstands- und Leitungsgefäßen verglichen. Hier zeigt sich einzig für die Kombinationen MA vs. SMA und MA vs. PA signifikante Unterschiede in den Expressionsleveln. Die Tendenz zu geringeren RNA-Leveln in den proximalen Gefäßen war jedoch auch in den anderen beiden Vergleichspaaren ersichtlich, siehe auch Abbildung 14.

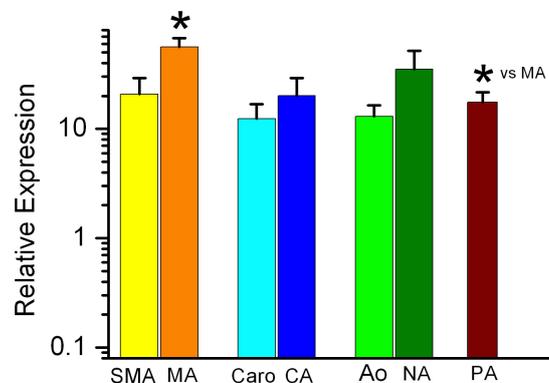


Abbildung 14: Vergleich der kumulativen Rezeptoren-RNA-Level aller an $G_{q/11}$ -koppelnden Rezeptoren eines Gefäßes. Die Level werden, wie auch die statistischen Fehler, addiert. $G_{q/11}$ -koppelnde Rezeptoren wurden selektiv addiert, da sich unter ihnen die meisten durch eine Mehrexpression im Widerstandsgefäß bedingten signifikanten Unterschiede fanden. Nur für die Vergleichspaare SMA vs. MA und PA vs. MA ergeben sich signifikante Unterschiede. Die Tendenz zu vermehrten RNA-Leveln $G_{q/11}$ -koppelnder Rezeptoren im Widerstandsgefäß ist jedoch in allen anderen gezeigten Vergleichspaaren ersichtlich. Möglicherweise ist hier die Fallzahl zu gering gewesen. Dies zeigt, dass anatomisch und funktionell distinkte Gefäßgebiete über ihre RNA-Level von $G_{q/11}$ -koppelnden Rezeptoren unterschieden werden können. Möglicherweise stellen diese Rezeptoren auch Mechanosensoren für den myogenen Tonus dar. Mit einem Stern gekennzeichnete Rezeptor-RNA-Level symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäßen im WILCOXON-Rangsummentest.

3.1.6.2 Rezeptorsubtyp-RNA-Level innerhalb eines Gefäßgebietes Die RNA-Level einzelner Rezeptorsubtypen wurden auch innerhalb eines Gefäßgebietes gegeneinander verglichen, siehe auch den oberen Teil von Tabelle 14. Dabei ergab sich, dass der AT_{1A} -Angiotensinrezeptor in $\frac{5}{7}$ aller Gefäßgebiete signifikant weniger RNA aufwies als der AT_{1B} -Angiotensinrezeptor. Der Unterschied war über alle Widerstandsgefäße hinweg ausgeprägt ($\frac{3}{3}$) und in der Hälfte der Leitungsgefäße ($\frac{2}{4}$).

In $\frac{4}{7}$ aller Gefäßgebiete war die ET_B -RNA gegenüber der ET_A -RNA erhöht, in $\frac{2}{3}$ aller Widerstandsgefäße und in $\frac{2}{4}$ der Leitungsgefäße.

Im Vergleich der α_1 -Adrenozeptor-RNA-Level traten deutlichere Unterschiede zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäßen hervor:

In $\frac{2}{3}$ aller Widerstandsgefäße war die α_{1A} -RNA gegenüber der α_{1B} -RNA erhöht. Dieser Sachverhalt fand sich in keinem Leitungsgefäß. Hingegen war in $\frac{2}{4}$ der Leitungsgefäße die α_{1B} -RNA gegenüber der α_{1A} -RNA erhöht, was sich in keinem Widerstandsgefäß fand.

Die α_{1D} -Adrenozeptor-RNA-Level waren in allen Leitungsgefäßen sowohl höher exprimiert als die des α_{1A} als auch des α_{1B} . $\frac{1}{3}$ der Widerstandsgefäße zeigten ebenso eine α_{1D} -Dominanz auf RNA-Ebene gegenüber dem α_{1A} , $\frac{2}{3}$ eine Dominanz gegenüber dem α_{1B} .

In allen untersuchten Gefäßgebieten war die α_{2A} -RNA signifikant gegenüber der α_{2B} -RNA erhöht. Die Ratio $\alpha_{2A}:\alpha_{2B}$ scheint also unspezifisch für Widerstands- oder Leitungsgefäße zu sein.

Damit zeigte sich insbesondere für die α_1 -Adrenozeptoren eine mögliche Eigenschaft, im Verhältnis ihrer Subtypen zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäß differenzieren zu können.

Im unteren Teil von Tabelle 14 finden sich die numerischen Verhältnisse der jeweiligen Adrenozeptoren für Widerstands- und Leitungsgefäße.

	AT _{1A} vs. AT _{1B}	ET _A vs. ET _B	α _{1A} vs. α _{1B}	α _{1A} vs. α _{1D}	α _{1B} vs. α _{1D}	α _{2A} vs. α _{2B}
NA	p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05	p<0,05
Ao	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05
CA	p<0,05					p<0,05
Caro			p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MA	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
SMA	p<0,05	p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05
PA		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

	α _{1A} vs. α _{1B}	$\frac{\alpha_{1B}}{\alpha_{1A}}$	α _{1A} vs. α _{1D}	$\frac{\alpha_{1D}}{\alpha_{1A}}$
NA	α _{1A} > α _{1B}	0,15	n.s.	5,30
Ao	n.s.	2,23	α _{1A} < α _{1D}	26,78
CA	n.s.	1,41	n.s.	1,31
Caro	α _{1A} < α _{1B}	12,82	α _{1A} < α _{1D}	171,06
MA	α _{1A} > α _{1B}	0	α _{1A} < α _{1D}	4,39
SMA	n.s.	1,30	α _{1A} < α _{1D}	6,85
PA	α _{1A} < α _{1B}	20,13	α _{1A} < α _{1D}	231,43

	α _{1A} vs. α _{1B}	$\frac{\alpha_{1B}}{\alpha_{1A}}$	α _{1A} vs. α _{1D}	$\frac{\alpha_{1D}}{\alpha_{1A}}$
Widerstandsgefäße		0,52		3,67
Leitungsgefäße		9,12		109,03

Tabelle 14: Vergleich der einzelnen Rezeptorsubtypen innerhalb eines Gefäßgebietes auf Unterschiede in ihren RNA-Leveln. Dabei wird darauf geachtet, ob für Leitungs- bzw. Widerstandsgefäße auch die Dominanz eines bestimmten Subtypen charakteristisch ist. Zum einen fällt auf, dass eine größere Zahl an signifikanten Unterschieden errechnet wird, als im Vergleich verschiedener Gefäßgebiete gegeneinander. Möglicherweise ist dies durch den Vergleich von Expressionsleveln desselben Gewebes bedingt. Zum anderen fallen folgende Charakteristika auf: AT_{1B}-RNA-Level dominieren in fast allen Gefäßen gegenüber den RNA-Leveln von AT_{1A}. ET_B-RNA-Level dominieren in der Mehrzahl aller Gefäße gegenüber den RNA-Leveln von ET_A. p<0,05 steht dabei für einen statistisch signifikanten Unterschied im WILCOXON-Rangsummentest. Der linke Teil der unteren Tabelle zeigt die Ergebnisse der Testung von α_{1A}- gegen α_{1B}-Adrenozeptor-RNA-Level: Dabei zeigt sich, dass in keinem Leitungsgefäß das Verhältnis α_{1A}>α_{1B} erreicht wird und in keinem Widerstandsgefäß das Verhältnis α_{1A}<α_{1B}. Deutlicher tritt dies in der Ratio α_{1B}: α_{1A} hervor: Hohe Werte sind für Leitungsgefäße charakteristisch, niedrige Werte für Widerstandsgefäße. Im rechten Teil der unteren Tabelle sind die Ergebnisse der Testung von α_{1A}- gegen α_{1D}-Adrenozeptor-RNA-Level gezeigt. Zwar ist sowohl in Leitungs- als auch in Widerstandsgefäßen hinweg eine Dominanz der α_{1D}- gegenüber den α_{1A}-Adrenozeptor-RNA-Leveln ersichtlich; jedoch zeigt die Ratio aus den beiden Leveln, dass in Widerstandsgefäßen tendenziell niedrigere Werte erreicht werden als in Leitungsgefäßen. Aufgetragen sind die Gefäßgebiete (NA, Ao, CA, Caro, MA, SMA, PA) gegen die Vergleichsgruppen. Am Ende der unteren Tabelle wird die jeweils mittlere gemeinsame Ratio von Widerstands- und Leitungsgefäßen gezeigt.

Zusammenfassend konnten mit der qPCR folgende Befunde erhoben werden:

1. Im Rezeptorsubtyp, der innerhalb eines Gefäßgebietes exprimiert wird, scheinen charakteristische Unterschiede zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäßen zu bestehen. So war die RNA-Ratio α_{1D}: α_{1A} in Leitungsgefäßen um den Faktor 30 gegenüber derselben Ratio in Widerstandsgefäßen erhöht. Möglicherweise bestimmt damit auch die Ratio der genannten Rezeptoren das Verhalten eines Gefäßes auf Druckerhöhung.

2. Vor allem aber gibt es zwischen Widerstands- und Leitungsgefäßen Unterschiede in den RNA-Leveln einzelner 7TMR. Insbesondere $G_{q/11}$ -koppelnde 7TMR scheinen in Widerstandsgefäßen höher exprimiert zu werden als in Leitungsgefäßen. Hierunter fallen die folgenden Rezeptoren: AT_{1B} -Angiotensinrezeptor, ET_A -Endothelinrezeptor, ET_B -Endothelinrezeptor, V_{1A} -Vasopressinrezeptor, α_{1A} -Adrenozeptor.

Diese 7TMR könnten also eine Rolle als Mechanosensoren für den myogenen Tonus spielen. Damit waren sie als vielversprechende Kandidaten für eine pharmakologische Hemmung im folgenden Kapitel identifiziert.

3.2 Die Rolle von $G_{q/11}$ -koppelnden Rezeptoren für die myogene Vasokonstriktion in isolierten Mesenterialarterien

3.2.1 Test der Daten auf Normalverteilung

Auch bei den Daten zum myogenen Tonus musste initial die statistische Verteilung bestimmt werden, um später den adäquaten statistischen Test anwenden zu können.

Dazu wurden zum einen die Messwerte des myogenen Tonus bei 5 mmHg für MT_1 und MT_2 jeweils in einen QQ-Plot (Quantil-Quantil-Diagramm) integriert, siehe Abbildung 15.

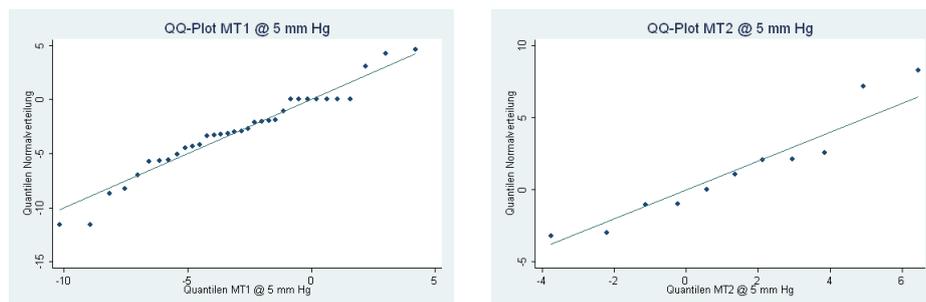


Abbildung 15: Sog. QQ-Plots (Quantil-Quantil-Diagramme) der MT_1 (linke Bildhälfte)- und MT_2 -Werte (rechte Bildhälfte) bei 5 mmHg. Dabei werden die Messwerte in Quantilen transformiert. Diese werden den Quantilen der Standardnormalverteilung zugeordnet. Liegen die Punkte auf der Winkelhalbierenden (entspricht der in beiden Bildhälften eingezeichneten Geraden), kann die Gleichheit der beiden Verteilungen angenommen werden, in diesem Fall die Normalverteilung der Messwerte. Für beide Kurven zeigt sich, dass sie entlang der Geraden verlaufen. Damit kann für die Messwerte von MT_1 wie für MT_2 bei 5 mmHg vermutet werden, dass sie normalverteilt sind. Gesichert wurde die Vermutung durch den Test nach SHAPIRO-WILK.

Das Ergebnis legte die Vermutung einer Normalverteilung der Messwerte für MT_1 wie auch für MT_2 nahe. Bestätigt wurde die Vermutung durch ein positives Ergebnis des SHAPIRO-WILK-Tests auf Normalverteilung.

Zur Sicherheit wurden auch die Tonuswerte bei 50 mmHg als QQ-Plot dargestellt, siehe Abbildung 16:

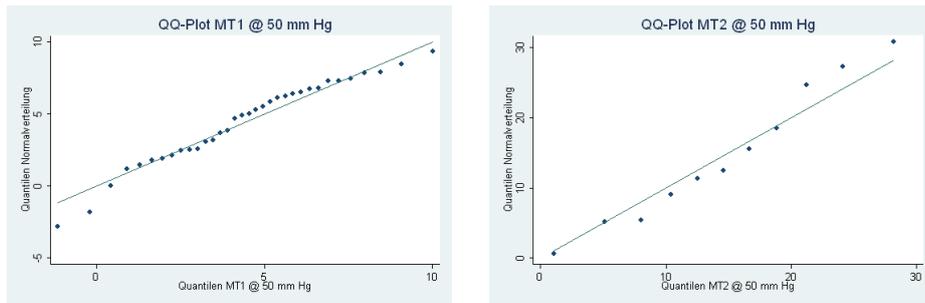


Abbildung 16: Sog. QQ-Plots der MT_1 (linke Bildhälfte)- und MT_2 (rechte Bildhälfte)-Werte bei 50 mmHg. Auch hier scheinen die Messwerte der Winkelhalbierenden zu folgen. Damit kann auch für die Messwerte von MT_1 wie von MT_2 bei 50 mmHg vermutet werden, dass sie normalverteilt sind. Gesichert wurde die Vermutung durch den Test nach SHAPIRO-WILK.

Auch hier ergab sich nach SHAPIRO-WILK das Ergebnis einer Normalverteilung für MT_1 und MT_2 . Dies machte die Anwendung des Student-t-Tests für die Auswertung zulässig.

3.2.2 Qualitative Auffälligkeiten bei der Messung des myogenen Tonus

Die analysierten Gefäße ($n=39$) hatten einen mittleren Durchmesser von $118 \pm 2 \mu\text{m}$ bei 20 mmHg.

Es wurden nur Gefäße analysiert, die einen myogenen Tonus (siehe auch Gleichung 7) unter einer initialen Druckleiter ausbildeten. Auf die erste Druckkurve folgte eine zweite mit Applikation von Pharmaka. Relativ zur ersten Kurve des myogenen Tonus war eine Linksverschiebung der zweiten Kurve feststellbar. Dies wurde als eine gesteigerte Kontraktilität der glatten Muskelzellen interpretiert.

Interessanterweise ließ sich der Kurvenverlauf des zur ersten Druckleiter gehörigen myogenen Tonus (MT_1) mit einer doppelt-s-förmigen Regressionskurve erfassen (im Folgenden bisigmoid bezeichnet), wohingegen der zweite ausgebildete myogene Tonus (MT_2) mit einer einfach sigmoiden Regression besser abgebildet war (im Folgenden monosigmoid bezeichnet) (Abbildung 17). Der Unterschied zwischen den Tonuswerten bei definierten Druckstufen war zum Teil höchst signifikant ($p < 0,001$). Bei 120 mmHg als höchster Druckstufe verschwand jedoch der statistisch signifikante Unterschied. Dies könnte als zunehmende Ansprechbarkeit des Gefäßes im Laufe der MT_1 -Druckleiter interpretiert werden.

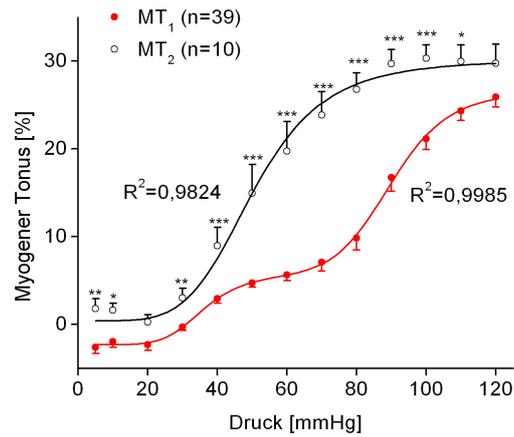


Abbildung 17: Myogener Tonus während der ersten Druckleiter (MT₁, rot) und während der zweiten Druckleiter (MT₂, schwarz). Die Messungen wurden in Abwesenheit von Pharmaka, isobar, ohne Fluss an Mesenteriarterien dritter oder vierter Ordnung aus im Mittel 13,7 Wochen alten männlichen Mäusen vom Stamm FVB/N mit einem mittleren Gewicht von 29,3 Gramm durchgeführt. Die Registrierung des Gefäßaußendurchmessers zur Berechnung des myogenen Tonus erfolgte im Gleichgewichtszustand. Zur Berechnung wurden die Gefäßdurchmesser während der ersten und zweiten Druckleitern auf den Durchmesser der dritten Druckleiter in kalziumfreiem Puffer normiert. Zwischen den beiden Druckleitern lagen 35 Minuten Ruhezeit. R² bezeichnet den Determinationskoeffizienten der Regression. Dieser beziffert den Anteil der regressionsbedingten Varianz an der Gesamtvarianz der Daten. Ein Wert von 1 bedeutet, dass das Regressionsmodell alle Varianz der Daten abdeckt und damit die perfekte Regression darstellt. Die Daten werden also sehr gut durch die beiden Regressionsmodelle erfasst. Auffällig ist ein bisigmoider Verlauf von MT₁ und eine Linksverschiebung mit Transition zu monosigmoid von MT₂. Punkte zeigen Mittelwerte, Balken den Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n steht für die Anzahl der Einzelmessungen. Die Signifikanzen im Student-t-Test sind mit *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ und ***= $p < 0,001$ angegeben.

Die mathematische Gleichung für die MT₁-Funktion wurde wie folgt bestimmt:

$$y = A_0 + \frac{(A_1 - A_0) \cdot x^{n_1}}{l^{n_1} + x^{n_1}} + \frac{(A_2 - A_1 + A_0) \cdot x^{n_2}}{r^{n_2} + x^{n_2}} \quad (8)$$

Die mathematische Gleichung für die MT₂-Funktion wurde wie folgt bestimmt:

$$y = A_0 + \frac{(A_1 - A_0) \cdot x^n}{k^n + x^n} \quad (9)$$

Parameter	MT ₁ -Kurve ± Regressionsfehler	Parameter	MT ₂ -Kurve ± Regressionsfehler
A ₀	-2,32 ±0,17	A ₀	0,41 ±0,36
A ₁	5,76 ±0,62		
A ₂	28,86 ±1,14	A ₁	30,15 ±2,05
l	36,00 ±1,41	k	50,49 ±2,88
n ₁	5,96 ±0,86	n	4,94 ±0,97
r	89,94 ±1,43		
n ₂	10,90 ±1,61		

Tabelle 15: Die errechneten Parameter der bisigmoiden MT₁-Funktion und der monosigmoiden MT₂-Funktion mit dem dazugehörigen Fehler.

Während MT₁ mussten noch Adaptationen in der Longitudinalspannung des Gefäßes vorgenommen werden, um ein seitliches Ausweichen des Gefäßes unter Druckapplikation zu vermeiden. Somit konnte die Analyseregion des Videomikroskops (*region of interest*, ROI) konstant gehalten werden. Da die finale Länge unter den folgenden zwei Druckleitern unverändert blieb, wurden zum Vergleich zwischen Kontroll- und Interventionsgruppen nur die MT₂-Werte verwendet.

Um einen Einfluß der Longitudinalspannung während MT₁ auf den Kurvenverlauf zu untersuchen, wurde der Kurvenverlauf derjenigen Gefäße analysiert bei denen keine zusätzliche Longitudinalspannung nötig war (Abbildung 18). Auch hier blieb die bisigmoide Form erhalten, was einen Einfluss von Longitudinalspannung unwahrscheinlich machte.

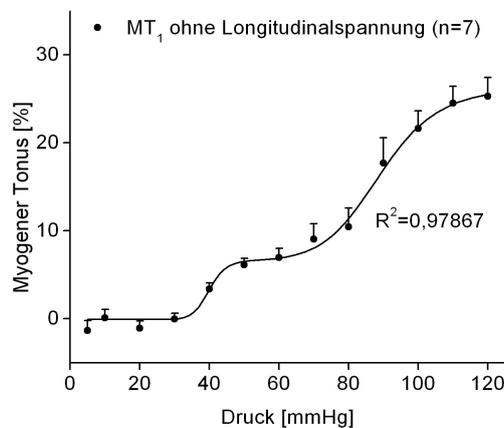


Abbildung 18: MT₁ ohne Längsspannung. Bei einigen Gefäßen war es nicht nötig, eine Adaptation der Längsspannung während der Messprozedur vorzunehmen. Der zu diesen Gefäßen gehörige MT₁-Verlauf zeigt ebenfalls eine bisigmoide Form. Damit ist unwahrscheinlich, dass die Adaptation der Längsspannung während der Messung die Bisigmoidalität als Artefakt verursacht hat.

Um die Hintergründe der unterschiedlichen Kurvenverläufe erfassen zu können, wurde die Wandspannung („stress“) gegen die Gefäßdehnung („strain“) aufgetragen, siehe auch Abbildung 19. Strain errechnete sich aus der relativen Durchmesseränderung, wobei die Bezugsgröße der Ausgangsdurchmesser war. Stress errechnete sich näherungsweise aus dem Produkt von intraluminalen Druck und Strain.

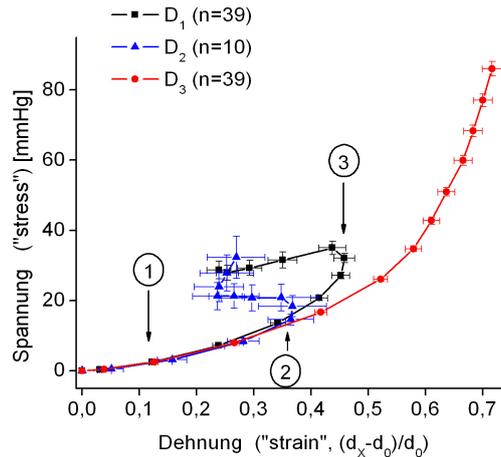


Abbildung 19: Spannungs-Dehnungskurven aller drei Druckleiter. Auf der Abszisse findet sich die Dehnung als Differenz des aktuellen Durchmesserwerts zum Ausgangsdurchmesser normiert auf den Ausgangsdurchmesser. Die Ordinate zeigt die Wandspannung, vereinfacht ausgedrückt als Produkt von intravasalem Druck (in mmHg) und relativem Durchmesserwert (ohne Einheit). Die schwarze Kurve zeigt die Kurve der ersten Druckleiter, die blaue die der zweiten Druckleiter und die rote die der dritten Druckleiter. Beginn aller drei Kurven ist bei 0/0. Ein Kurvenverlauf nach rechts, d.h. eine Zunahme von Dehnung und Spannung, impliziert eine Dehnung des Gefäßes. Ein Kurvenverlauf nach links, d.h. eine Abnahme der Dehnung unter gleichbleibender oder abnehmender Spannung impliziert eine Konstriktion des Gefäßes. Punkt 1 bezeichnet beispielhaft einen Punkt, an dem alle drei Kurven noch parallel verlaufen. An Punkt 2 trennt sich der Verlauf aller drei Kurven. Da Kurve D_3 in kalziumfreiem Puffer registriert wurde und demzufolge der passiven Dehnungskurve des Gefäßes entspricht, kann für die beiden anderen Kurven geschlossen werden, dass sie bis zu Punkt 2 ebenfalls einer passiven Dehnung entsprechen. Kurve D_1 weicht anschließend von Punkt 2 bis zu Punkt 3 unter zunehmender Steilheit von Kurve D_3 ab um dann einen konstriktionstypischen Verlauf nach links zu zeigen. Hier versteift sich das Gefäß also ohne Durchmesserverkürzung. Bei Punkt 3 (entspricht 60-70 mmHg) zeigt die MT_1 -Kurve ihr Plateau. Kurve D_2 impliziert bereits ab Punkt 2 eine Konstriktion des Gefäßes. Während des zweiten myogenen Tonus kommt es also nicht zu einer Versteifung.

Die Verläufe werden im Folgenden analysiert. In der Grafik finden sich Ziffern, die einzelne Punkte der Graphen genauer bezeichnen.

1. D_1 , D_2 und D_3 laufen anfangs nahezu parallel (Punkt 1).
2. D_1 dissoziiert von D_3 mit einer Zunahme der Kurvensteilheit (Punkt 2). Da die Gefäßdehnung (*strain*) weiter zunimmt, kann keine Konstriktion vorliegen, da diese mit einer Radiusverkleinerung einhergehen würde. Die Dissoziation ist also durch eine Gefäßversteifung bedingt, was sich bei einem Exponentialregression im betrachteten Kurvenausschnitt in einer Zunahme des Steifheitskoeffizienten β zeigt (siehe zur Versteifung auch weiter unten die Bestimmung des Steifheitskoeffizienten). Im weiteren Verlauf nimmt die D_1 -Dehnung ab, das Gefäß konstringiert sich (Punkt 3).
3. Die Dehnung von D_2 nimmt unmittelbar im Anschluss an den kurvenparallelen Verlauf zu D_3 ab, was einer Konstriktion gleichkommt (Punkt 3). Hier ist keine nennenswerte Versteifung ohne Radiusverkleinerung zu bemerken. Da die Konstriktion auf einer früheren Spannungsstufe (*stress*) als bei D_1 erfolgt, kann von einer Sensibilisierung gesprochen werden.

Eine weitere Methode, eine Zunahme an Rigidität der Gefäßwand ohne apparente Verkleinerung des Lumens festzustellen, besteht in der Bestimmung des Steifheitskoeffizienten (*stiffness coefficient*) (Resch *et al.*, 2009; Sachidanandam *et al.*, 2009). Dieser kann berechnet werden, wenn die Stress-Strain-Datenpunkte einer Exponentialregression unterzogen werden:

$$y = a \cdot e^{\beta \cdot x} \quad (10)$$

wobei

y =Wandspannung

a =Proportionalitätsfaktor

β =Steifheitskoeffizient

x =Diameter

Je größer β , desto rigider ist das Gefäß. Eben dies zeigt sich beim Vergleich mit dem passiven Zustand über dem relevanten Druckbereich (5-70 mmHg), siehe Abbildung 20. 70 mmHg entspricht dabei Punkt 3 in Abbildung 19, also dem Punkt, an dem die Konstriktion gerade noch nicht eingesetzt hat.

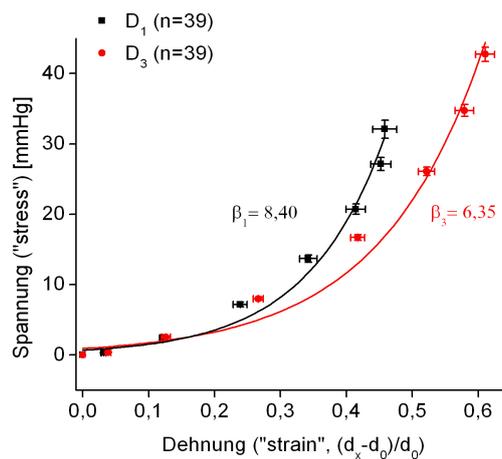


Abbildung 20: Spannung-Dehnungskurven und Steifheitskoeffizienten (β) von D₁ (schwarz) und D₃ (rot) im Druckbereich 5-70 mmHg. Als Regressionsmodell dient eine Exponentialfunktion, deren Exponent den Steifheitskoeffizienten β liefert. D₁ zeigt mit 8,40 einen signifikant größeren Koeffizienten als D₃ mit 6,35. Dies impliziert eine Gefäßversteifung während der Registrierung von D₁ im Druckbereich 5-70 mmHg.

Die Gleichungen der Regressionsfunktionen lauten:

D₁ (Druckleiter 1):

$$y = 0,66 \cdot e^{8,40 \cdot x} \quad (11)$$

D₃ (Druckleiter 3):

$$y = 0,67 \cdot e^{6,35 \cdot x} \quad (12)$$

Der Unterschied zwischen den Steifheitskoeffizienten ist statistisch signifikant ($p=0,03$). Damit weist das Gefäß im Verlauf der ersten Druckleiter von 5-70 mmHg eine größere Wandsteife durch Konstriktion auf als während der dritten Druckleiter.

3.2.3 Der myogene Tonus unter Losartan

Aufbauend auf Vorarbeiten (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008) fand zunächst eine Testung des Einflusses von AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptoren auf die vaskuläre Mechanosensitivität statt. Auch im Hinblick auf die RNA-Level der Rezeptoren (signifikante Erhöhung für AT_{1B} in kleinen Zerebral- und Mesenterialarterien gegenüber ihrem jeweiligen zuführenden Leitungsgefäß) schien dieser Ansatz sinnvoll.

Die genannten Rezeptoren wurden mit 10 µM Losartan (Losa), einem inversen Agonisten, gehemmt. Zunächst wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit geprüft, ob die in der Kontrollgruppe vorhandene Linksverschiebung sich auch unter Losartanapplikation darstellen würde.

Wie in Abbildung 21 oben links zu sehen ist, blieb

1. die bisigmoide MT₁-Form erhalten
2. die Linksverschiebung von MT₁ zu MT₂ erhalten.

Nun wurden die MT₂-Verläufe der Losartangruppe mit der Kontrollgruppe (PSS) verglichen (Abbildung 21 unten). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

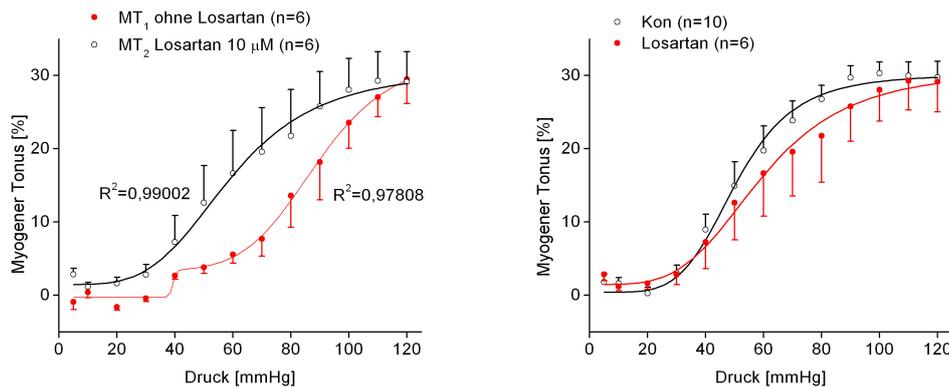


Abbildung 21: Die linke Bildhälfte zeigt den myogenen Tonus von Mesenterialarterien der zur Messung des Losartaneffekts verwendeten Gefäße. Die rote Kurve stellt den bisigmoiden Verlauf der MT_1 -Kurve dieser Gruppe (ohne Losartan) im Vergleich zur MT_2 -Kurve (unter Losartan) dar. Die zur Messung des Losartaneffekts verwendeten Gefäße unterscheiden sich damit nicht von der Grundgesamtheit. Auch unter Losartan zeigte sich eine Linksverschiebung und Transition zu monosigmoid. Die rechte Bildhälfte zeigt den myogenen Tonus von Mesenterialarterien in Abwesenheit (Kon = Kontrolle, schwarz) und Anwesenheit (Losartan, rot, gleiche Kurve wie im linken Bildteil in schwarz) von Losartan. Dabei wurden jeweils die MT_2 -Kurven aufgetragen. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar. In oxygeniertem PSS gelöstes Losartan wurde in der Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$ über eine Peristaltikpumpe eingewaschen. Dabei wurde das Pharmakon so vortemperiert, dass die Lösung während des Einwaschprozesses nicht unter 37°C abkühlte. n steht für die Anzahl der Einzelmessungen.

Parameter	MT_2 -Kurve (Kon) \pm Regressionsfehler	MT_2 -Kurve (Losa) \pm Regressionsfehler	p-Wert
A_0	$0,41 \pm 0,36$	$1,46 \pm 0,32$	0,06
A_1	$30,15 \pm 2,05$	$30,73 \pm 2,20$	0,85
k	$50,49 \pm 2,88$	$59,43 \pm 3,60$	0,09
n	$4,94 \pm 0,97$	$3,86 \pm 0,54$	0,36

Tabelle 16: Die errechneten Parameter der MT_2 -Funktion mit den dazugehörigen Fehlern unter Kontrollbedingungen (Kon) und unter $10 \mu\text{M}$ Losartan (Losa). In der rechten Spalte wird der dazugehörige p-Wert des Student-t-Tests auf signifikante Unterschiede der Parameter aufgeführt. Da das Signifikanzniveau von 0,05 in keinem Fall erreicht wird, kann kein Unterschied konstatiert werden.

3.2.4 Der myogene Tonus in Mesenterialarterien unter Vierfachantagonisierung

Ausgehend von der Zentralhypothese, der Mechanosensitivität $G_{q/11}$ -koppelnder Rezeptoren, wurde ein Konzept aufgestellt, mit dem eine maximale Hemmwirkung eines möglichst großen Anteils an in Widerstandsgefäßen hoch exprimierten 7TMR erreicht werden sollte:

- ▷ Relcovaptan, 20 nM , als Antagonist an V_{1A} -Rezeptoren,
- ▷ Candesartan, $1 \mu\text{M}$, als inverser Agonist mit höherer Affinität als Losartan an AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptoren,
- ▷ BQ-123, $1 \mu\text{M}$, als Antagonist an ET_A -Rezeptoren sowie

▷ Prazosin, 1 μM , als inverser Agonist an α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Rezeptoren

wurden gemeinsam appliziert (im Folgenden mit RCBP abgekürzt). Die Zusammenstellung der zu hemmenden Rezeptoren basierte auf den Expressionsstudien unter 3.1, im Speziellen für Mesenterialarterien, da dieses Gefäßgebiet Gegenstand aller Arteriographieexperimente war.

Auch für dieses Experiment blieben bisigmoide MT_1 -Form und Linksverschiebung erhalten (Abbildung 22 links). Die MT_2 -Kurve unterschied sich jedoch signifikant von der Kontrollgruppe (Abbildung 22 rechts). Der Unterschied war jedoch nicht als Änderung der Drucksensibilität aufzufassen (die Wendepunkte der Kurven waren nahezu identisch). Vielmehr zeigte sich der Unterschied in einer Reduktion des myogenen Tonus bei höheren Druckwerten, beginnend bei 90 mmHg.

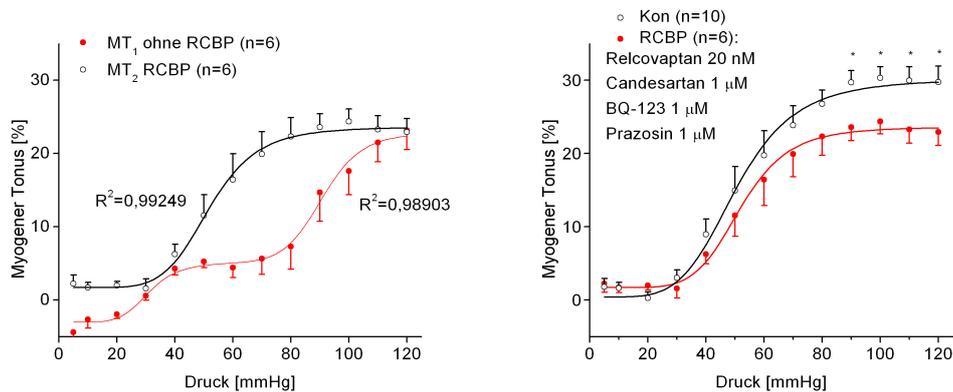


Abbildung 22: Die linke Bildhälfte zeigt den myogenen Tonus von Mesenterialarterien der zur Messung des RCBP-Effekts verwendeten Gefäße. Die rote Kurve stellt den bisigmoide Verlauf der MT_1 -Kurve dieser Gruppe (ohne RCBP) im Vergleich zur MT_2 -Kurve (unter RCBP) dar. Die zur Messung des RCB-Effekts verwendeten Gefäße unterscheiden sich damit nicht von der Grundgesamtheit. Auch unter RCBP bleibt die Linksverschiebung und Transition zu monosigmoide erhalten. Die rechte Bildhälfte zeigt den myogenen Tonus von Mesenterialarterien in Abwesenheit (Kon = Kontrolle, schwarz) und Anwesenheit (RCBP, rot, gleiche Kurve wie im linken Bildteil in schwarz) von RCBP. Dabei wurden jeweils die MT_2 -Kurven aufgetragen. Ab Druckstufe 90 mmHg ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar. Die Pharmaka wurden in den folgenden Endkonzentration in oxygeniertem PSS gelöst über eine Peristaltikpumpe eingewaschen: Relcovaptan 20 nM, Candesartan 1 μM , BQ-123 1 μM , Prazosin 1 μM . Dabei wurden die gelösten Pharmaka so vortemperierte, dass die Lösung während des Einwaschprozesses nicht unter 37 °C abkühlte. n steht für die Anzahl der Einzelmessungen. Die Signifikanzen im Student-t-Test sind mit $*=p<0,05$ angegeben.

Parameter	MT ₂ -Kurve (Kon) ± Regres- sionsfehler	MT ₂ -Kurve (RCBP) ± Re- gressionsfehler	p-Wert
A ₀	0,4 1±0, 36	1,70 ±0, 24	0,02
A ₁	30,15 ±2, 05	23,61 ±0, 81	0,02
k	50,49 ±2, 88	52,03 ±1, 48	0,65
n	4,94 ±0, 97	6,27 ±0, 82	0,33

Tabelle 17: Die errechneten Parameter der MT₂-Funktion mit den dazugehörigen Fehlern unter Kontrollbedingungen (Kon) und unter 20 nM Relcovaptan, 1 µM Candesartan, 1 µM BQ-123 und 1 µM Prazosin (RCBP). In der rechten Spalte wird der dazugehörige p-Wert des Student-t-Tests auf signifikante Unterschiede der Parameter aufgeführt. Für den Parameter A₁ wird das Signifikanzniveau erreicht, RCBP vermindert also signifikant die Amplitude des myogenen Tonus. Darüberhinaus fällt eine Erhöhung des initialen Tonusniveaus unter RCBP auf (Parameter A₀).

3.2.5 Der myogene Tonus unter Prazosinapplikation

Im RCBP-Experiment handelt es sich um eine Mischung verschiedener Pharmaka, die einen Effekt in ihrer kumulativen Wirkung erzielen. In der Folge interessierte, wie groß der relative Anteil einer Einzelsubstanz an der Gesamtwirkung war. Dazu wurde Prazosin aus den folgenden Gründen gewählt:

1. Zwar ist Prazosin ein unselektiver inverser Agonist für alle α_1 -Adrenozeptoren, also α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} . In den analysierten Mesenterialarterien konnte in der qPCR jedoch kein α_{1B} -Adrenozeptor nachgewiesen werden. Für den verbliebenen α_{1A} -Adrenozeptor als Mechanosensor sprach, dass er, anders als der α_{1D} -Adrenozeptor, in allen Vergleichen zwischen Widerstands- und Leitungsgefäßen in den Widerstandsgefäßen höhere RNA-Level aufwies. Insofern wäre hier eine eindeutige Aussage möglich.
2. Auch intraindividuell gesehen, d.h. auf einer Skala, auf der die Level innerhalb eines Gefäßtyps verglichen werden, war der α_{1A} -Adrenozeptor unter den Rezeptoren mit den höchsten RNA-Levels. Hohe Level lassen auf eine fundamentale Rolle auch in mechanoperzeptiver Sicht schließen.

Wie auch schon unter RCBP und RCB ergab die Registrierung des myogenen Tonus unter Gegenwart von Prazosin Folgendes (siehe auch Abbildung 23) :

- ▷ Erhalt der bisigmoiden MT₁-Kurve
- ▷ Linksverschiebung von MT₁ nach MT₂
- ▷ Amplitudenreduktion des myogenen Tonus
- ▷ Keine Rechtsverschiebung gegenüber der Kontrollgruppe

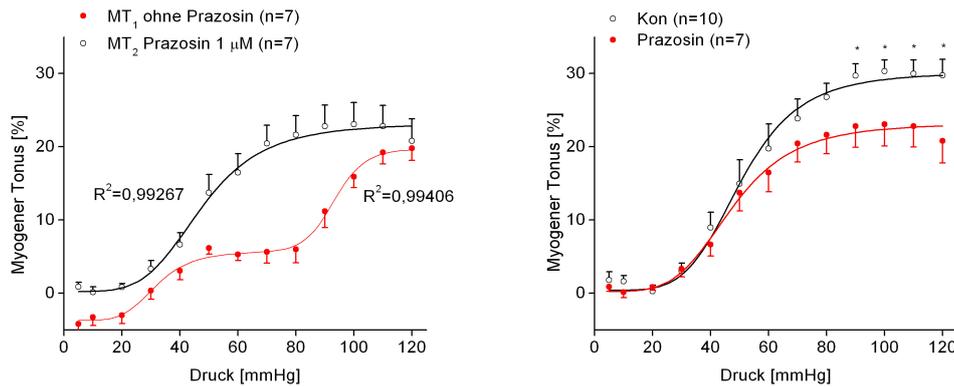


Abbildung 23: Die linke Bildhälfte zeigt den myogenen Tonus von Mesenterialarterien der zur Messung des Prazosineffekts verwendeten Gefäße. Die rote Kurve stellt den bisigmoiden Verlauf der MT_1 -Kurve dieser Gruppe (ohne Prazosin) im Vergleich zur MT_2 -Kurve (unter Prazosin) dar. Die zur Messung des Prazosineffekts verwendeten Gefäße unterscheiden sich damit nicht von der Grundgesamtheit. Auch unter Prazosin bleibt die Linksverschiebung und Transition zu monosigmoid erhalten. Die rechte Bildhälfte zeigt den myogenen Tonus von Mesenterialarterien in Abwesenheit (Kon = Kontrolle, schwarz) und Anwesenheit (Prazosin, rot, gleiche Kurve wie im linken Bildteil in schwarz) von $1 \mu\text{M}$ Prazosin. Dabei wurden jeweils die MT_2 -Kurven aufgetragen. Ab Druckstufe 80 mmHg ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar. Prazosin wurde in der Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$ in oxygeniertem PSS gelöst über eine Peristaltikpumpe eingewaschen. Dabei wurde das gelöste Pharmakon so vortemperiert, dass die Lösung während des Einwaschprozesses nicht unter 37°C abkühlte. n steht für die Anzahl der Einzelmessungen. Die Signifikanzen im Student-t-Test sind mit $*=p<0,05$ angegeben.

Parameter	MT_2 -Kurve (Kon) \pm Regres- sionsfehler	MT_2 -Kurve (Prazo) \pm Re- gressionsfehler	p-Wert
A_0	$0,41 \pm 0,36$	$0,24 \pm 0,13$	0,67
A_1	$30,15 \pm 2,05$	$23,23 \pm 1,05$	0,01
k	$50,49 \pm 2,88$	$47,58 \pm 2,01$	0,43
n	$4,94 \pm 0,97$	$4,41 \pm 0,53$	0,64

Tabelle 18: Die errechneten Parameter der MT_2 -Funktion mit den dazugehörigen Fehlern unter Kontrollbedingungen (Kon) und unter $1 \mu\text{M}$ Prazosin (Prazo). In der rechten Spalte wird der dazugehörige p-Wert des Student-t-Tests auf signifikante Unterschiede der Parameter aufgeführt. Für den Parameter A_1 wird das Signifikanzniveau erreicht, Prazosin vermindert also signifikant die Amplitude des myogenen Tonus.

3.2.6 Der myogene Tonus unter Dreifachantagonisierung

Nachdem die Effektivität von Prazosin ermittelt worden war, sollte die Frage geklärt werden, wie der myogene Tonus unter einem reduzierten Pharmakongemisch aussähe. Zur Beantwortung diene der RCB-Ansatz (Relcovaptan, Candesartan, BQ-123, unter 24 genannte Konzentrationen).

Unter den gleichen Bedingungen wie die vorgenannten Experimente zur pharmakologischen Inhibition des myogenen Tonus wurde RCB eingewaschen und seine Auswirkung auf den myogenen Tonus während MT_2 beobachtet, siehe auch Abbildung 24.

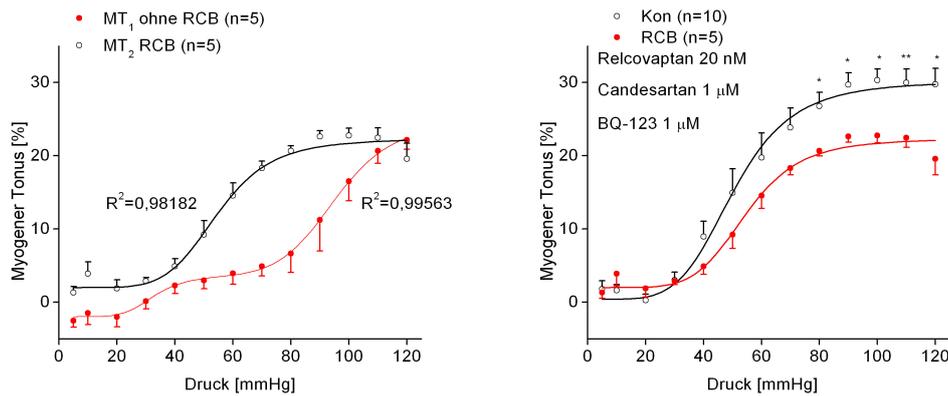


Abbildung 24: Die linke Bildhälfte zeigt den myogenen Tonus von Mesenterialarterien der zur Messung des RCB-Effekts verwendeten GefäÙe (RCB=20 nM Relcovaptan, 1 µM Candesartan, 1 µM BQ-123). Die rote Kurve stellt den bisigmoiden Verlauf der MT₁-Kurve dieser Gruppe (ohne RCB) im Vergleich zur MT₂-Kurve (unter RCB) dar. Die zur Messung des RCB-Effekts verwendeten GefäÙe unterscheiden sich damit nicht von der Grundgesamtheit. Auch unter RCB bleibt die Linksverschiebung und Transition zu monosigmoid erhalten. Die rechte Bildhälfte zeigt den myogenen Tonus von Mesenterialarterien in Abwesenheit (Kon = Kontrolle, schwarz) und Anwesenheit (RCB, rot, gleiche Kurve wie im linken Bildteil in schwarz) von RCB. Dabei wurden jeweils die MT₂-Kurven aufgetragen. Ab Druckstufe 80 mmHg ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar. Die Pharmaka wurden in den folgenden Endkonzentration in oxygeniertem PSS gelöst über eine Peristaltikpumpe eingewaschen: Relcovaptan 20 nM, Candesartan 1 µM, BQ-123 1 µM. Dabei wurden die gelösten Pharmaka so vortemperiert, dass die Lösung während des Einwaschprozesses nicht unter 37 °C abkühlte. n steht für die Anzahl der Einzelmessungen. Die Signifikanzen im Student-t-Test sind mit *=p<0,05 und **=p<0,01 angegeben.

Überraschenderweise war in den folgenden Fakten kein Unterschied zu den unter 3.2.4 und 3.2.5 berichteten Experimenten zu konstatieren:

- ▷ MT₁ hatte einen bisigmoiden Verlauf.
- ▷ Die Linksverschiebung unter RCB blieb gegenüber der MT₁-Kurve erhalten.
- ▷ Die Pharmakabehandlung reduzierte den myogenen Tonus bei höheren Druckwerten (Amplitudenreduktion).
- ▷ Der Wendepunkt der RCB-Kurve unterschied sich nicht vom Wendepunkt der Kontrollkurve (keine Rechtsverschiebung).

Parameter	MT ₂ -Kurve (Kon) ± Regres- sionsfehler	MT ₂ -Kurve (RCB) ± Re- gressionsfehler	p-Wert
A ₀	0,41 ±0,36	2,00 ±0,35	0,02
A ₁	30,15 ±2,05	22,28 ±1,27	0,01
k	50,49 ±2,88	54,79 ±2,54	0,30
n	4,94 ±0,97	5,85 ±1,18	0,57

Tabelle 19: Die errechneten Parameter der MT₂-Funktion mit den dazugehörigen Fehlern unter Kontrollbedingungen (Kon) und unter 20 nM Relcovaptan, 1 µM Candesartan und 1 µM BQ-123 (RCB). In der rechten Spalte wird der dazugehörige p-Wert des Student-t-Tests auf signifikante Unterschiede der Parameter aufgeführt. Für den Parameter A₁ wird das Signifikanzniveau erreicht, RCB vermindert also signifikant die Amplitude des myogenen Tonus. Darüberhinaus fällt eine Erhöhung des initialen Tonusniveaus unter RCB auf (Parameter A₀).

Die offensichtliche Nicht-Additivität der Pharmaka wurde genauer untersucht, indem die Parameter der MT₂-Kurven unter den diversen Pharmaka miteinander verglichen wurden. Im Detail dargestellt sind die Ergebnisse in Tabelle 20. Es zeigte sich Äquivalenz zwischen den MT₂-Kurven unter RCBP und RCB. Hingegen war die Anfangskontraktilität (Parameter A₀) der Gefäße unter Prazosin gegenüber RCBP und RCB bei 5 mmHg reduziert. Da der Tonus bei 5 mmHg unter Prazosin sich nicht von der Kontrollgruppe unterschied, muss gefolgert werden, dass die Kombination RCB die initiale Kontraktilität bei 5 mmHg erhöht. Die Gefäße der RCBP-, RCB-, und Prazosin-Gruppe unterschieden sich voneinander nicht in ihren Kontraktilitäten auf 60 mM KCl (siehe auch hierzu Abschnitt 3.2.7). Funktionelle Ungleichheit der Gefäße durch Fehler bei der Präparation ist damit als Ursache für diese Unterschiede ausgeschlossen.

Parameter	MT ₂ -Kurve (RCBP) ± Regressionsfehler	MT ₂ -Kurve (RCB) ± Regressionsfehler	p-Wert
A ₀	1,70 ± 0,24	2,00 ± 0,35	0,53
A ₁	23,61 ± 0,81	22,28 ± 1,27	0,44
k	52,03 ± 1,48	54,79 ± 2,54	0,42
n	6,27 ± 0,82	5,85 ± 1,18	0,79

Parameter	MT ₂ -Kurve (RCBP) ± Regressionsfehler	MT ₂ -Kurve (Prazo) ± Regressionsfehler	p-Wert
A ₀	1,70 ± 0,24	0,24 ± 0,13	0,003
A ₁	23,61 ± 0,81	23,23 ± 1,05	0,79
k	52,03 ± 1,48	47,58 ± 2,01	0,13
n	6,27 ± 0,82	4,41 ± 0,53	0,12

Parameter	MT ₂ -Kurve (RCB) ± Regressionsfehler	MT ₂ -Kurve (Prazo) ± Regressionsfehler	p-Wert
A ₀	2,00 ± 0,35	0,24 ± 0,13	0,009
A ₁	22,28 ± 1,27	23,23 ± 1,05	0,60
k	54,79 ± 2,54	47,58 ± 2,01	0,09
n	5,85 ± 1,18	4,41 ± 0,53	0,33

Tabelle 20: Die errechneten Parameter der MT₂-Funktion mit den dazugehörigen Fehlern unter RCBP, RCB und Prazosin (Prazo). Obere Tabelle: Vergleich RCBP mit RCB; mittlere Tabelle: Vergleich RCBP mit Prazosin; untere Tabelle: Vergleich RCB mit Prazosin. In der jeweils rechten Spalte wird der dazugehörige p-Wert des Student-t-Tests auf signifikante Unterschiede der Parameter aufgeführt. RCBP vs. RCB (oben): Die Kurven unterscheiden sich in keinem Parameter signifikant. RCBP vs. Prazosin (Mitte): Für den Parameter A₀ wird das Signifikanzniveau erreicht. Die Gefäße scheinen unter RCBP bei 5 mmHg in einem höheren Kontraktilitätszustand vorzuliegen. Das erreichte Tonusmaximum ist jedoch in beiden Kurven gleich. RCB vs. Prazosin (unten): Auch hier liegen die Gefäße bei 5 mmHg unter RCB in einem höheren Kontraktilitätszustand vor. Die Mechanosensitivität scheint jedoch in gleichem Maß gehemmt zu werden wie unter Prazosin.

Eine Zusammenschau der Tonusverläufe unter den applizierten Pharmaka verdeutlicht die Nicht-Additivität der kombinierten Hemmwirkung von RCBP, RCB und Prazosin (Abbildung 25).

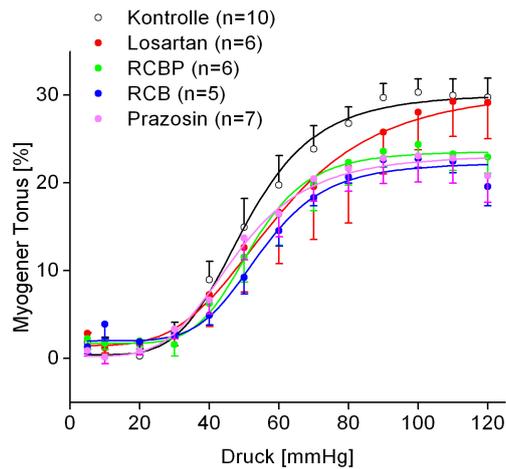


Abbildung 25: Zusammenschau aller Experimente zum Effekt der pharmakologischen Inhibition von Mechanosensitivität. Schwarz: Myogener Tonus unter Kontrollbedingungen (PSS-Lösung), rot: Myogener Tonus unter Losartan, grün: Myogener Tonus unter RCBP, dunkelblau: Myogener Tonus unter RCB, violett: Myogener Tonus unter Prazosin.

3.2.7 Vergleich der depolarisationsinduzierten Konstriktionen

Die Präparation von kleinen Gefäßen ist sehr fehleranfällig. Um Differenzen in der Vitalität der glatten Muskelzellen zwischen den getesteten Gruppen auszuschließen, wurden die Gefäßkonstriktionen auf 60 mM KCl zu Beginn jedes Arteriographieprotokolls zwischen Kontroll- und Interventionsgruppen verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde in keinem Fall erreicht. Auch innerhalb der Interventionsgruppen war kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen. Somit konnten die Gruppen als funktionell gleichwertig gelten und eine Verfälschung der Daten durch unterschiedliche Integrität der Gefäße ausgeschlossen werden.

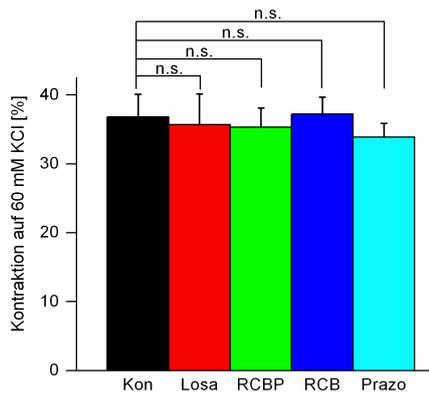


Abbildung 26: Vergleich der Konstriktionsantworten der untersuchten Mesenterialarterien auf 60 mM KCl. Gezeigt sind die Verkürzungen der Gefäße auf 60 mM KCl vor Beginn der ersten Druckleiter bei 40 mmHg intravasalem Druck. Die Konstriktion ist ausgedrückt als prozentuale Durchmesserreduktion relativ zum Ausgangsdurchmesser vor Einwaschen der PSS-Lösung mit 60 mM KCl. Keine Gruppe zeigt Unterschiede zur Kontrollgruppe. Auch die Interventionsgruppen sind in ihren Gefäßkontraktilitäten nicht voneinander verschieden. Damit sind gemessene Unterschiede nicht auf strukturelle Schäden an den Gefäßen zurückzuführen. Kon = Kontrollgruppe, Losa = Losartan, RCBP = Relcovaptan, Candesartan, BQ-123, Prazosin, RCB = Relcovaptan, Candesartan, BQ-123, Prazo = Prazosin; n.s.= statistisch nicht signifikanter Unterschied

4 Diskussion

4.1 7TMR-Rezeptoren-Expressionsprofile

In diesem Unterkapitel werden die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR aus verschiedenen Gefäßen mit der bestehenden Literatur verglichen. Dabei erfolgt die Untergliederung des Unterkapitels nach den einzelnen Rezeptoren. Die Literatur wird aus Gründen der Übersichtlichkeit tabellarisch dargestellt. Die einzelnen behandelten Gefäßgebiete sind wie im Ergebnisteil farbkodiert in den Tabellen dargestellt, siehe auch Kapitel 3.1.6

Eine systematische Erstellung eines quantitativen RNA-basierten Rezeptorenprofils für arterielle Blutgefäße mittels quantitativer RT-PCR ist bisher nur für die Aorta vollzogen worden (Regard *et al.*, 2008). Alle Rezeptor-RNA-Bestimmungen in der vorliegenden Arbeit wurden an ganzen Gefäßen vorgenommen. Deshalb muss für alle RNA-Level die Einschränkung gelten, dass keine Aussage über den Zelltyp getroffen werden kann, aus dem die quantifizierte RNA ursprünglich stammt.

4.1.1 AT₁-Angiotensinrezeptoren

Zeile Nr.	Methode	Gewebe	Spezies	Nachweis beider Rez.	AT _{1B} > AT _{1A}	Weitere Ergebnisse und Besonderheiten	Referenz
-----------	---------	--------	---------	----------------------	-------------------------------------	---------------------------------------	----------

1	in-situ-Hybridisierung	intrarenale Gefäße	Ratte	nein	nein	nur Nachweisversuch für AT _{1A}	Kakinuma <i>et al.</i> , 1993
2	semiquantitative RT-PCR	afferente Glomerulusarteriolen	Ratte	ja	nein	$\frac{AT_{1A}}{AT_{1B}} = \frac{3,7}{1}$	Ruan <i>et al.</i> , 1997
3	isometrische Konstriktionsmessung	isolierte Nierenarterie	Kaninche	nur AT ₁ -Nachweis		keine Subtypisierung	Li <i>et al.</i> , 2001
4	qualitative RT-PCR	kultivierte Aorta-SMC	keine Angaben	ja	nein	Zellkultur potentiell verfälschend (Chamley-Campbell <i>et al.</i> , 1979)	Kakar <i>et al.</i> , 1992
5	semiquantitative RT-PCR mit Autoradiographie	Aorta	Ratte	ja	nein	$\frac{AT_{1A}}{AT_{1B}} = 1$	Kitami <i>et al.</i> , 1992
6	RT-PCR, Restriktionsenzymverdau, Southern Blot	Aorta	Ratte	ja	nein	$\frac{AT_{1A}}{AT_{1B}} = \frac{65}{35}$	Llorens-Cortes <i>et al.</i> , 1994
7	semiquantitative RT-PCR	Aorta abdominalis	Maus	ja	ja	exaktes Verhältnis der vorliegenden Arbeit $\frac{AT_{1A}}{AT_{1B}} = \frac{14}{86}$	Zhou <i>et al.</i> , 2003a
8	quantitative RT-PCR	Aorta	Maus	ja	nein	$\frac{AT_{1A}}{AT_{1B}} = \frac{20}{1}$ andere Referenzgene	Regard <i>et al.</i> , 2008
9	quantitative RT-PCR	Aorta abdominalis	Maus	ja	nein	nur ein Referenzgen; $\frac{AT_{1A}}{AT_{1B}} = 1$	Henriques <i>et al.</i> , 2008
10	Immunfluoreszenz, Western Blot	A. cerebri media	Ratte	nur AT ₁ -Nachweis		keine Subtypisierung	Maddahi & Edvinsson, 2008

11	Immunhisto- chemie, Western Blot, quantitative RT-PCR	Gehirnarterien	Ratte	nur AT ₁ - Nachweis		keine Subtypisierung	Zhou <i>et al.</i> , 2005a
12	isobare Konstriktions- messung	A. basilaris	Maus	ja	nein	Vergleich AT _{1A} -KO vs Wildtyp	Faraci <i>et al.</i> , 2006
13	semiquantitative RT-PCR	Gehirnarterien	Ratte	ja	nein	$\frac{AT_{1A}}{AT_{1B}} \approx \frac{2}{1}$	Bao <i>et al.</i> , 2007
14	semiquantitative RT-PCR	A. carotis	Maus	nur AT ₁ - Nachweis		keine Subtypisierung	Harada <i>et al.</i> , 1999
15	Immunhisto- chemie	A. carotis	Ratte	nur AT ₁ - Nachweis		keine Subtypisierung	Tang <i>et al.</i> , 2011
16	Immunhisto- chemie	A. carotis	Ratte	nur AT ₁ - Nachweis		keine Subtypisierung	Pernomian <i>et al.</i> , 2012
17	semiquantitative RT-PCR	A. carotis	Ratte	ja	nein	$\frac{AT_{1A}}{AT_{1B}} = \frac{10}{1}$; Gefäße ohne Endothel	Tazawa <i>et al.</i> , 1999
18	isometrische Konstriktions- messung	A. carotis	Maus	nein	nein	Ang-II- Kontraktion $\frac{Carotis}{Aorta}$ ≡ RNA-Verhältnis $\frac{Carotis}{Aorta} = \frac{1}{3}$ (Gesamt AT ₁)	Zhou <i>et al.</i> , 2003b
19	Bindungsstudie	isolierte Membran- fraktionen mesenteria- ler Wider- standsgefäße	Ratte	nur AT ₁ - Nachweis		keine Subtypisierung; Nachweis von AT ₁ und AT ₂ in Mesenterialarteri- en	McQueen <i>et al.</i> , 1984
20	RT-PCR, Restriktionsen- zymverdau, Southern Blot	„Mesenterial- arterie“ unklarer anatomischer Herkunft	Ratte	nein	nein	kein Nachweis von AT _{1B} möglich	Llorens- Cortes <i>et al.</i> , 1994

21	isobare Konstriktionsmessung, semiquantitative RT-PCR, Western Blot	Mesenterialarterien zweiter und dritter Ordnung	Ratte	nur AT ₁ -Nachweis		keine Subtypisierung	Touyz <i>et al.</i> , 1999
22	semiquantitative RT-PCR, Western Blot	Mesenterialarterien zweiter und dritter Ordnung	Maus	nur AT ₁ -Nachweis		keine Subtypisierung	Su <i>et al.</i> , 2008
23	qualitative RT-PCR	frisch isolierte SMC aus kleinen Mesenterialarterien	Ratte	nein	nein	nur Nachweisversuch für AT _{1B}	Dimitropoulou <i>et al.</i> , 2001
24	quantitative RT-PCR	Mesenterialarterien erster oder zweiter Ordnung	Ratte	nein	nein	nur Nachweisversuch für AT _{1A}	Lindstedt <i>et al.</i> , 2009
25	isometrische Konstriktionsmessung, semiquantitative RT-PCR mit Restriktionsenzymverdau	Mesenterialarterien <150 µm	Maus	ja	ja	errechnete Ratio (98% AT _{1B}) entspricht der vorliegend bestimmten (96%)	Zhou <i>et al.</i> , 2005b
26	flusskontrollierte Organperfusion	A. pulmonalis und periphere Äste	Ratte	nur AT ₁ -Nachweis		keine Subtypisierung	Chassagne <i>et al.</i> , 2000
27	Northern Blot	Truncus pulmonalis	Ratte	ja	nein	$\frac{AT_{1A}}{AT_{1B}} \approx 1$	Martin <i>et al.</i> , 1995

28	isometrische Konstriktionsmessung	Truncus pulmonalis und A. pulmonalis	Kaninche	ja	nein	Truncus: $AT_{1A} > AT_{1B}$ A. pulmonalis: $AT_{1A} \approx AT_{1B}$	Tan & Sim, 2000
29	quantitative RT-PCR	A. pulmonalis	Maus	nur AT_{1B} -Nachweis		keine Subtypisierung	Tanabe <i>et al.</i> , 2006

Tabelle 21: Vergleichende Darstellung der Expression von AT_1 -Angiotensinrezeptoren aus der Literatur: Die Hintergrundfarben kodieren für die folgenden Gefäße: dunkelgrün: Nierenarterie; hellgrün: Aorta; dunkelblau: Gehirnarterien; hellblau: A. carotis; orange: kleine Mesenterialarterien; dunkelrot: A. pulmonalis

Die vorliegende Arbeit weist für jedes untersuchte Gefäßgebiet das Vorkommen von AT_{1A} - und AT_{1B} -RNA nach. Dabei zeigte sich der AT_{1B} in den meisten Gefäßgebieten relativ zum AT_{1A} als stärker exprimiert. Übersichtshalber sind die Verhältnisse in Abbildung 27 dargestellt.

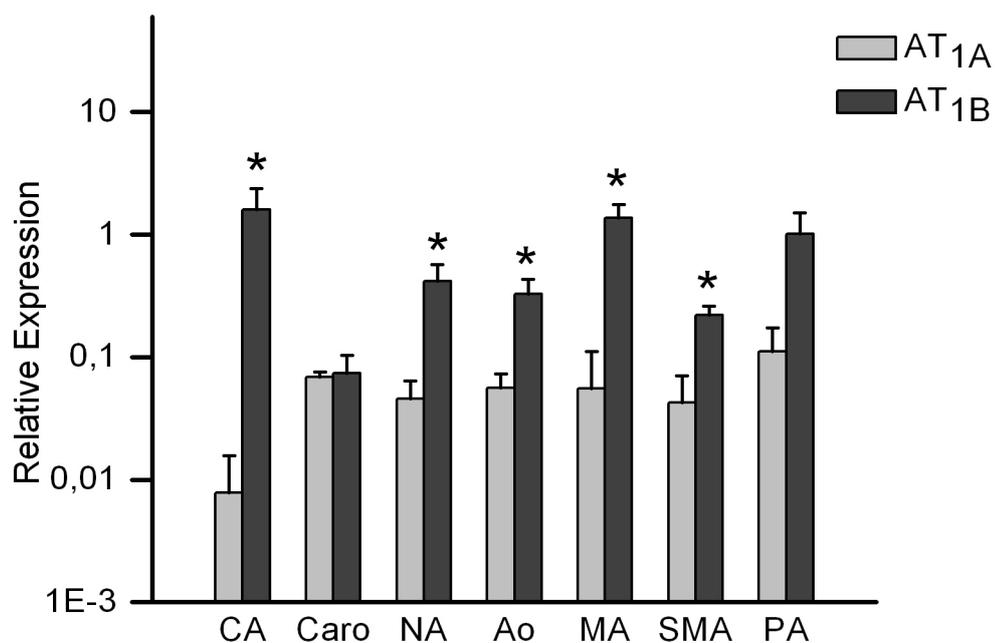


Abbildung 27: Dargestellt sind die RNA-Level des AT_{1A} - (hellgrau) und AT_{1B} -Rezeptors (dunkelgrau) in den untersuchten Gefäßgebieten. Es fällt auf, dass in den meisten Gefäßen der AT_{1B} -Rezeptor signifikant höhere RNA-Level aufweist als der AT_{1A} -Rezeptor. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert und zeigt die auf die Referenzgene *Hprt1*, *Ywhaz* und *Sdha* normierten RNA-Level der Rezeptoren. Die Abszisse zeigt die auf die Rezeptortranskription untersuchten Gefäßgebiete. Folgende Abkürzungen finden dabei Verwendung: CA = Gehirnarterien, Caro = A. carotis, NA = Nierenarterie, Ao = Bauchaorta, MA = kleine Mesenterialarterien, SMA = A. mesenterica superior, PA = Pulmonalarterie; * = $p < 0,05$ für AT_{1A} vs. AT_{1B}

Der bisherige Erkenntnisstand zur vaskulären AT₁-Subtypisierung in der Literatur lässt sich schwer zu einer einheitlichen Aussage zusammenfassen. Die Gründe hierfür sind z.B. die Wahl anderer Methodiken und anderer Spezies. Auch mit der gleichen Methodik in der gleichen Spezies untersucht, unterliegen RNA-Level einer zeitlichen Variabilität. Somit trägt der Untersuchungsgegenstand selbst zu einer erschweren Vergleichbarkeit verschiedener Literaturstellen bei.

Es finden sich Arbeiten mit rein qualitativen RNA-Bestimmungen (Tabelle 21: Zeile 4) neben Arbeiten, die - wie die vorliegende Arbeit - auf mehrere Haushaltsgene in einem qPCR-Verfahren normierten (Tabelle 21: Zeile 8).

Besonders schwierig zeigte sich der Vergleich mit nichtselektiven AT₁-Bestimmungen, sei es auf RNA-Ebene über nichtselektive Primer (Tabelle 21: Zeile 14), auf Proteinebene über nichtselektive Antikörper (Tabelle 21: Zeile 10) oder funktionell über nichtselektive Rezeptorliganden (Tabelle 21: Zeile 26).

Teils widersprechen andere Publikationen der vorliegenden Arbeit (Tabelle 21: Zeile 20), teils finden sich die hier vorgestellten Ergebnisse nahezu identisch wieder (Tabelle 21: Zeile 7 und Zeile 25). Zumindest der qualitative Nachweis beider Rezeptorsubtypen war in der Mehrzahl der Literaturstellen nachvollziehbar und mit der vorliegenden Arbeit übereinstimmend (Tabelle 21: Zeile 2, Zeilen 4-9, Zeilen 12-13, Zeile 17, Zeile 25 und Zeilen 27-28).

In der vorliegenden Arbeit war auffällig, dass in fast allen Gefäßgebieten die AT_{1B}-Expression die Level des AT_{1A}-Rezeptors überwog. Bisher existierten nur für Aortengewebe quantitative RT-PCR-Untersuchungen zu den AT₁-Angiotensinrezeptoren (Tabelle 21: Zeile 8 und Zeile 9). Deren Ergebnisse widersprechen den vorliegenden, da entweder ein Überwiegen des AT_{1A}-RNA oder eine Äquivalenz beider Rezeptoren auf RNA-Ebene beschrieben werden. Die Unterschiede können methodisch bedingt sein, da die Vergleichsarbeiten entweder andere Referenzgene (darunter das variable, also inkonstante Expressionsniveau aufweisende β -Aktin) (Zeile 8) oder nur ein Referenzgen verwendeten (Zeile 9).

Es konnte ausgeschlossen werden, dass die AT_{1B}RNA-Level einer Verzerrung unterlagen, da

1. subtypelektive Primer verwendet wurden, um einer Erfassung der RNA beider Subtypen vorzubeugen,
2. sichergestellt wurde, dass die Primer nicht in einem kodierenden Bereich binden, in dem eine Variation von einzelnen Basenpaaren vorkommt (sog. SNP, *single nucleotide polymorphism*, Einzelnukleotid-Polymorphismus) und
3. ein DNase-Verdau der RT-PCR vorgeschaltet wurde, um einer Kontamination mit genomischer DNA vorzubeugen. Dies war wichtig für den Teil der Primerpaare, für die kein intronüberspannender Ansatz erstellt werden konnte, darunter auch die AT_{1B}-Primerkombination.

Das Ergebnis lässt eine bisher unerkannte allgemeine Relevanz des AT_{1B}-Rezeptors für große und kleine arterielle Gefäße der Maus vermuten. Auch für die Bewertung von Befunden, die an Gefäßen von Agtr1a-gendefizienten Mäusen erhoben wurden, ist dieses Ergebnis bedeutsam - könnte doch problemlos eine funktionelle Kompensation des fehlenden AT_{1A} durch den schon im Wildtyporganismus hoch transkribierten AT_{1B} stattfinden. In der Tat zeigen Agtr1a-gendefiziente Mäuse eine erhaltene, wenn auch reduzierte Vasokonstriktion auf Angiotensin-II-Infusion. Die erhaltene Reagibilität wird auf Kompensation durch den AT_{1B}-Rezeptor zurückgeführt (Oliverio *et al.*, 1997; Ruan *et al.*, 1999).

Wichtig wäre es zum einen, die qPCR-Ergebnisse im gleichen Mausstamm auf Proteinebene zu verifizieren. Zum anderen sind auch Untersuchungen zur Mechanosensitivität des AT_{1B}-Rezeptors nötig, um die Befunde zu den RNA-Leveln auf die Gefäßphysiologie beziehen zu können.

In zwei der untersuchten Gefäßpaare (A. Carotis vs. Gehirnarterien und A. mesenterica superior vs. kleine Mesenterialarterien) zeigte sich ein Überwiegen der AT_{1B}-Expression im Widerstandsgefäß. Falls dieses Überwiegen sich auch auf Proteinebene widerspiegeln sollte, spräche dies für eine Rolle dieses Rezeptors als Mechanosensor für den myogenen Tonus. Auch ist dies im Einklang mit der besonderen Rolle des AT₁ als Mechanosensor, die sich in der letzten Zeit in der Literatur etabliert hat (Zou *et al.*, 2004; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008; Akazawa *et al.*, 2009; Rakesh *et al.*, 2010; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2011; Storch *et al.*, 2012).

Kleine Mesenterialarterien waren in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungsgegenstände für isobare Konstriktionsmessungen. Die AT_{1B}-RNA war unter anderem in den kleinen Mesenterialgefäßen gegenüber ihrem proximalen Leitungsgefäß erhöht. Deshalb wurde beschlossen, die mechanosensitive Relevanz des AT_{1B} in funktionellen Untersuchungen an kleinen Mesenterialarterien weiter zu analysieren. Die Darstellung und Diskussion dieser Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.3.3.3.

4.1.2 Endothelinrezeptoren

Zeile Nr.	Methode	Gewebe	Spezies	Nachweis beider Rez.	ET _B > ET _A	Weitere Ergebnisse und Besonderheiten	Referenz
1	semiquantitative RT-PCR, Autoradiographie, isometrische Konstriktionsmessung	Nierenarterienhauptstamm	Mensch	ja	nein	ET _A funktionell dominant	Maguire <i>et al.</i> , 1994
2	Autoradiographie	intrarenale Gefäße	Maus	nein	nein	ET _A 60-100% der Endothelinrezeptoren auf intrarenalen Gefäßen; ET _B schwierig zu detektieren	Kuc <i>et al.</i> , 2006

3	Immunhistochemie, quantitative RT-PCR, isometrische Konstriktionsmessung	Nierenarterie	Ratte	ja	ja	nur ein Referenzgen, Effizienz pauschal 2 gesetzt, Gefäße ohne Endothel, Organkultur potentiell verfälschend (Adner <i>et al.</i> , 1996)	Xie <i>et al.</i> , 2010
4	qualitative RT-PCR, isometrische Konstriktionsmessung	Aorta	Mensch	ja	nein	$\frac{ET_A}{ET_B} \approx 1$; kein ET_A auf kultivierten Aorta-SMC; funktionell kein Effekt bei selektiver ET_B -Stimulation;	Davenport <i>et al.</i> , 1993
5	isometrische Konstriktionsmessung	Aorta	Mensch	nein	nein	kein Effekt selektiver ET_B -Liganden	Maguire & Davenport, 1995
6	Immunhistochemie	Thorakalaorta	Maus	nein	nein	nur ET_A detektierbar	Kobayashi <i>et al.</i> , 2000
7	quantitative RT-PCR	Aorta	Maus	ja	nein	$\frac{ET_A}{ET_B} = \frac{5}{1}$; andere Referenzgene	Regard <i>et al.</i> , 2008
8	qualitative RT-PCR, isometrische Konstriktionsmessung	Gehirngefäße	Mensch	ja	nein	ET_A wirkte kontrahierend, ET_B dilatierend	Nilsson <i>et al.</i> , 1997

9	quantitative RT-PCR, isometrische Konstriktionsmessung, Immunhistochemie	A. basilaris	Ratte	ja	ja	Nur 1 Referenzgen, Effizienz pauschal 2 gesetzt, mehr ET _B als ET _A -RNA; auf Proteinebene kein Unterschied; kontrahierender ET _B	Waldsee <i>et al.</i> , 2010
10	Immunhistochemie, Western Blot	A. cerebri media, Mikrogefäße des Gehirns	Ratte	ja		kein direkter Vergleich der Proteinlevel durchgeführt	Maddahi & Edvinsson, 2008
11	semiquantitative RT-PCR, Western Blot, Immunhistochemie, isometrische Konstriktionsmessung	A. carotis	Ratte	ja	RNA + Protein: Tendenzielles ET _B -Überwiegen	ET _A nur auf SMC, kontrahierende Wirkung, ET _B auf Endothel dilatierend und auf SMC kontrahierend	Tirapelli <i>et al.</i> , 2005
12	Flusskontrollierte Organperfusion	Mesenterium	Ratte	keine selektiven Liganden	ja	auf Endothelin-1 nur Dilatation	Warner <i>et al.</i> , 1989
13	isometrische Konstriktionsmessung	kleine Mesenterialarterien	Ratte	ja	nein	Beide Rezeptoren kontrahierend; ET _A funktionell dominant	Sharifi & Schiffrin, 1996
14	quantitative RT-PCR, Western Blot, Immunhistochemie	A. mesenterica superior „en bloc“	Schwein	ja	RNA: ET _A > ET _B ; Protein: ET _B > ET _A	max. 30 Tage alte Individuen, 1 Referenzgen, Effizienz pauschal 2 gesetzt	Su <i>et al.</i> , 2004
15	isometrische Konstriktionsmessung, Western Blot	Mesenterialarterien dritter Ordnung	Ratte	ja	nein	ET _B dilatierend	Sachidanandan <i>et al.</i> , 2008

16	quantitative RT-PCR, Immunfluoreszenz	A. mesenterica superior mit erst- und zweitgradigen Ästen	Ratte	ja	kein direkter Vergleich der beiden Rezeptoren	andere Referenzgene, Effizienz pauschal 2 gesetzt; ET _B wird bei Hochdruckperfusion hochreguliert	Lindstedt <i>et al.</i> , 2009
17	quantitative RT-PCR, isometrische Konstriktionsmessung, Immunfluoreszenz	Mesenterialarterien	Ratte	ja	nein	ein Referenzgen, Effizienz pauschal 2 gesetzt; Ischämie/Reperfusion erhöht ET _B und erniedrigt ET _A (RNA + Protein)	Martínez-Revelles <i>et al.</i> , 2011
18	isometrische Konstriktionsmessung, <i>in-situ</i> hämodynamische Messung, semi-quantitative RT-PCR	A. mesenterica superior	Ratte	ja	kein direkter Vergleich	beide Rezeptoren kontrahierend	Cahill <i>et al.</i> , 1998
19	qualitative RT-PCR, isometrische Konstriktionsmessung	Pulmonalarteri	Mensch	ja	kein direkter Vergleich; qualitativ gesehen mehr ET _B -RNA		Davenport <i>et al.</i> , 1993
20	isometrische Konstriktionsmessung	Pulmonalarteri	Mensch	nein	nein	kein Effekt selektiver ET _B -Liganden	Maguire & Davenport, 1995
21	Immunhistochemie, <i>in-situ</i> -Hybridisierung	Lunge gesamt	Ratte	ja	nein	proximal ET _A auf SMC dominierend, distal ET _B dominierend;	Soma <i>et al.</i> , 1999

22	Autoradiographie	SMC verschiedener Segmente der Pulmonalarterie, Gewebeschnitte der Pulmonalarterie	Mensch	ja	nein	ET _A in allen Segmenten dominierend, Zunahme von ET _B distal	Davie <i>et al.</i> , 2002
----	------------------	--	--------	----	------	--	----------------------------

Tabelle 22: Vergleichende Darstellung der Expression von Endothelinrezeptoren aus der Literatur: Die Hintergrundfarben kodieren für die folgenden Gefäße: dunkelgrün: Nierenarterie; hellgrün: Aorta; dunkelblau: Gehirnarterien; hellblau: A. carotis; orange: kleine Mesenterialarterien; gelb: A. mesenterica superior; dunkelrot: A. pulmonalis

Die vorliegende Arbeit weist für jedes untersuchte Gefäßgebiet das Vorkommen von ET_A- und ET_B-RNA nach. In $\frac{4}{7}$ der hier untersuchten Gefäßgebiete waren höhere ET_B- als ET_A-RNA-Level zu finden. Übersichtshalber sind die Verhältnisse in Abbildung 28 dargestellt.

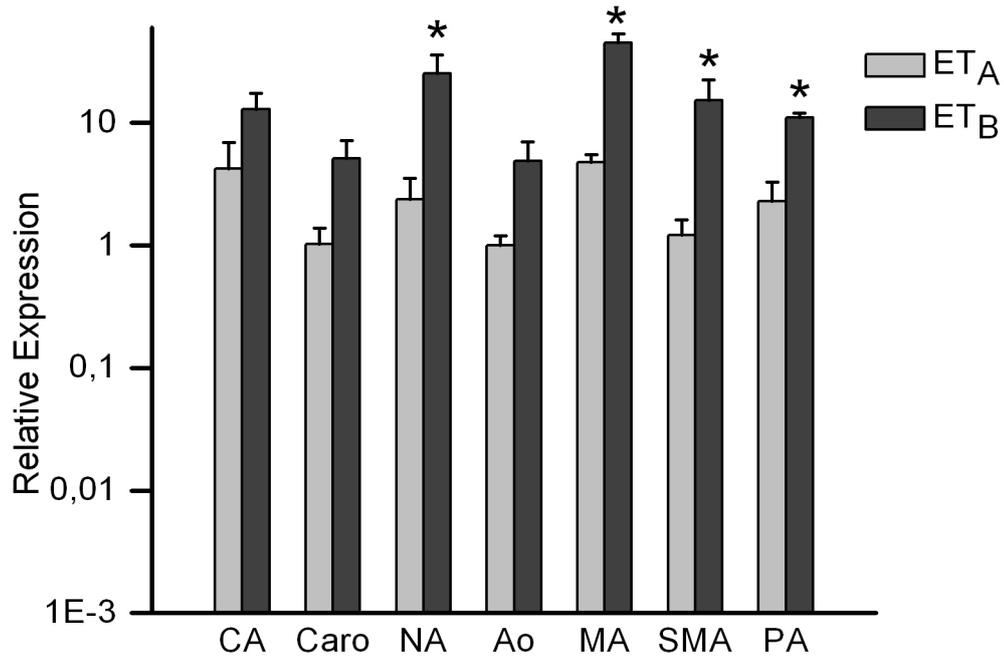


Abbildung 28: Dargestellt sind die RNA-Level des ET_A - (hellgrau) und ET_B-Rezeptors (dunkelgrau) in den untersuchten Gefäßgebieten. Es fällt auf, dass in 4 von 7 Gefäßen der ET_B-Rezeptor höhere RNA-Level aufweist als der ET_A-Rezeptor. Diese Verhältnisse sind dabei sowohl in Widerstandsgefäßen als auch in Leitungsgefäßen zu erheben. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert und zeigt die auf die Referenzgene Hprt1, Ywhaz und Sdha normierten RNA-Level der Rezeptoren. Die Abszisse zeigt die auf die Rezeptortranskription untersuchten Gefäßgebiete. Folgende Abkürzungen finden dabei Verwendung: CA = Gehirnarterien, Caro = A. carotis, NA = Nierenarterie, Ao = Bauchaorta, MA = kleine Mesenterialarterien, SMA = A. mesenterica superior, PA = Pulmonalarterie; * = $p < 0,05$ für ET_A vs. ET_B

Die Mehrzahl der gesichteten Arbeiten konnten in ihren Gefäßen, im Einklang mit der vorliegenden Arbeit, beide Rezeptorsubtypen nachweisen. Bisher existierten nur für vereinzelte Gefäßgebiete quantitative RT-PCR-Untersuchungen zu den Endothelinrezeptoren (Tabelle 22: Zeile 3, Zeile 7, Zeile 9, Zeile 14, Zeile 16 und Zeile 17).

Alle Untersuchungen weisen methodische Differenzen zur vorliegenden Arbeit auf.

So wurden in fast allen Arbeiten die Primereffizienzen nicht bestimmt; zusätzlich wurde teilweise auch nur ein Referenzgen verwendet (Tabelle 22: Zeile 3, Zeile 9, Zeile 14 und Zeile 17). Trotz methodischer Differenzen konnte eine Höherexpression des ET_B gegenüber dem ET_A durch andere Arbeiten bestätigt werden (Tabelle 22: Zeile 3 und Zeile 9). Für die an das PCR-Experiment anschließenden funktionellen Analysen fand sich in der Literatur ferner der wichtige Befund, dass ET_A-Rezeptoren nur in glatten Muskelzellen exprimiert werden, ET_B-Rezeptoren dagegen sowohl im Endothel als auch in glatten Muskelzellen (Tabelle 22: Zeile 11).

Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Überwiegen der ET_B-RNA-Level gegenüber den ET_A-RNA-Leveln bleibt jedoch widersprüchlich. Auf Proteinebene schien der ET_A in der Literatur über alle Gefäß-

gebiete hinweg der dominante Subtyp zu sein. Diese Aussage bezieht sich auf ganze Gefäße. Erklärbar könnte dieses Missverhältnis der Protein- zu den RNA-Leveln mit einer negativen transkriptionellen Regulation des ET_B sein.

Eine Hochregulation des ET_B in verschiedenen pathophysiologischen Szenarien ist in der Literatur beschrieben, z.B. während experimenteller Hochdruckperfusion oder im Zuge eines Ischämie-Reperfusionsschadens (Tabelle 22: Zeile 16 und Zeile 17). Möglicherweise ist also die zahlreich vorhandene ET_B-RNA Teil eines Reservemechanismus zur Gegenregulation. Somit könnte im Bedarfsfall - im Sinne einer Disinhibition der Translation - schnell Protein aus den bereits bestehenden hohen RNA-Leveln synthetisiert werden. Wie im Detail diese Gegenregulation aussehen könnte, muss in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

Im Hinblick auf die zentrale Hypothese der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass nur in einem von drei Gefäßpaaren (Leitungs- versus Widerstandsgefäß: A. mesenterica superior vs. kleine Mesenterialarterien) beide ET-Rezeptoren-RNA-Level im Widerstandsgefäß erhöht waren. Zudem war in Pulmonalarterien nur ET_B-Rezeptor-RNA gegenüber Mesenterialarterien erniedrigt. Dieser Dominanz auf RNA-Ebene steht die bereits beschriebene untergeordnete Rolle auf Proteinebene entgegen. Nur für den ET_A konnte eine Dominanz in Widerstandsgefäßen auf RNA-Ebene nachgewiesen werden, die sich in der Literatur auch auf Proteinebene bestätigt findet. Mechanosensitivität kann nach derzeitigem Kenntnisstand jedoch nur dem exprimierten Protein zugestanden werden und nicht seiner mRNA. Von beiden Endothelinrezeptoren kommt somit allenfalls dem ET_A eine mögliche Rolle als Mechanosensor für den myogenen Tonus in Widerstandsgefäßen zu.

Für mechanosensitive Rezeptorproteine konnte gezeigt werden, dass diese insbesondere über G_{q/11}-Proteine ihr Signal transduzieren (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Für den stimulierten ET_A wurde eine stärkere Zunahme der G_{q/11}-Signaltransduktion beobachtet als für den ET_B (Shraga-Levine & Sokolovsky, 2000).

Somit scheint dem ET_A eine gewichtigere Rolle in der für Mechanosensitivität relevanten Signalkaskade zuzukommen. Auch seine - im Gegensatz zum ET_B- exklusive Lokalisierung auf glatten Muskelzellen (Davenport, 2002) könnte gewährleisten, dass bei mechanischem Stress nur die glatten Muskelzellen aktiviert würden. Schließlich wurde im heterologen Expressionssystem für den ET_A eine ligandenunabhängige Aktivierbarkeit durch Dehnung festgestellt (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008).

Da die Mechanosensitivität der ET_A-Rezeptoren auf zellulärer Ebene bereits bewiesen ist und zudem die ET_A-RNA-Level in kleinen Mesenterialarterien gegenüber dem proximalen Leitungsgefäß erhöht waren, wurde beschlossen, die Mechanosensitivität des ET_A-Rezeptors auf Organebene zu untersuchen. Dies geschah über eine isobare Konstriktionsmessung (Arteriographie) von kleinen Mesenterialarterien. Die Darstellung und Diskussion dieser Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.3.3.4.

4.1.3 V_{1A}-Vasopressinrezeptor

Zeile Nr.	Methode	Gewebe	Spezies	Nachweis des V _{1A}	Weitere Ergebnisse und Besonderheiten	Referenz
-----------	---------	--------	---------	------------------------------	---------------------------------------	----------

1	Autoradiographie	Gewebeschnitt (Niere)	Ratte	ja	V ₁ -Signal an Vasa recta der Niere	Phillips <i>et al.</i> , 1990
2	isometrische Konstriktionsmessung	Hauptstamm der Nierenarterie	Mensch	ja	Lokalisierung des V _{1A} auf SMC	Medina <i>et al.</i> , 1996
3	Bindungsstudie, semiquantitative RT-PCR	präglomeruläre Widerstandsgefäße	Ratte	ja	V ₁ -Rezeptoren stellen 90% der AVP-Bindungsstellen; V _{1A} wird bei Hypertonie hochreguliert	Vågnes <i>et al.</i> , 2000
4	Kalziummessung, isobare Konstriktionsmessung, quantitative RT-PCR	Interlobulärarterien, afferente Arteriolen	Ratte	ja	nur ein Referenzgen; Hochregulation des V _{1A} in Interlobulärarterien bei Hypertonie	Hansen <i>et al.</i> , 2005
5	isometrische Konstriktionsmessung	Nierenarterie	Kaninche	ja	kein Effekt selektiver V ₂ -Liganden	Streefkerk <i>et al.</i> , 2003a
6	Autoradiographie	Gewebeschnitt (Aorta)	Ratte	nein	Keine Bindungsstellen für V ₁ - und V ₂ -Liganden	Phillips <i>et al.</i> , 1990
7	qualitative RT-PCR	Aorta	Ratte	ja		Hirasawa <i>et al.</i> , 1994b
8	isometrische Konstriktionsmessung	Aorta	Ratte	ja		Stam <i>et al.</i> , 1998
9	quantitative RT-PCR	Aorta	Maus	ja	andere Referenzgene	Regard <i>et al.</i> , 2008
10	Autoradiographie	Gewebeschnitt (A. basilaris)	Ratte	ja		Phillips <i>et al.</i> , 1990
11	<i>in-situ</i> hämodynamische Messungen	A. carotis communis	Ratte	ja	V _{1A} mit kontrahierender Wirkung	Gardiner <i>et al.</i> , 1989
12	<i>in-situ</i> hämodynamische Messungen	A. carotis communis	Ratte	ja	V _{1A} mit dilatierender Wirkung	Rutschmann <i>et al.</i> , 1998

13	isometrische Konstriktionsmessung	kleine Mesenterialarterien	Ratte	ja		Stam <i>et al.</i> , 1998
14	isometrische Konstriktionsmessung	„Mesenterialarterien“ unklarer anatomischer Herkunft	Ratte	ja	Formulierung weist auf kleine Mesenterialarterien hin	Streefkerk <i>et al.</i> , 2003b
15	qualitative RT-PCR	„Mesenterialarterie“ unklarer anatomischer Herkunft	Mensch	ja	Formulierung weist auf A. mesenterica superior hin	Hirasawa <i>et al.</i> , 1994a
16	isometrische Konstriktionsmessung	Pulmonalarterie dritter Ordnung	Hund	ja	niedrige [AVP]: Dilatation (endothelabhängig); hohe [AVP]: Konstriktion (endothelunabhängig)	Evora <i>et al.</i> , 1993
17	<i>in-situ</i> hämodynamische Messungen	Pulmonalarterie und distale Äste	Hund	ja	Effekt über Widerstandserhöhung im Lungenkreislauf gemessen	Leather <i>et al.</i> , 2002
18	Ex-vivo Organmikroskopie	Präzisions-schnitte der Lunge	Meerschweinchen	nein	nur kleine Lungenarterien beobachtet	Rieg <i>et al.</i> , 2011

Tabelle 23: Vergleichende Darstellung der Expression von V_{1A} -Vasopressinrezeptoren aus der Literatur: Die Hintergrundfarben kodieren für die folgenden Gefäße: dunkelgrün: Nierenarterie; hellgrün: Aorta; dunkelblau: Gehirnarterien; hellblau: A. carotis; orange: kleine Mesenterialarterien; gelb: A. mesenterica superior; dunkelrot: A. pulmonalis

Die vorliegende Arbeit weist für jedes untersuchte Gefäßgebiet das Vorkommen von V_{1A} -RNA nach. Übersichtshalber sind die Verhältnisse in Abbildung 29 dargestellt.

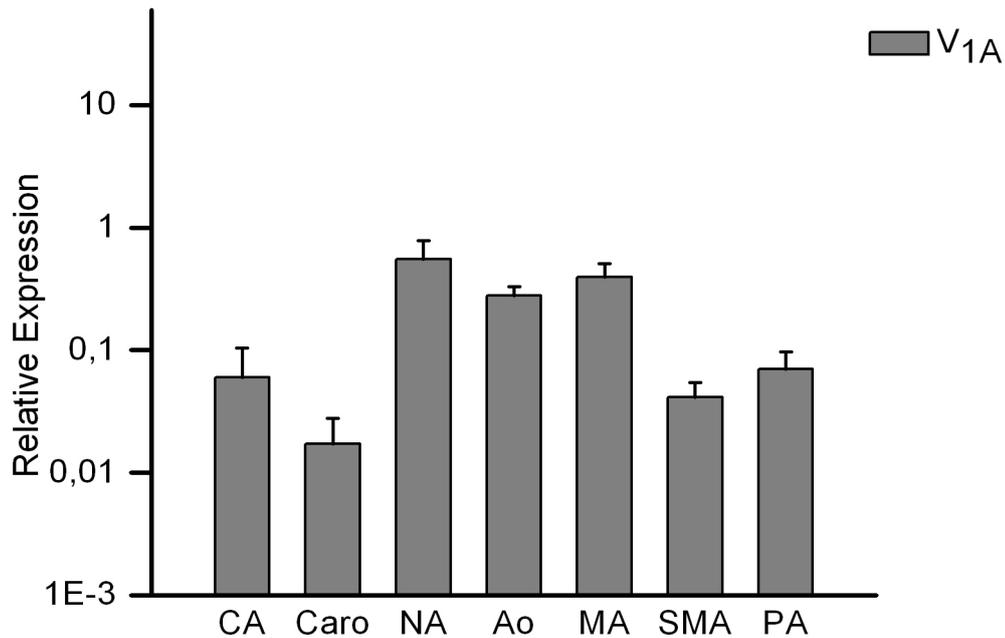


Abbildung 29: Dargestellt sind die RNA-Level des V_{1A} -Rezeptors (grau) in den untersuchten Gefäßgebieten. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert und zeigt die auf die Referenzgene *Hprt1*, *Ywhaz* und *Sdha* normierten RNA-Level der Rezeptoren. Die Abszisse zeigt die auf die Rezeptortranskription untersuchten Gefäßgebiete. Folgende Abkürzungen finden dabei Verwendung: CA = Gehirnarterien, Caro = A. carotis, NA = Nierenarterie, Ao = Bauchaorta, MA = kleine Mesenterialarterien, SMA = A. mesenterica superior, PA = Pulmonalarterie

Der Nachweis des V_{1A} -Rezeptors (auf RNA-Basis oder funktionell) konnte für alle Gefäßgebiete in der Literatur bestätigt werden. Bisher existierten nur für Nierenarterien- und Aortengewebe quantitative RNA-Bestimmungen zum V_{1A} -Rezeptor (Tabelle 23: Zeile 4 und Zeile 9). Die qPCR wurde jedoch entweder ohne multiple Referenzgene (23: Zeile 4) oder mit anderen Referenzgenen (darunter β -Aktin mit der bereits erwähnten Instabilität seiner Expressionslevel) durchgeführt (23: Zeile 9). Trotz methodischer Differenzen kamen sie zum gleichen Ergebnis wie die vorliegende Arbeit.

Desweiteren fanden sich zur putativen Mechanosensitivität des V_{1A} -Rezeptors in der Literatur auch Hinweise, die besagen, dass bei erhöhtem Blutdruck der V_{1A} -Rezeptor zumindest in den kleinen Gefäßen der Niere stärker exprimiert wird als im nicht-hypertensiven Zustand (Tabelle 23: Zeile 3 und Zeile 4). Spekulativ könnte man diesen Unterschied dadurch erklären, dass mit der verstärkten V_{1A} -Rezeptorexpression ein Zugewinn an Mechanosensitivität erfolgt. Diese erhöhte Mechanosensitivität würde wiederum eine verstärkte myogene Konstriktion der kleinen Gefäße zum Schutz der Glomeruluskapillaren erlauben.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich für den V_{1A} -Rezeptor in drei Vergleichspaaren (A. mesenterica superior vs. kleine Mesenterialarterien, Pulmonalarterie vs. Nierenarterie, Pulmonalarterie vs. kleine Mesenterialarterien) jeweils im Widerstandgefäß erhöhte RNA-Level. Die Tatsache, dass sich im Gefäß die Rezeptoren vorwiegend auf den glatten Muskelzellen befinden (Tabelle 23: Zeile 1) und hier Kontrakti-

on vermitteln (Tabelle 23: Zeile 16) erlaubt die Vermutung, dass der V_{1A} -Rezeptor als glattmuskulärer Mechanosensor im Phänomen des myogenen Tonus fungieren könnte.

Der V_{1A} -Rezeptor kann *in vitro* als Mechanosensor fungieren. In *patch-clamp*-Experimenten an heterologen Expressionssystemen fiel seine Fähigkeit auf, den TRPC6-Kanal über DAG zu aktivieren (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Es resultierte eine Depolarisierung. Die Depolarisierung wiederum gehört zu den ersten Elementen in der Signalkaskade des myogenen Tonus.

Die Ergebnisse der qPCR zeigen, dass in kleinen Mesenterialarterien die V_{1A} -RNA-Level gegenüber dem proximalen Leitungsgefäß erhöht sind. Deshalb wurde beschlossen, auch an isolierten Mesenterialarterien nach Hinweisen für eine Funktion des V_{1A} -Rezeptors als Mechanosensor für den myogenen Tonus zu suchen. Die Darstellung und Diskussion der Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.3.3.5.

4.1.4 Alpha₁-Adrenozeptoren

Zeile Nr.	Methode	Gewebe	Spezies	Nachweis aller drei Rez.	relative Gewichtung	Weitere Ergebnisse und Besonderheiten	Referenz
1	RNase protection assay, isometrische Konstriktionsmessung	Nierenarterie	Ratte	nein	nur Nachweisversuch für α_{1D}	α_{1D} unbedeutend für Nierenarterienkonstriktion	Piascik <i>et al.</i> , 1995
2	RNase protection assay	Nierenarterie	Ratte	ja	kein direkter Vergleich		Miller <i>et al.</i> , 1996
3	Immunfluoreszenz, isometrische Konstriktionsmessung, α_{1B} -Antisense-Oligonukleotide	Nierenarterie	Ratte	nein	Nachweis von: α_{1A} (funktio-nell), α_{1B} (immunolo-gisch)	α_{1A} als der dominante Subtyp	Piascik <i>et al.</i> , 1997
4	semiquantitative RT-PCR	Nierenarterie	Ratte	ja	$\alpha_{1B} > \alpha_{1A} = c$		Xu <i>et al.</i> , 1997

5	RNase protection assay, Bindungsstudie	Nierenarterie	Mensch	ja	$\alpha_{1A} > \alpha_{1B}$, (RNA, funktionell) α_{1E} (schwaches RNA-Signal)	Schwierigkeiten der RNA-Methode bei geringen RNA-Mengen, α_{1A} als der dominante Subtyp	Rudner <i>et al.</i> , 1999
6	isometrische Konstriktionsmessung, Immunhistochemie, antisense Oligonukleotide	Nierenarterie	Ratte	ja	α_{1A} funktionell dominant	α_{1B} -Runterregulierung verstärkt Naphazolin-Konstriktion	Hrometz <i>et al.</i> , 1999
7	RNase protection assay, in-situ Hybridisierung	thorakale Aorta	Ratte	ja	kein direkter Vergleich	alle Rezeptoren auf SMC	Miller <i>et al.</i> , 1996
8	RNase protection assay, isometrische Konstriktionsmessung	Aorta	Ratte	nein	nur Nachweisversuch für α_{1D}	α_{1D} für Aortenkonstriktion bedeutend	Piascik <i>et al.</i> , 1995
9	Immunfluoreszenz, isometrische Konstriktionsmessung	Aorta	Ratte	nein	Nachweis von: α_{1D} (funktionell), α_{1B} (immunologisch)	α_{1D} als der dominante Subtyp	Piascik <i>et al.</i> , 1997
10	semiquantitative RT-PCR	Thorakale Aorta	Ratte	ja	$\alpha_{1B} > \alpha_{1A} > c$		Xu <i>et al.</i> , 1997
11	RNase protection assay, Bindungsstudie	Aorta	Mensch	ja	α_{1D} (RNA, funktionell) α_{1A} , α_{1B} (schwaches RNA-Signal)	Schwierigkeiten der RNA-Methode bei geringen RNA-Mengen, α_{1D} als der dominante Subtyp	Rudner <i>et al.</i> , 1999

12	Immunhisto- chemie	Aorta	Ratte	ja	kein direkter Vergleich		Hrometz <i>et al.</i> , 1999
13	quantitative RT-PCR	Aorta	Maus	ja	$\alpha_{1D} > \alpha_{1A} > c$	andere Referenzgene	Regard <i>et al.</i> , 2008
14	semiquantitative RT-PCR	A. basilaris	Ratte	nein	$\alpha_{1A} = \alpha_{1B}$	α_{1D} negativ; nur A.basilaris berücksichtigt	Phillips <i>et al.</i> , 1997
15	Kalziummessung, isometrische Konstriktions- messung, IP ₃ -Messung, Western Blot	A. cerebri media	Schaf	ja	Proteinlevel ungefähr gleich	α_{1A} und α_{1B} funktionell dominanter	Goyal <i>et al.</i> , 2010
16	RNase protection assay	A. carotis	Ratte	ja	kein direkter Vergleich		Miller <i>et al.</i> , 1996
17	RNase protection assay	A. carotis	Mensch	nein	α_{1A} (RNA), α_{1B} (schwaches RNA-Signal)	Schwierigkeiten der RNA-Methode bei geringen RNA-Mengen, α_{1D} negativ	Rudner <i>et al.</i> , 1999
18	quantitative RT-PCR	A. carotis communis	Ratte	ja	in der Media: $\alpha_{1D} > \alpha_{1B} > c$	nur ein Referenzgen, Effizienz pauschal 2 gesetzt	Faber & Yang, 2006
19	RNase protection assay, isometrische Konstriktions- messung	Mesenterial- arterien zweiter Ordnung	Ratte	nein	nur Nach- weisversuch für α_{1D}	α_{1D} unbedeutend für Mesenterialar- terienkonstriktion	Piasek <i>et al.</i> , 1995
20	Immun- fluoreszenz, isometrische Konstriktions- messung	Mesenterial- arterien zweiter Ordnung	Ratte	nein	Nachweis von α_{1B} (immunolo- gisch, funktionell)	α_{1B} als der dominante Subtyp	Piasek <i>et al.</i> , 1997

21	semiquantitative RT-PCR, Bindungsstudie	Mesenterial-arterien dritter Ordnung	Ratte	α_{1A} -RNA positiv	nur RT-PCR auf α_{1A} durchgeführt	α_{1A} funktionell dominant	Stassen <i>et al.</i> , 1998
22	Immunhistochemie	mesenteriale Widerstandsgefäße	Ratte	ja	kein direkter Vergleich		Hrometz <i>et al.</i> , 1999
23	isometrische Konstriktionsmessung, Immunhistochemie	Mesenterial-arterien erster und zweiter Ordnung	Hund	nein	nur funktioneller Nachweis von α_{1A}	kein immunhistochemischer Nachweis von α_{1B} möglich; Gefäße ohne Endothel	Daniel <i>et al.</i> , 1999
24	RNase protection assay	A. mesenterica superior	Ratte	ja	kein direkter Vergleich		Miller <i>et al.</i> , 1996
25	Immunfluoreszenz, isometrische Konstriktionsmessung	A. mesenterica superior	Ratte	nein	Nachweis von: α_{1B} (immunologisch), α_{1D} (funktionell)	α_{1D} als der dominante Subtyp	Piascik <i>et al.</i> , 1997
26	semiquantitative RT-PCR	A. mesenterica superior und bis zweitgradige Äste	Ratte	ja	$\alpha_{1A} > \alpha_{1B} = c$	keine Trennung zwischen SMA und MA	Phillips <i>et al.</i> , 1997
27	semiquantitative RT-PCR	A. mesenterica	Ratte	ja	$\alpha_{1A} = \alpha_{1D} = c$	anatomische Herkunft der „A.mesenterica“ unklar	Xu <i>et al.</i> , 1997
28	RNase protection assay	A. mesenterica	Mensch	ja	$\alpha_{1A} > \alpha_{1B}$ (RNA), α_{1D} (schwaches RNA-Signal)	Schwierigkeiten der RNA-Methode bei geringen RNA-Mengen	Rudner <i>et al.</i> , 1999
29	Immunhistochemie	A. mesenterica superior	Ratte	ja	kein direkter Vergleich		Hrometz <i>et al.</i> , 1999

30	isometrische Konstriktions- messung, quantitative RT-PCR	A. mesenterica superior	Maus	ja	$\alpha_{1D} > \alpha_{1A} > c$	Gefäße ohne Endothel, nur ein Referenzgen, Effizienz pauschal 2 gesetzt, Korrelation zwischen RNA-Leveln und Funktion	Hosoda <i>et al.</i> , 2005
31	semiquantitative RT-PCR	A. pulmonalis	Ratte	ja	$\alpha_{1B} > \alpha_{1A} > c$		Phillips <i>et al.</i> , 1997
32	semiquantitative RT-PCR	A. pulmonalis	Ratte	ja	$\alpha_{1B} > \alpha_{1A} = c$		Xu <i>et al.</i> , 1997
33	RNase protection assay	A. pulmonalis	Mensch	ja	$\alpha_{1A} > \alpha_{1B} = c$ (RNA)	Schwierigkeiten der RNA-Methode bei geringen RNA-Mengen	Rudner <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 24: Vergleichende Darstellung der Expression von α_1 -Adrenozeptoren aus der Literatur: Die Hintergrundfarben kodieren für die folgenden Gefäße: dunkelgrün: Nierenarterie; hellgrün: Aorta; dunkelblau: Gehirnarterien; hellblau: A. carotis; orange: kleine Mesenterialarterien; gelb: A. mesenterica superior; dunkelrot: A. pulmonalis

Die vorliegende Arbeit weist für jedes untersuchte Gefäßgebiet das Vorkommen von α_{1A} - und α_{1D} -Adrenozeptor-RNA nach. Auffallend war, dass zum einen die RNA-Level des α_{1A} -Adrenozeptors in allen Widerstandsgefäßen gegenüber den RNA-Leveln in Leitungsgefäßen überwiegen. Zum anderen zeigte sich, dass α_{1B} -RNA in kleinen Mesenterialarterien komplett fehlt. Übersichtshalber sind die Verhältnisse in Abbildung 30 dargestellt.

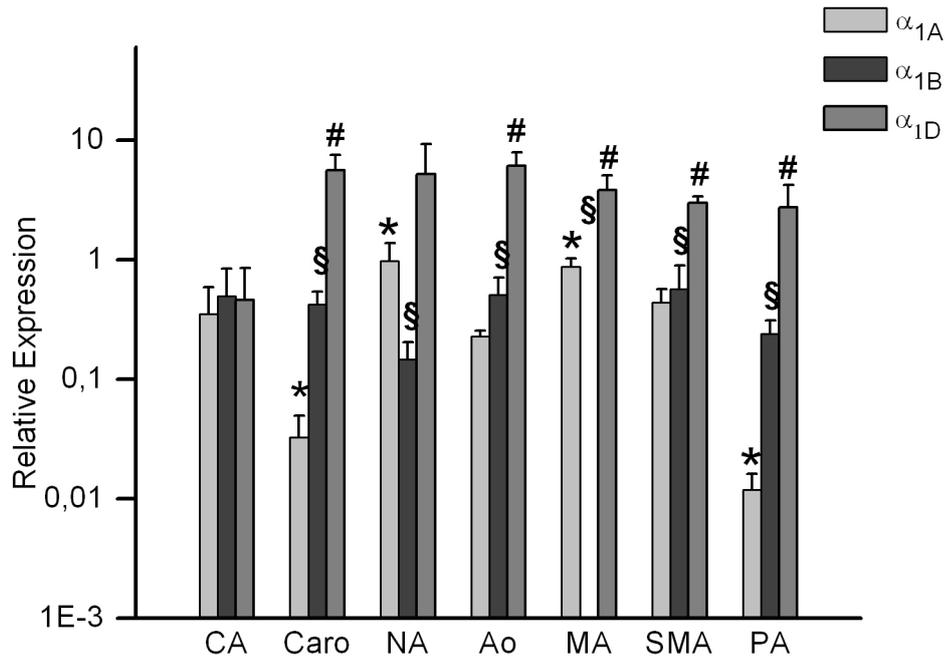


Abbildung 30: Dargestellt sind die RNA-Level des α_{1A} - (hellgrau), α_{1B} - (dunkelgrau) und α_{1D} -Adrenozeptors (grau) in den untersuchten Gefäßgebieten. Es fällt auf, dass in Mesenterialarterien α_{1B} -RNA nicht nachgewiesen werden kann. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert und zeigt die auf die Referenzgene Hprt1, Ywhaz und Sdha normierten RNA-Level der Rezeptoren. Die Abszisse zeigt die auf die Rezeptortranskription untersuchten Gefäßgebiete. Folgende Abkürzungen finden dabei Verwendung: CA = Gehirnarterien, Caro = A. carotis, NA = Nierenarterie, Ao = Bauchaorta, MA = kleine Mesenterialarterien, SMA = A. mesenterica superior, PA = Pulmonalarterie; * = $p < 0,05$ für α_{1A} vs. α_{1B} , § = $p < 0,05$ für α_{1B} vs. α_{1D} , # = $p < 0,05$ für α_{1A} vs. α_{1D} .

RNA- oder Proteinvorkommen aller drei α_1 -Adrenozeptoren ist in allen vorliegend getesteten Gefäßbetten beschrieben.

Bisher existieren nur für vereinzelte Gefäßgebiete quantitative RT-PCR-Untersuchungen zu den α_1 -Adrenozeptoren (Tabelle 24: Zeile 13 und Zeile 30). Alle Untersuchungen weisen methodische Differenzen zur vorliegenden Arbeit auf: So wurden entweder keine Primereffizienzen bestimmt und nur ein Referenzgen (Tabelle 24: Zeile 30) oder andere Referenzgene verwendet, darunter das als Referenzgen instabile β -Aktin (Tabelle 24: Zeile 13). Trotz methodischer Differenzen besteht mit der vorliegenden Arbeit Übereinstimmung in der deutlichen Dominanz der α_{1D} -RNA in Leitungsgefäßen.

Interessanterweise wird für den α_{1D} wiederholt auch funktionell eine besondere Relevanz in den Leitungsgefäßen Aorta und A. mesenterica superior beschrieben (Tabelle 24: Zeile 9, Zeile 11 und Zeile 25). Besondere funktionelle Relevanz heißt in diesem Zusammenhang, dass die α_1 -adrenerge Konstriktion des jeweiligen Gefäßes vor allem über α_{1D} -Stimulation vermittelt wird. Der α_{1A} hingegen wird überwiegend als besonders relevant für Widerstandsgefäße wie Nierenarterie, kleine Mesenterialarterien und Gehirnarterien beschrieben (Tabelle 24: Zeile 5, Zeile 6 und Zeile 21). Diese Befunde sind im Ein-

klang mit den RNA-Leveln der vorliegenden Arbeit: α_{1D} ist auf RNA-Ebene der dominante Adrenozeptor in allen untersuchten Leitungsgefäßen.

Für den α_{1B} bleiben die Aussagen widersprüchlich: Zum einen wird er mit der Konstriktion von Widerstandsgefäßen assoziiert (Tabelle 24: Zeile 20); andererseits führt eine Verminderung der α_{1B} -Expression in der isolierten Nierenarterie zu einer verstärkten Kontraktilität (Tabelle 24: Zeile 6). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Verminderung der α_{1B} -RNA-Menge in Nierenarterien gegenüber dem Leitungsgefäß Aorta. In kleinen Mesenterialarterien fehlte die entsprechende RNA gar vollkommen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit einer weiteren Publikation (Tabelle 24: Zeile 23).

Die Tatsache, dass in keinem Widerstandsgefäß ein Überwiegen der α_{1B} -RNA gegenüber der des α_{1A} beobachtet wurde und in keinem Leitungsgefäß ein Überwiegen der α_{1A} -RNA gegenüber der des α_{1B} weist auf eine Trennschärfe der beiden Adrenozeptoren hin. Ob sich ein Gefäß wie ein Leitungs- oder wie ein Widerstandsgefäß verhält, könnte durch die Ratio $\frac{\alpha_{1B}\text{-Expression}}{\alpha_{1A}\text{-Expression}}$ bestimmt werden:

Die untersuchten Leitungsgefäße wiesen eine gemeinsame mittlere Ratio von 9,12 auf, die Widerstandsgefäße eine gemeinsame mittlere Ratio von 0,52. Hohe Werte in der Expressionsratio scheinen also auf eine Funktion als Leitungsgefäß zu deuten, niedrige Werte auf eine Funktion als Widerstandsgefäß. Im vorliegenden Fall war eine um den Faktor 18 erhöhte Ratio in Leitungsgefäßen zu beobachten.

Vorstellbar wäre eine negative regulative Funktion des α_{1B} hinsichtlich der Kontraktilität bzw. der Mechanosensitivität. Der Rezeptor liegt mit moderater Basalaktivität vor. Eine Basalaktivität liegt für α_{1A} nur wenig bis gar nicht vor (Rossier *et al.*, 1999; Seifert & Wenzel-Seifert, 2002). Mechanischer Stress könnte nun diese Basalaktivität des α_{1B} reduzieren und die des α_{1A} steigern. Somit wäre mit der Präsenz des α_{1B} auf großen Gefäßen auch ein hypothetisches Korrelat für deren reduzierte Mechanosensitivität gegeben. Zukünftige elektrophysiologische Untersuchungen könnten diese Hypothese erhärten.

Für den α_{1D} -Adrenozeptor ist eine ähnliche Rolle wie für den α_{1B} -Adrenozeptor denkbar. Seine Basalaktivität ist stärker ausgeprägt als im Falle des α_{1B} . Auch seine funktionelle Relevanz in Leitungsgefäßen ist gut dokumentiert, ebendort findet sich auch seine hohe Basalaktivität wieder (Gisbert *et al.*, 2002). Gemessen an seiner Basalaktivität und seiner dominanten Rolle in Leitungsgefäßen stellt der α_{1D} -Adrenozeptor sogar einen vielversprechenderen Kandidaten für eine zu Dilatation führende Mechanosensitivität dar als der α_{1B} -Adrenozeptor.

In Leitungsgefäßen ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine mittlere Ratio $\frac{\alpha_{1D}\text{-Expression}}{\alpha_{1A}\text{-Expression}}$ von 109,03, in Widerstandsgefäßen eine mittlere Ratio von 3,67. Damit wiesen Leitungsgefäße gegenüber Widerstandsgefäßen eine um den Faktor 30 erhöhte Ratio auf. Welche der beiden vorliegend bestimmten Rationes von α_1 -Adrenozeptor-RNA-Leveln ($\frac{\alpha_{1B}\text{-Expression}}{\alpha_{1A}\text{-Expression}}$ oder $\frac{\alpha_{1D}\text{-Expression}}{\alpha_{1A}\text{-Expression}}$) sich am besten zur Einstufung eines Gefäßes als Leitungs- oder als Widerstandsgefäß eignet, muss in zukünftigen Arbeiten an weiteren Widerstands- und Leitungsgefäßen erarbeitet werden. Auch wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die Rationes auf Proteinebene fortsetzen und ob sie in anderen Spezies gleichermaßen festzustellen sind. Schließlich könnten elektrophysiologische Untersuchungen an koexprimierenden heterologen Systemen Aufschluss über eine mögliche reziproke Beeinflussung zweier Adrenozeptoren durch mechanischen Stress geben.

Die Tatsache, dass die α_{1D} -Adrenozeptor-RNA nicht in einem so wichtigen Widerstandsgebiet wie den Mesenterialarterien fehlt, könnte mit einer entsprechenden transkriptionellen Regulierung erklärt werden.

Deren Nachweis steht jedoch noch aus. Künftige Experimente könnten über die Messung des myogenen Tonus von Leitungsgefäßen aus Mäusen mit nichtfunktionellen α_{1A} - und α_{1B} -Genen ($\alpha_{1A/1B}$ -doppelt-gendefiziente Mäuse, „Doppel-Knockout“) (O’Connell *et al.*, 2003) unter dem inversen Agonisten Prazosin weitere Klarheit bringen, ob es eine Mechanosensitivität gibt, die zu Dilatation führt. Auch könnte, sollte im genannten Experiment eine Verstärkung des myogenen Tonus zu beobachten sein, der zugrunde liegende Signalweg weiter erhellt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte für alle untersuchten Paare aus Leitungs- und Widerstandsgefäß ein Dominieren der α_{1A} -RNA im Widerstandsgefäß gefunden werden. Damit stellt dieser Rezeptor den stärksten Kandidaten für das entscheidende mechanosensitive Protein dar. Die Präsenz dieses Rezeptors auf der Zellmembran der glatten Muskelzellen könnte den Widerstandsgefäßen ihre sog. Myogenität verleihen. Durch Mederos y Schnitzler und Mitarbeiter wurde erarbeitet, dass mechanosensitive Rezeptorproteine insbesondere über $G_{q/11}$ -Proteine ihr Signal transduzieren (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Alle α_1 -Adrenozeptoren koppeln an $G_{q/11}$ -Proteine (Graham *et al.*, 1996). Damit spricht auch die Signaltransduktion für eine mögliche mechanosensitive Eigenschaft des α_{1A} -Adrenozeptors.

In der Kreislaufforschung ist lange bekannt, dass die Blutflussregulation einzelner Organe im Splanchnikusgebiet vor allem durch die adrenerge Konstriktion von Widerstandsgefäßen bestimmt wird (Michelotti *et al.*, 2000). Dieser bedeutsame Konstriktionsmechanismus auf *chemische* α_1 -Aktivierung könnte nun auch ligandenunabhängig, eben als *myogene* Konstriktion, stattfinden.

Zusammenfassend wurde der α_{1A} -Adrenozeptor als putativer Mechanosensor eingestuft. Deshalb wurde versucht, unter selektiver pharmakologischer Inhibition der α_1 -Adrenozeptoren deren relativen Anteil am myogenen Tonus zu bestimmen. Die Methode der Wahl hierfür war die isobare Konstriktionsmessung an kleinen Mesenterialarterien. Auch für diese Untersuchung wurden kleine Mesenterialarterien gewählt, da auch in diesen die α_{1A} -RNA-Level gegenüber dem proximalen Leitungsgefäß erhöht waren. Die Darstellung und Diskussion der Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.3.3.1.

4.1.5 Alpha₂-Adrenozeptoren

Zeile Nr.	Methode	Gewebe	Spezies	Nachweis aller drei Rez.	relative Gewichtung	Weitere Ergebnisse und Besonderheiten	Referenz
1	isometrische Konstriktionsmessung, Bestimmung der Noradrenalin-Freisetzung	Nierenarterie	Kaninche Mensch		keine Subtypisierung	α_2 -abhängige Noradrenalin-freisetzung durch elektrische Stimulation; keine α_2 auf SMC	Rump <i>et al.</i> , 1991

2	isometrische Konstriktionsmessung	Nierenarterie	Schwein	funktioneller α_2 -Nachweis erfolglos		selektive α_2 -Stimulation ohne Effekt	Ohgushi <i>et al.</i> , 1993
3	isometrische Konstriktionsmessung	Nierenarterienast erster Ordnung (I), Interlobärarterie (II)	Kaninche	allenfalls marginale α_2 -Population	keine Subtypisierung	α_2 -Stimulation: Geringer Effekt, möglicherweise durch α_1 (I>II); α_2 -Hemmung: Kein Effekt	Owen, 1993
4	RT-PCR und Southern Blot	Aorta	Mensch	ja	$\alpha_{2A} > \alpha_{2B} > c$		Eason & Liggett, 1993
5	<i>RNase protection assay</i>	Aorta	Mensch	ja	$\alpha_{2C} > \alpha_{2B} = c$		Berkowitz <i>et al.</i> , 1994
6	<i>in-situ</i> Hybridisierung, <i>RNase protection assay</i>	Aorta	Kaninche	nein	nur α_{2A} -RNA nachgewiesen	alle α_{2A} -Signale in SMC und Endothelzellen	Handy <i>et al.</i> , 1998
7	<i>RNase protection-assay</i> , Immunhistochemie, Kalziummessung	Aorta, isolierte Aorta-SMC	Mensch	nein		Nachweis von α_{2C} nur in <i>vasa vasorum</i>	Chotani <i>et al.</i> , 2004
8	semiquantitative RT-PCR	Aorta	Ratte	α_{2A}		nur Nachweisversuch für α_{2A}	Kobayashi <i>et al.</i> , 2004
9	quantitative RT-PCR	Aorta	Maus	ja	$\alpha_{2A} > \alpha_{2C} > c$	andere Referenzgene	Regard <i>et al.</i> , 2008
10	isometrische Konstriktionsmessung	Thorakalaorta	Ratte		Nachweis von α_{2B}	α_{2B} kontrahierend	Wong <i>et al.</i> , 2010

11	isometrische Konstriktionsmessung	Bauchaorta	Ratte		keine Subtypisierung, am ehesten α_{2B}	prazosinsensitive α_2 -Stimulation kontrahierend	Lavhale <i>et al.</i> , 2010
12	isobare Konstriktionsmessung	A. cerebri media	Ratte	unselektiver α_2 -Nachweis	keine Subtypisierung	dilatierende α_2 auf SMC in Abhängigkeit von basalem cGMP	Bryan <i>et al.</i> , 1995
13	Bindungsstudie	Gehirnarterien	Kalb	unselektiver α_2 -Nachweis	keine Subtypisierung		De Keyser <i>et al.</i> , 1988
14	semiquantitative RT-PCR	A. basilaris	Ratte	ja	$\alpha_{2B} > \alpha_{2A} > c$	nur A. basilaris berücksichtigt	Phillips <i>et al.</i> , 1997
15	isometrische Konstriktionsmessung, Western Blot	piale Äste der A. cerebri media	Ziege	α_{2A}	nur Nachweisversuch für α_{2A} (Western Blot)	minimale Konstriktion auf selektive α_2 -Stimulation	Monge <i>et al.</i> , 2010
16	isometrische Konstriktionsmessung	A. carotis communis	Schwein	keine Subtypisierung		selektive α_2 -Stimulation führte zu endothelabhängiger Dilatation	Ohgushi <i>et al.</i> , 1993
17	isometrische Konstriktionsmessung	A. carotis communis	Ratte	keine Subtypisierung		selektive α_2 -Stimulation führte zu Dilatation	Iaccarino <i>et al.</i> , 2002
18	quantitative RT-PCR	A. carotis communis	Ratte	nein	nur α_{2A} -RNA nachgewiesen	nur ein Referenzgen, Expression von α_{2A} vor allem in der Adventitia	Faber & Yang, 2006
19	isometrische Konstriktionsmessung	Äste der A. mesenterica superior	Ratte	kein funktioneller α_2 -Nachweis		kein Effekt durch α_2 -Stimulation in präkontrahierten Gefäßen	Van der Graaf <i>et al.</i> , 1995

20	isometrische Konstriktionsmessung	Mesenterialarterien dritter Ordnung	Maus		keine Subtypisierung	dilatierende α_2 auf Endothelzellen, wahrscheinlich α_{2A}	Thorin <i>et al.</i> , 1998
21	isometrische Konstriktionsmessung	Mesenterialarterien	Ratte		keine Subtypisierung	α_2 -Liganden mit unspezifischer Wirkung an α_1 -Adrenozeptoren	Artigues-Varin <i>et al.</i> , 2002
22	isometrische Konstriktionsmessung	Mesenterialarterien erster Ordnung	Ratte		keine Subtypisierung	konstriktorische α_2 auf SMC, dilatierende α_2 auf Endothelzellen	Blanco-Rivero <i>et al.</i> , 2006
23	isometrische Konstriktionsmessung	A. mesenterica superior	Hund		keine Subtypisierung	Konstriktion auf α_2 -Stimulation	Shimamoto <i>et al.</i> , 1992
24	isometrische Konstriktionsmessung	A. mesenterica	Schwein	nicht subtypeselektiver α_2 -Nachweis erfolglos		selektive α_2 -Stimulation ohne Effekt	Ohgushi <i>et al.</i> , 1993
25	semiquantitative RT-PCR	A. mesenterica superior mit Ästen zweiter Ordnung	Ratte	ja	$\alpha_{2B} > \alpha_{2A} = c$	Einschluss von distalen Gefäßen	Phillips <i>et al.</i> , 1997
26	isometrische Konstriktionsmessung	A. mesenterica superior	Ratte		Nachweis von α_{2A} und α_{2B}	α_{2A} und α_{2B} auf Endothel relaxierend, α_{2B} auf SMC kontrahierend	Wong <i>et al.</i> , 2010
27	isometrische Konstriktionsmessung	A. pulmonalis	Kaninche		keine Subtypisierung	endothelunabhängig unselektive α_2 -Stimulation konstriktorisch	MacLean <i>et al.</i> , 1993

28	Freisetzung radioaktiven Noradrenalins	A. pulmonalis	Kaninche	nein	Konzentration auf die Präsynapse	Nachweis präsynaptischer α_{2A} -Adrenozeptoren	Molderings & Göthert, 1995
29	semiquantitative RT-PCR	A. pulmonalis	Ratte	nein	nur α_{2B} -RNA nachgewiesen	α_{2A} und α_{2C} negativ	Phillips <i>et al.</i> , 1997
30	isometrische Konstriktionsmessung	A. pulmonalis vierter Ordnung	Schaf		funktioneller Nachweis nur von α_{2A}	konstriktorische α_{2A} ; unselektive α_2 -Stimulation verringert Konstriktion	Sathishkumar <i>et al.</i> , 2006
31	isometrische Konstriktionsmessung	Pulmonalarteri zweiter bis dritter Ordnung	Schwein		keine Subtypisierung	geringe Konstriktion auf α_2 -Stimulation	Persson <i>et al.</i> , 2011

Tabelle 25: Vergleichende Darstellung der Expression von α_2 -Adrenozeptoren aus der Literatur: Die Hintergrundfarben kodieren für die folgenden Gefäße: dunkelgrün: Nierenarterie; hellgrün: Aorta; dunkelblau: Gehirnarterien; hellblau: A. carotis; orange: kleine Mesenterialarterien; gelb: A. mesenterica superior; dunkelrot: A. pulmonalis

Die vorliegende Arbeit weist für jedes untersuchte Gefäßgebiet das Vorkommen von α_{2A} - und α_{2B} -Adrenozeptor-RNA nach. Dabei überwogen die α_{2A} -RNA-Level in allen Gefäßgebieten die α_{2B} -RNA-Level. Übersichtshalber sind die Verhältnisse in Abbildung 31 dargestellt.

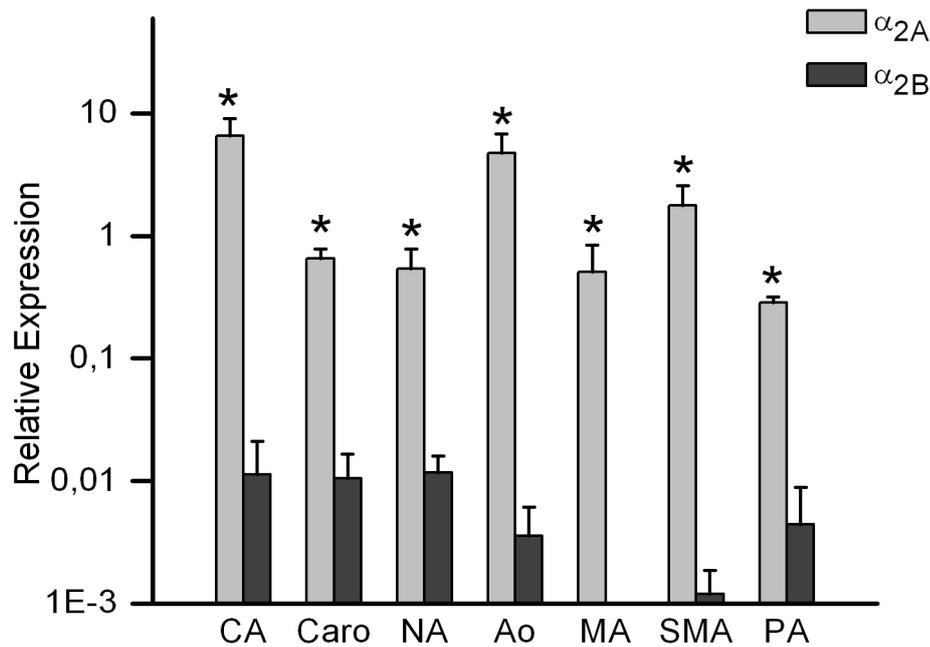


Abbildung 31: Dargestellt sind die RNA-Level des α_{2A} - (hellgrau) und α_{2B} -Adrenozeptors (dunkelgrau) in den untersuchten Gefäßgebieten. Es fällt auf, dass in allen Gefäßgebieten die RNA-Level des α_{2A} -Adrenozeptors quantitativ über denen des α_{2B} -Adrenozeptors liegen. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert und zeigt die auf die Referenzgene Hprt1, Ywhaz und Sdha normierten RNA-Level der Rezeptoren. Die Abszisse zeigt die auf die Rezeptortranskription untersuchten Gefäßgebiete. Folgende Abkürzungen finden dabei Verwendung: CA = Gehirnarterien, Caro = A. carotis, NA = Nierenarterie, Ao = Bauchaorta, MA = kleine Mesenterialarterien, SMA = A. mesenterica superior, PA = Pulmonalarterie; * = $p < 0,05$ für α_{2A} vs. α_{2B}

Verglichen mit den α_1 -Adrenozeptoren existiert erheblich weniger Literatur zu vaskulären α_2 -Adrenozeptoren. Ferner fällt auf, dass in den Untersuchungen zu α_2 -Adrenozeptoren eine Vielzahl an unterschiedlichen Spezies verwendet wurde (Tabelle 25: Zeilen 2-4, Zeilen 8-9, Zeile 13, Zeile 15, Zeile 23 und Zeile 30). Dies erschwert eine einheitliche Aussage zusätzlich.

In einigen Gefäßgebieten fehlte bis *dato* eine Subtypisierung der α_2 -Adrenozeptoren gänzlich (Nierenarterie, kleine Mesenterialarterien). Über andere Gefäßgebiete waren bisher nur semiquantitative Daten verfügbar (Gehirnarterien, A. carotis communis, A. mesenterica superior, Pulmonalarterie).

Eine quantitative RT-PCR-Untersuchung zu den α_2 -Adrenozeptoren existierte bisher nur für Aortengewebe (Tabelle 25: Zeile 9). Diese Publikation zeigte die Dominanz des α_{2A} über den α_{2B} auf RNA-Ebene, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte.

In den restlichen Gefäßen, in denen eine Subtypisierung auf andere Weise durchgeführt wurde, war in den meisten Fällen der Nachweis von α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} möglich.

Die Bedeutung der α_2 -Adrenozeptoren für den Kontraktilitätszustand der glatten Gefäßmuskulatur bleibt widersprüchlich. Die funktionellen Zuschreibungen umfassen Dilatation (Tabelle 25: Zeile 20), Konstri-

tion (Link *et al.*, 1996) und sogar das Fehlen eines Einflusses auf den Gefäßdurchmesser (Tabelle 25: Zeile 19).

Auch in den eigenen qPCR-Ergebnissen zeigten sich wenig Anhaltspunkte, die für α_2 -Adrenozeptoren als Mechanosensoren sprachen.

Zwar waren in den Vergleichspaaren Gehirnarterien vs. A. carotis und Gehirnarterien vs. Pulmonalarterie jeweils die α_{2A} -RNA signifikant im Widerstandsgefäß erhöht; im Vergleichspaar Aorta-Nierenarterie fand sich jedoch in Aortengewebe mehr α_{2A} -RNA als in Nierenarteriengewebe. Dem Experiment lag jedoch die Annahme zugrunde, dass ein Widerstandsgefäß stets höhere RNA-Level eines Mechanosensors aufweisen müsse als ein Leitungsgefäß. Demnach wurde der α_{2A} -Adrenozeptor als wahrscheinlich nicht mechanosensitiv eingestuft.

Für die α_{2B} -RNA-Level fanden sich in keinem Vergleichspaar signifikante Unterschiede, auch nicht in kleinen Mesenterialarterien.

Zudem war die α_{2A} -Expressionsdominanz über alle Gefäßgebiete hinweg konstant; d.h., dass α_{2A} -Rezeptoren sowohl in Leitungsgefäßen als auch in Widerstandsgefäßen stärker als α_{2B} -Rezeptoren exprimiert werden.

Deshalb wurden die α_2 -Adrenozeptoren in den funktionellen Untersuchungen an kleinen Mesenterialarterien nicht berücksichtigt, da weder die eigenen Daten noch die bestehende Literatur hinreichend Evidenz für die Einstufung als putative Mechanosensoren boten.

4.1.6 Beta₂-Adrenozeptor

Zeile Nr.	Methode	Gewebe	Spezies	Nachweis des β_2	Weitere Ergebnisse und Besonderheiten	Referenz
1	isometrische Konstriktionsmessung	A. interlobaris	Hund	ja	β_2 dominant gegenüber β_1	Ozaki <i>et al.</i> , 1982
2	Immunhistochemie	Hauptäste der Nierenarterie	Ratte	unselektiver β -Adrenozeptor-Nachweis	Rezeptoren in allen Gefäßschichten	Amenta <i>et al.</i> , 1983
3	isometrische Konstriktionsmessung	A. interlobaris	Hund	ja	β_2 dominant gegenüber β_1	Toda & Okamura, 1990
4	Autoradiographie	intra-parenchymatös Äste der A. renalis	Ratte	ja	kein β_1 nachweisbar; β_2 ausschließlich nerval	Lakhani <i>et al.</i> , 1994

5	isometrische Konstriktionsmessung, Vergleich Wildtyp mit β_1 - oder β_2 -KO-Maus	A. renalis	Maus	nein	kein Effekt auf unselektive β -Stimulation	Chruscinski <i>et al.</i> , 2001
6	isobare Konstriktionsmessung	Aorta abdominalis	Ratte	ja		Mulder <i>et al.</i> , 1997
7	isometrische Konstriktionsmessung, Vergleich Wildtyp mit β_1 - oder β_2 -KO-Maus	Thorakalaorta	Maus	ja	β_1 dominiert über β_2	Chruscinski <i>et al.</i> , 2001
8	quantitative RT-PCR	Aorta	Maus	ja	andere Referenzgene	Regard <i>et al.</i> , 2008
9	Immunhistochemie, Western Blot aus kultivierten aortalen Endothelzellen	Aorta	Maus	ja	β_2 auf Endothelzellen und SMC	Wenzel <i>et al.</i> , 2009
10	quantitative RT-PCR, Western Blot	Aorta	Ratte	ja	nur ein Referenzgen, Effizienz pauschal 2 gesetzt; $\beta_3 > \beta_1 > \beta_2$	Oliver <i>et al.</i> , 2009
11	isobare Konstriktionsmessung	A. cerebri media	Katze	nein	funktionell nur β_1 -Nachweis	Edvinsson & Owman, 1974
12	Bindungsstudie	Gehirnarterien	Mensch	ja	$\frac{\beta_2}{\beta_1} = \frac{3}{2}$	Tsukahara <i>et al.</i> , 1986
13	Bindungsstudie	Gehirnarterien	Kalb	ja	$\frac{\beta_2}{\beta_1} = \frac{7}{3}$	De Keyser <i>et al.</i> , 1988
14	isometrische Konstriktionsmessung	A. carotis communis	Ratte	β_1 und/oder β_2, β_3	selektiver β_3 -Nachweis, Bindungsstelle von Propranolol nicht weiter verfolgt	MacDonald <i>et al.</i> , 1999

15	isometrische Konstriktionsmessung, Vergleich Wildtyp mit β_1 - oder β_2 -KO-Maus	A. carotis	Maus	nein	funktionell nur Nachweis von β_1	Chruscinski <i>et al.</i> , 2001
16	Druckmessung bei flusskonstanter Perfusion	A. carotis communis	Ratte	ja	überwiegend β_2 , wenig β_1 , beide auf SMC	Chiba & Tsukada, 2001
17	Immunhistochemie	A. carotis communis	Ratte	ja	Detektion von β_2 in Endothelzellen und SMC	Iaccarino <i>et al.</i> , 2002
18	isometrische Konstriktionsmessung	kleine Mesenterialarterien	Ratte	ja	β_1 und β_2 beide vorhanden	Zwaveling <i>et al.</i> , 1996
19	isobare Konstriktionsmessung	Mesenterialarterien dritter Ordnung	Ratte	ja		Mulder <i>et al.</i> , 1997
20	isometrische Konstriktionsmessung, Vergleich Wildtyp mit β_1 - oder β_2 -KO-Maus	kleine Mesenterialarterien	Maus	nein	funktioneller Nachweis nur von β_1	Chruscinski <i>et al.</i> , 2001
21	isometrische Konstriktionsmessung, Fluoreszenzmikroskopie	Mesenterialarterien dritter Ordnung	Ratte	nein	nur Nachweis von β_1 , nicht von β_2 und β_3	Briones <i>et al.</i> , 2005
22	isometrische Konstriktionsmessung	A. mesenterica superior	Hund	ja	β_2 dominant gegenüber β_1	Toda & Okamura, 1990

23	isometrische Konstriktionsmessung	A. mesenterica superior	Japanmakak (Macaca fuscata)	ja	β_2 dominant gegenüber β_1	Toda & Okamura, 1990
24	isometrische Konstriktionsmessung	A. mesenterica superior	Maus	ja	β_1 dominant gegenüber β_2 und β_3	Al Zubair et al., 2008
25	Bindungsstudie	Pulmonalarteri	Ratte	ja		Shaul et al., 1990
26	isometrische Konstriktionsmessung, Vergleich Wildtyp mit β_1 - oder β_2 -KO-Maus	Pulmonalarteri	Maus	nein	funktioneller Nachweis nur von β_1	Chruscinski et al., 2001
27	Immunhistochemie, Western Blot aus kultivierten pulmonalarteriellen Endothelzellen	Pulmonalarteri	Maus	ja	β_2 auf Endothelzellen und SMC	Wenzel et al., 2009

Tabelle 26: Vergleichende Darstellung der Expression von β_2 -Adrenozeptoren aus der Literatur: Die Hintergrundfarben kodieren für die folgenden GefäÙe: dunkelgrün: Nierenarterie; hellgrün: Aorta; dunkelblau: Gehirnarterien; hellblau: A. carotis; orange: kleine Mesenterialarterien; : A. mesenterica superior; dunkelrot: A. pulmonalis

Die vorliegende Arbeit weist für jedes untersuchte Gefäßgebiet das Vorkommen von β_2 -Adrenozeptor-RNA nach. Übersichtshalber sind die Verhältnisse in Abbildung 32 dargestellt.

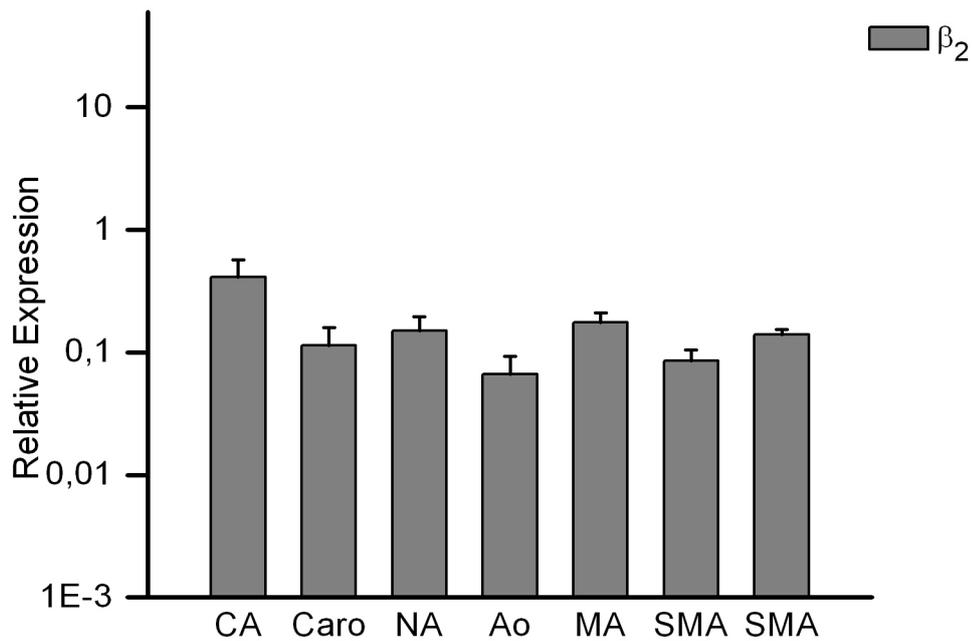


Abbildung 32: Dargestellt sind die RNA-Level des β_2 -Adrenozeptors (grau) in den untersuchten Gefäßgebieten. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert und zeigt die auf die Referenzgene Hprt1, Ywhaz und Sdha normierten RNA-Level der Rezeptoren. Die Abszisse zeigt die auf die Rezeptortranskription untersuchten Gefäßgebiete. Folgende Abkürzungen finden dabei Verwendung: CA = Gehirnarterien, Caro = A. carotis, NA = Nierenarterie, Ao = Bauchaorta, MA = kleine Mesenterialarterien, SMA = A. mesenterica superior, PA = Pulmonalarterie

Der Nachweis von β_2 (auf RNA-Basis, Protein-Basis oder funktionell) konnte in den jeweiligen Gefäßen bestätigt werden. Bisher existierten nur für Aortengewebe quantitative RT-PCR-Untersuchungen zum β_2 -Adrenozeptor (Tabelle 26: Zeile 8 und Zeile 10). Beide Untersuchungen stimmen in ihrem Nachweis des β_2 -Adrenozeptor in Aortengewebe mit der vorliegenden Arbeit überein, trotz teils methodischer Differenzen (Zeile 10: Keine Effizienzbestimmung, nur ein Referenzgen).

Im heterologen Expressionssystem war keine Mechanosensitivität für den β_2 feststellbar (Zou *et al.*, 2004; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Das vorgestellte PCR-Experiment wurde dennoch durchgeführt, da es Evidenz für mechanosensitive 7TMR mit G_s -Signaltransduktion gibt (Zhang *et al.*, 2009; Abdul-Majeed & Nauli, 2011).

Stimulation des β_2 führt über Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel zur Relaxation glatter Muskelzellen. Ein Sensor für den myogenen Tonus muss jedoch zur Kontraktion führen. Es sind also zwei Konstellationen für einen putativ mechanosensitiven β_2 denkbar:

1. Der β_2 wird durch mechanische Dehnung gehemmt, was zu einem Überwiegen kontraktiver Stimuli in glatten Muskelzellen führt. Hinweisend für eine Rolle im myogenen Tonus wäre also ein vermehrtes Vorkommen in myogenen Gefäßen.

2. Der β_2 wird durch mechanische Dehnung stimuliert, was zu einem Überwiegen relaxierender Stimuli in glatten Muskelzellen führt. Hinweisend für eine Rolle im myogenen Tonus wäre also ein vermehrtes Vorkommen in Leitungsgefäßen.

In der vorliegenden Arbeit waren die β_2 -RNA-Level nur im Vergleichspaar Pulmonalarterie vs. Gehirnarterien im Widerstandsgefäß erhöht. Eine Erhöhung der β_2 -RNA-Level im Leitungsgefäß war in keinem getesteten Vergleichspaar festzustellen. Der alleinige signifikante Unterschied in einem Vergleichspaar in Kombination mit einer unklarerer Signaltransduktion (theoretische Hemmung des β_2 durch Dehnung) wurde als zu schwache Evidenz gewertet, um daraus eine mechanosensitive Funktion des β_2 -Adrenozeptor zu schließen.

Kleine Mesenterialarterien waren in der vorliegenden Arbeit die Gefäße der Wahl für isobare Konstriktionsmessungen. Die β_2 -RNA war in den kleinen Mesenterialgefäßen gegenüber ihrem proximalen Leitungsgefäß nicht signifikant verändert. Deshalb wurde beschlossen, den β_2 -Adrenozeptor bei funktionellen Untersuchungen an kleinen Mesenterialarterien nicht weiter zu berücksichtigen.

4.1.7 Andere Ansätze zur differierenden Physiologie sukzessiver Gefäßabschnitte

Di Santo und Mitarbeiter berichten über ein alternatives Spleißen von konstitutiven Domänen des Myosins, das als Erklärung für die funktionellen Unterschiede zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäßen in Frage kommt.

Kleinere muskuläre Arterien enthalten, verglichen mit der Aorta, größere Mengen einer Isoform der schweren Myosinkette, die mit einer höherer ATPase-Aktivität verknüpft ist.

Darüber hinaus enthalten kleinere muskuläre Arterien größere Mengen einer Isoform der leichten Myosinkette die mit (i) höherer maximaler enzymatischer Umsatzrate (V_{max}) und (ii) höherer ATPase-Aktivität verknüpft ist. Schließlich wird eine bessere mechanochemische Koppelung in den kleineren Arterien konstatiert.

In Summe wird also die unterschiedliche Physiologie entlang des Arterienbaums mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der Myosinproteine und damit unterschiedlicher Kontraktilität erklärt (DiSanto *et al.*, 1997).

Morita und Mitarbeiter fanden in glatten Muskelzellen aus terminalen Mesenterialarterien charakteristische transmembranäre Kalziumströme. Diese unterschieden sich substantiell von denen in glatten Muskelzellen aus proximaleren Mesenterialästen (Morita *et al.*, 1999). Ursächlich hierfür scheinen distinkte Subtypen von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen (Ca_V) in den terminalen glatten Muskelzellen zu sein. Die Autoren spekulieren über eine bisher nicht-klassifizierte Isoform der den Spannungssensor enthaltenden und porenformenden α_1 -Kanaluntereinheit in den peripheren glatten Muskelzellen. Derzeit wird eher davon ausgegangen, dass unter anderem eine Zusammensetzung des Kanals aus distinkten Isoformen von nicht-porenformenden $\alpha_2\delta$ -, β - und γ -Kanaluntereinheiten gewebespezifische Leitfähigkeiten vermitteln kann (Klugbauer *et al.*, 2003). Die genannten, nicht-porenformenden Untereinheiten wurden in der Arbeit von Morita und Kollegen jedoch nicht untersucht. Nichtsdestotrotz könnten die nicht-porenformenden Isoformen die an proximalen und distalen glatten Muskelzellen erhobenen Befunde

erklären. Damit könnten auch aus differierenden Isoformen zusammengesetzte Ca_v letztlich das molekulare Korrelat für die unterschiedlich ausgeprägte Myogenität distaler und proximaler Mesenterialäste darstellen.

4.2 Fundamentale Eigenschaften des Phänomens myogener Tonus

4.2.1 Die bisigmoide MT_1 -Kurve

Kleine Mesenterialarterien wurden isoliert, kanüliert und sukzessiv steigenden intravasalen Druckwerten ausgesetzt. Dabei wurde der Gefäßdurchmesser kontinuierlich registriert. Die Druckerhöhung erfolgte durch Luftdruck in Stufen von 5-10 mmHg. Die zu jeder Druckstufe gehörigen Durchmesserwerte stellen Werte im Gleichgewichtszustand dar. Dies bedeutet, dass dem Gefäß genügend Zeit gelassen wird, die Konstriktion auszubilden, die zur Reduktion der durch die Druckerhöhung gesteigerten Wandspannung benötigt wird.

Falls das Gefäß unter steigendem Druck durch seine elastische Eigenschaften zunehmend zur Seite abwich, wurde die longitudinale Spannung erhöht um die Längsachse des Gefäßes wieder zu begradigen. Während der ersten Druckleiter (5-120 mmHg) wurde festgestellt, ob das untersuchte Gefäß einen myogenen Tonus ausbildete. War dies der Fall, wurde eine zweite Druckleiter angeschlossen. Während dieser wurden entweder Pharmaka oder Pufferlösung appliziert. Es schloss sich eine dritte Druckleiter an, die in Abwesenheit von extrazellulären Kalziumionen und zusätzlicher Chelierung mit EDTA stattfand. Damit dilatierte das Gefäß passiv auf den intravasalen Druck. Die Durchmesserwerte der dritten Druckleiter dienten zur Normierung der Durchmesserwerte von Druckleiter 1 und 2. Durch die Normierung der Differenz auf den kalziumfreien Durchmesser wurde der myogene Tonus berechnet.

Interessanterweise zeigt die Kurve zum myogenen Tonus von Druckleiter 1 (MT_1) eine bisigmoide Form, was bisher in der Literatur so nicht beschrieben wurde.

Es wurde eine Analyse des Einflusses von Longitudinalspannung auf die Form der MT_1 -Kurve vorgenommen. Diese ergab, dass auch Gefäße, die nicht longitudinal adjustiert werden mussten, einen bisigmoiden MT_1 ausbildeten. Ein Zustandekommen der bisigmoiden Kurve durch ein Artefakt erscheint deshalb unwahrscheinlich.

Es existieren mehrere Möglichkeiten, zu erklären, warum in bisherigen Publikationen ein bisigmoider Verlauf einer MT -Kurve noch nicht beobachtet wurde.

- ▷ Die zeitlichen Intervalle zwischen den einzelnen Druckstufen waren größer (Henrion *et al.*, 1997; Iglarz *et al.*, 1998; Gschwend *et al.*, 2003; Garry *et al.*, 2007; Gannon *et al.*, 2008; Kauffenstein *et al.*, 2010)
- ▷ Die verwendeten Gefäße waren anderer Herkunft (Earley *et al.*, 2007; Gannon *et al.*, 2008)
- ▷ Die Fallzahl der untersuchten Gefäße war geringer (Earley *et al.*, 2007)
- ▷ Der myogene Tonus wurde anders berechnet (Davis & Sikes, 1990; Hill *et al.*, 1990; Falcone *et al.*, 1993; Chlopicki *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2009; Anfinogenova *et al.*, 2011)

Die hier angewandte Methode (Normierung auf den Durchmesser in kalziumfreier Umgebung, siehe auch Gleichung 7 auf Seite 38) stellt die anerkannteste Berechnungsmethode dar (D'Angelo *et al.*, 1997; Henrion *et al.*, 1997; Coats *et al.*, 2001; Earley *et al.*, 2007). Der Vorteil hierbei ist, dass auch eine kontraktionsbedingte Versteifung des Gefäßes ohne Durchmesserreduktion registriert wird und durch die Differenz zum nichtkontraktilen Zustand als myogener Tonus zum Ausdruck kommt.

Die feineren Intervalle der Druckstufen in der vorliegenden Arbeit sind wahrscheinlich der Hauptgrund für die bisherige Latenz der bisigmoiden MT_1 -Kurve. Insbesondere bei großen Druckintervallen kann das Plateau (hier bei 60 mmHg) durch Interpolierung überdeckt werden.

Die bisigmoide Form der MT_1 -Kurve wurde auf Gefäßebene über eine zweistufige Konstriktionskinetik erklärt:

Von 5 bis 30 mmHg erfolgt eine passive Dilatation des Gefäßes in allen Druckleitern;
von 30 bis 70 mmHg erfolgt eine Versteifung des Gefäßes ohne Verkürzung des Durchmessers;
ab 70 mmHg erfolgt eine Verkürzung des Durchmessers.

Nachgewiesen wurde dies durch eine Untersuchung der drei vaskulären Spannungs-Dehnungskurven. Detailliert sind die Spannungs-Dehnungskurven in der oberen Bildhälfte von Abbildung 33 dargestellt. Zunächst bedeutet der Verlauf aller drei Spannungs-Dehnungskurven eine passive Dilatation der Gefäße. Punkt 1 in der unteren Bildhälfte von Abbildung 33 (Ausschnittsvergrößerung der oberen Bildhälfte) markiert beispielhaft einen Zeitpunkt des passiven Durchmessererlaufs.

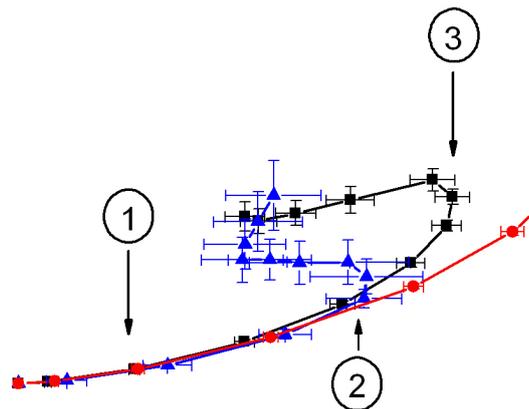
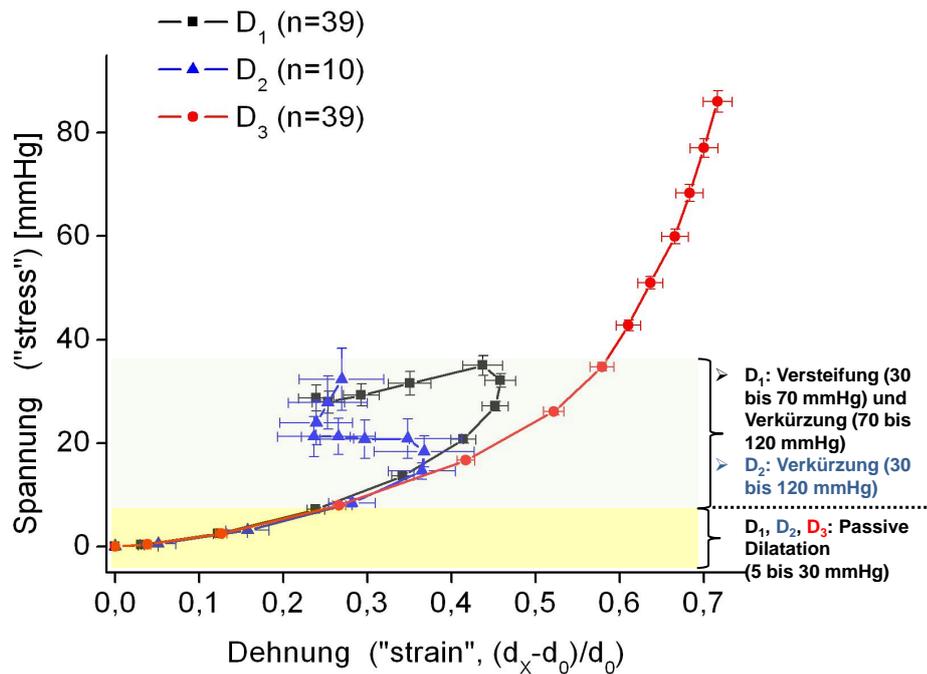


Abbildung 33: Die obere Bildhälfte zeigt die Spannungs-Dehnungskurven zur ersten (in schwarz: D_1), zweiten (in blau: D_2) und dritten (in rot: D_3 , mit passiver Dilatation unter kalziumfreien Bedingungen) Druckleiter. Auf der Abszisse findet sich die Dehnung als Differenz des aktuellen Durchmesserwerts zum Ausgangsdurchmesser normiert auf den Ausgangsdurchmesser. Die Ordinate zeigt die Wandspannung, vereinfacht ausgedrückt als Produkt von intravasalem Druck und Dehnung (Durchmesser normiert auf den Ausgangsdurchmesser). Aufbauend auf Abbildung 19 wird ein passiver Verlauf der Wandspannung von einem aktiven Verlauf (für D_1 und D_2) unterschieden. Der passive Verlauf erfolgt im Druckbereich 5-30 mmHg parallel zu D_3 und ist gelb hinterlegt. Der aktive Verlauf erfolgt im Druckbereich 40-120 mmHg und ist grau-blau hinterlegt. Die untere Bildhälfte zeigt eine Ausschnittsvergrößerung der oberen Bildhälfte. Herausgestellt sind drei Punkte, die für die Interpretation der drei Kurvenverläufe wichtig sind: Punkt 1 bezeichnet einen beispielhaften Punkt, an dem die drei Kurven noch parallel verlaufen. Hier findet also in allen drei Druckleitern eine passive Dilatation statt. Dies ändert sich an Punkt 2. Das Gefäß erfährt hier während D_1 eine Versteifung, während D_2 konstringiert es sofort und während D_3 dilatiert es weiter passiv. Die Versteifung während D_1 schlägt an Punkt 3 dann ebenfalls in eine Konstriktion um. Diese zweistufige Verhalten während D_1 (Punkt 2 bis Punkt 3: Versteifung, ab Punkt 3: Konstriktion) bedingt die bisigmoide Form der MT_1 -Kurve.

Anschließend lässt sich der Verlauf von Kurve D_1 in zwei Phasen untergliedern, die beide auf Kontraktion der glatten Muskelzellen beruhen. In der ersten Phase (von Punkt 2 bis Punkt 3 in der unteren Bildhälfte von Abbildung 33) bringt die Kontraktion der glatten Muskelzellen noch nicht genug Energie auf, um gegen den dilatierenden Druck eine Verkürzung des Gefäßdurchmessers zu setzen. In der Spannungs-Dehnungskurve zeigt sich dies durch eine Abweichung der D_1 -Kurve von der D_3 -Kurve, ohne dass der Durchmesser und damit die Dehnung abnimmt. Über die Berechnung der Steifheitskoeffizienten von D_1 und D_3 lässt sich zeigen, dass bis zu Punkt 3 der Abweichung der beiden Kurven eine durch glattmuskuläre Kontraktion bedingte größere Gefäßsteife während D_1 zugrunde liegt.

Dann erst erfolgt mit der zweiten Phase (ab Punkt 3 in der unteren Bildhälfte von Abbildung 33) die Verkürzung des Gefäßdurchmessers. Die Spannungs-Dehnungskurve verläuft erstmals nach links. Diese charakteristische Abfolge von isometrischer und isotoner Kontraktion wird auf dem Feld der Skelettmuskulatur als Unterstützungskontraktion bezeichnet. Sie kommt beispielsweise zustande, wenn ein schweres Gewicht vom Boden gehoben werden soll. Zunächst muss der Muskel eine isometrische Grundspannung entwickeln. Dann verkürzt sich der Muskel isoton, was zum Anheben des Gewichts führt. Die Versteifung des Gefäßes entspricht dem basalen Tonus, bzw. dem myogenen Tonus wie er auch von Schubert *et al.* formuliert wird (Schubert *et al.*, 2008). Dabei unterscheiden die Autoren den myogenen Tonus (entspricht dem folgenden Konzept des basalen Tonus) bei konstantem Druck von der „aktiven“ myogenen Antwort (entspricht dem folgendem Konzept des myogenen Tonus) als konstriktorische Reaktion auf Druckerhöhung. Unter Berücksichtigung der bereits in der Einleitung definierten Begriffe (siehe auch Kapitel 1.1) lassen sich diese wie folgt auf die bisigmoide Kurve anwenden:

Als basaler Tonus wird der Bereich bezeichnet, in dem der Druck dem physiologischen Druck entspricht, d.h. die Plateauphase (50-70 mmHg). Für Ratten wurde in Mesenterialarterien der gleichen anatomischen Lokalisation *in vivo* ein fraktioneller Druck von $65 \pm 2\%$ bestimmt (Fenger-Gron *et al.*, 1995). Dabei ist der fraktionelle Druck der prozentuale Anteil des lokalen Druckes am mittleren systemischen Druck. 13-14 Wochen alte männliche Mäuse vom Stamm FVB/N weisen einen mittleren systemischen Druck von ca. 100 mmHg auf (Hein *et al.*, 1995, gemessen über einen Katheter in der A. carotis). Führt man die beiden Werte zusammen, so ergibt sich für die untersuchten Mesenterialarterien ein lokaler Druck in von 63-67 mmHg. Dieser Bereich fällt in den Plateaubereich der MT_1 -Kurve. Damit kann angenommen werden, dass das Plateau die zum mittleren lokalen arteriellen Druck gehörigen Tonuswerte repräsentiert.

Als myogener Tonus wird der Bereich der MT_1 -Kurve bezeichnet, in dem der applizierte Druck den physiologischen Bereich übersteigt. Der basale Tonus bildet hierbei einen Grundtonus (sogenannte Blutflussreserve (Folkow, 1989)), der sich je nach externer Anforderung verstärken oder vermindern kann. Im Fall einer druckbedingten Verstärkung entspricht die Tonusveränderung dem myogenen Tonus.

MT_2 weist dieses versteifungsbedingte Plateau nicht mehr auf. Bezüglich der Spannungs-Dehnungskurve von D_2 lässt sich zeigen, dass diese ab Punkt 2 in der unteren Bildhälfte von Abbildung 33 nach links verläuft. Damit verkürzt sich der Gefäßdurchmesser während D_2 zum gleichen Zeitpunkt der Dissoziation von D_2 und D_3 , ohne dass vorher eine Versteifung erfolgen würde. Dies entspricht einem monophasischen Konstriktionsverhalten des Gefäßes während MT_2 und bedingt den einfach sigmoiden MT_2 -Kurvenverlauf.

Zu den Ursachen des unterschiedlichen Verhaltens der Gefäße während zweier sukzessiv applizierter

Druckleitern werden im Folgenden die molekularen Effektoren der glattmuskulären Kontraktion betrachtet.

Appliziert man steigenden intravaskulären Druck an einem Gefäß, verändern sich diverse Parameter, die eine Rolle bei der glattmuskulären Kontraktion spielen.

Die Kinetiken der Parameter lassen sich dabei zweiteilen in einen Druckbereich von 0 bis 60 mmHg und in einen Bereich von 60 bis 100 mmHg (Cole & Welsh, 2011).

Es verändern im ersten Bereich die Parameter (in Klammern die Richtung der Veränderung) Membranpotential (Depolarisierung), intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$, Zunahme), Phospho-MLC₂₀ (Zunahme), Phospho-MYPT1 (phosphorylierte Untereinheit der Myosin-Leichtketten-Phosphatase [MLCP], entspricht MLCP-Hemmung: Zunahme).

Im zweiten Bereich steigen nur noch Phospho-MLC₂₀ und Phospho-MYPT1 weiter an, Membranpotential und $[Ca^{2+}]_i$ bleiben konstant (Cole & Welsh, 2011).

Eine genauere Analyse der Phospho-MYPT1-Konzentrationen ergibt, dass bei einer Drucksteigerung von 10 auf 60 mmHg sich dessen Fraktion um 25 % erhöht. Eine weitere Druckerhöhung auf 100 mmHg hat den dreifachen Anstieg der Fraktion gegenüber dem vorangehenden Anstieg zur Folge (Johnson *et al.*, 2009).

Ein mehrstufiges Konzept des myogenen Tonus, das auch die bisigmoide Form der MT₁-Kurve erklärt, wird somit nicht durch eine einzige, ebenfalls bisigmoidal verlaufende Variable plausibel, sondern durch die sukzessive Aktivitätsmodulation von MLCK und MLCP. Es ist wichtig festzuhalten, dass eine Hemmung der MLCP *per se* ohne Nutzen ist, wenn zuvor nicht MLC₂₀ durch MLCK phosphoryliert wurde (Somlyo & Somlyo, 2003; Cole & Welsh, 2011) (siehe auch Abbildungen 2 und 3). Zunächst kann die vermehrte MLCK-Aktivität im ersten Teil des myogenen Tonus nur eine Versteifung des Gefäßes vermitteln, da parallel das funktionell antagonistische Enzym MLCP arbeitet. Da dessen Aktivität im zweiten Teil des myogenen Tonus allmählich reduziert wird, ist nun eine Zunahme der Phospho-MLC₂₀-Fraktion möglich. Die Kinetiken der wichtigsten Effektoren während MT₁ sind in Abbildung 34 aufgeführt.

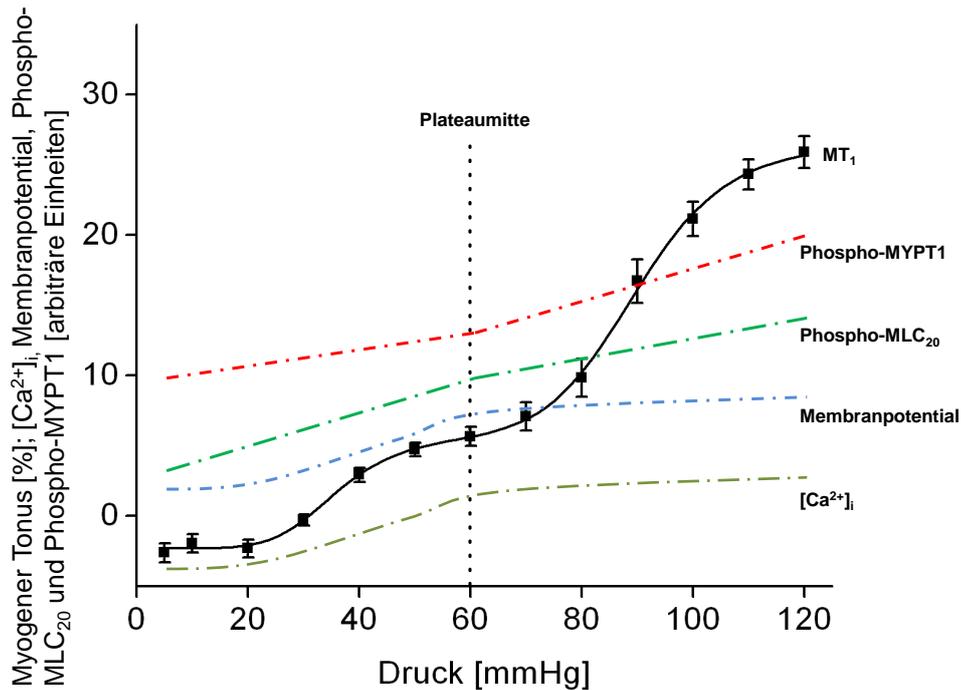


Abbildung 34: Molekulare Ereignisse und ihre Kinetiken während MT_1 . Gezeigt ist der Tonusverlauf von MT_1 mit dem zeitlichen Verlauf der wichtigsten Effektoren. Der Verlauf der Effektoren lässt sich zweiteilen in einen Bereich von 5-60 mmHg und einen Bereich von 60-120 mmHg. Die Verbindung beider Bereiche kommt interessanterweise genau in der Mitte des MT_1 -Plateaus bei 60 mmHg zu liegen, trennt also die erste sigmoide Teilkurve von der zweiten Teilkurve. Damit lässt sich feststellen, welche Effektoren in welcher Tonusphase, d.h. während welcher der beiden sigmoiden MT_1 -Teilkurven, besonders relevant sind. Im ersten Bereich von 5-60 mmHg nimmt das Membranpotential positivere Werte an (Depolarisierung) und es kommt parallel dazu zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Durch die Erhöhung der Kalziumkonzentration steigt die Fraktion des Myosin II, deren leichte Kette phosphoryliert ist (Phospho-MLC₂₀). Parallel steigt auch leicht die inhibierte Fraktion der Myosinleichtenkettenphosphatase (Phospho-MYPT1). Im zweiten Bereich von 60-120 mmHg ändern sich Membranpotential und $[Ca^{2+}]_i$ nicht mehr, dagegen nimmt der fraktionelle Anteil von Phospho-MYPT1 stark zu. Die Phospho-MLC₂₀-Konzentration steigt weiter, da die Myosinleichtenkettenphosphatase zunehmend stärker gehemmt wird. Im ersten Bereich der Kinetiken dominieren die Effektoren des kalziumabhängigen Kontraktionsweges, im zweiten Bereich die Effektoren des kalziumunabhängigen Kontraktionsweges. Die Kinetiken sind aus Cole und Welsh, 2011 entnommen und auf 120 mmHg extrapoliert. Die Trennlinie bei 60 mmHg ist dabei unverändert belassen.

Zum Verlauf der glattmuskulären Kontraktion über der Druckleiter erläutern die Autoren, dass „bis 60 mmHg zwar eine Kontraktion erfolgt, diese aber insuffizient ist, um der dilatierenden Kraft des Drucks entgegenzuwirken“ (übersetzt nach Cole & Welsh, 2011). Diese Aussage ist bis ins Detail mit der obigen Analyse der Spannungs-Dehnungs-Relationen bis 70 mmHg vereinbar, also mit einer Versteifung ohne Verkürzung. Die unterschiedlichen molekularen Mechanismen bis ca. 70 mmHg erklären also das unterschiedliche makroskopische Verhalten des Gefäßes in den beiden Kurvenabschnitten von MT_1 .

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten potentiell mechanosensitiven, $G_{q/11}$ -koppelnden 7TMR weisen auch Signaltransduktion über $G_{12/13}$ -Proteine auf (Siehler, 2009). Sollten nun 7TMR, z.B. α_1 -Adrenozeptoren, durch steigenden intravaskulären Druck mechanisch aktiviert werden, würde dies zunächst über $G_{q/11}$ -Protein-Aktivierung und MLCK-Stimulation zur Förderung des kalziumabhängigen glattmuskulären Kontraktionsweges führen. Dies könnte den ersten Teil der bisigmoiden Kurve erklären,

in dem nach Cole und Welsh $[Ca^{2+}]_i$ ansteigt.

Eine durch zeitliche Verzögerung nachfolgende $G_{12/13}$ -Aktivierung würde über MLCP-Hemmung zur kalziumunabhängigen Kontraktion führen. Dies könnte den zweiten Teil der bisigmoiden Kurve erklären, in dem $[Ca^{2+}]_i$ konstant bleibt.

Die bisigmoide MT_1 -Kurvenform könnte also zusammenfassend als Ausdruck einer sukzessiven Rekrutierung und Aktivierung zweier differenter G-Proteine interpretiert werden: $G_{q/11}$ -Aktivierung gefolgt von $G_{12/13}$ -Aktivierung. Die Effekte beider G-Proteine würden sich dabei allmählich summieren. Abbildung 35 zeigt diese hypothetische zeitliche Abfolge nochmals zusammenfassend.

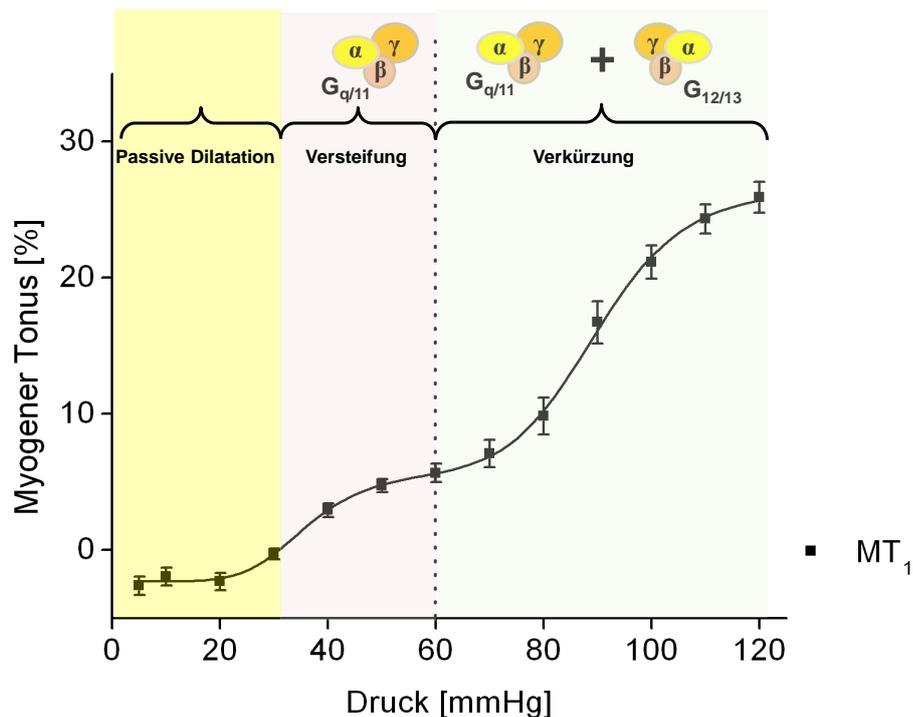


Abbildung 35: Gezeigt ist die hypothetische zeitliche Abfolge der G-Protein-Aktivierung während MT_1 . In der ersten Hälfte erfolgt von 5-30 mmHg noch eine passive Dilatation (gelb hinterlegt, siehe Abbildung 33) unter zunehmender Depolarisierung und zunehmender Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (siehe Abbildung 34). Bis zum Plateau versteift sich das Gefäß dann durch glattmuskuläre Kontraktion ohne Durchmesserverkleinerung (lila hinterlegt). Dann kommt es zur Durchmesserverkürzung (grau-blau hinterlegt). Die zweizeitige Kinetik könnte sich durch das zunächst alleinige Wirken von $G_{q/11}$ -Proteinen und dem von ihnen induzierten kalziumabhängigen Kontraktionsweg im ersten Teil der Kurve (gelb und lila hinterlegt) erklären; im zweiten Teil wird der $G_{q/11}$ -Protein-Signalweg wahrscheinlich durch den kalziumunabhängigen Kontraktionsweg der $G_{12/13}$ -Proteine verstärkt (blau hinterlegt), was damit auch die nun erst erfolgende Verkürzung des Gefäßdurchmessers erklären würde.

Warum die beiden G-Proteine mit einer solchen zeitlichen Differenz aktiviert werden könnten, ließe sich durch biochemische Eigenheiten der jeweiligen G-Proteine erklären: So weisen $G_{\alpha_{12}}$ - und $G_{\alpha_{13}}$ -Proteine einen um den Faktor 10-20 langsameren GDP/GTP-Austausch auf als andere G_{α} -Proteine (Kozasa & Gilman, 1995; Dhanasekaran & Dermott, 1996). Dieser langsamere Austausch könnte die verzögerte Aktivierung der $G_{\alpha_{12/13}}$ -Fraktion im zweiten Teil des MT_1 -Verlaufs bedingen und damit den verzögerten Beginn der kalziumunabhängigen Kontraktion erklären.

Osol *et al.* unterteilen den myogenen Tonus in drei Phasen: 1. Eigentlicher myogener Tonus (40-60 mmHg), 2. myogene Reagibilität (60-140 mmHg, entspricht der „aktiven“ myogenen Antwort von Schubert *et al.*, 2008), 3. forcierte Dilatation (>140 mmHg) (Osol *et al.*, 2002).

Die beiden ersten Phasen sind im Druckspektrum der vorliegenden Arbeit enthalten. Bis Phase 1 dilatiert das Gefäß. Während Phase 1 kommt es zu Abnahme des Membranpotentials und Zunahme der intrazellulären Kalziumlevel mit Durchmesserverkleinerung. In Phase 2 verändern sich alle drei Parameter (Membranpotential, Kalziumlevel, Durchmesser) nur noch wenig in ursprünglicher Richtung. In Phase 3 dilatiert das Gefäß bei weiterer Zunahme der Kalziumlevel.

Dass die Gruppe um Osol die Druckstufe 60 mmHg bis zu 15 Minuten dauern ließ, erklärt auch, warum der myogene Tonus hier früher einsetzt und die Konstriktion komplett ausgebildet ist.

Interessanterweise wird zur Erklärung der Mechanismen in Phase 2 auf das dünne Filament (Aktin) zurückgegriffen: Die Durchmesser Konstanz werde mittels vermehrtem Übergang von G-Aktin (globuläres Aktin) zu F-Aktin (filamentäres Aktin) erreicht. Das Vorliegen von Aktin in filamentärer Form ist dabei förderlich für die glattmuskuläre Kontraktion. In Phase 3 sei dann möglicherweise der Aktinvorrat aufgebraucht, was zu einem Versagen der autoregulatorischen Mechanismen und forcierte Dilatation führe. Die Verschiebung des Gewichtes zwischen G- und F-Aktin in Richtung F-Aktin wiederum wird nachgewiesenermaßen durch ROK vermittelt (Siehler, 2009). ROK ist seinerseits Teil des kalziumunabhängigen Kontraktionswegs der glatten Muskelzellen. Die Erklärung von Osol *et al.* wäre somit vereinbar mit dem Modell, dass ab 60 mmHg der $G\alpha_{12/13}$ -Protein-vermittelte kalziumunabhängige Kontraktionsweg im myogenen Tonus dominiert.

4.2.2 Linksverschiebung der myogenen Antwort und Änderung der Kurvenform bei wiederholter Druckapplikation

Die zweite myogene Antwort (MT_2) war gegenüber der ersten (MT_1) linksverschoben. Die glattmuskuläre Kontraktion setzte also bereits bei niedrigeren Druckwerten ein. Darüber hinaus war auch das Ausmaß der Konstriktion erhöht. Es ist also gerechtfertigt, von einer erhöhten Sensitivität für Druckerhöhung zu sprechen. Ferner fiel auf, dass die Kurve des myogenen Tonus während MT_2 im Gegensatz zur MT_1 -Kurve einer monosigmoiden Form folgte.

Welche Faktoren auf molekularer Ebene die Linksverschiebung vermitteln, kann auf Basis der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Folgende Möglichkeiten bestehen: Entweder der Sensor transduziert sein Signal bereits früher, oder der Effektor reagiert früher und stärker. Um den Sachverhalt zu klären, müssten die Experimente unter paralleler Messung der intrazellulären Kalziumlevel wiederholt werden. Damit könnte festgestellt werden, ob die glattmuskuläre Kontraktion während MT_2 kalziumabhängig oder kalziumunabhängig erfolgt, und ob sie sich in ihren Kalziumleveln von MT_1 unterscheidet. Dies würde Rückschlüsse auf das jeweils beteiligte G-Protein erlauben. Auch selektive Inhibition wichtiger Teilkomponenten der kalziumabhängigen sowie der kalziumunabhängigen Kontraktionsschiene könnte deren Anteil an den Kurvenformen von MT_1 respektive MT_2 aufklären. Schließlich ist auch die parallele Detektion von FRET (FÖRSTER-Resonanz-Energietransfer)-Signalen durch aktiviertes RhoA denkbar, (Siehler, 2009) um in Echtzeit Informationen über eine Beteiligung des RhoA-ROK-Signalweges

an den jeweiligen Phasen des myogenen Tonus zu erhalten. Bisher fehlen Untersuchungen, die den Zeitverlauf von Elementen beider Kontraktionswege während und nach einem Druckstimulus verfolgen. Es können also nur indirekte Hinweise für Erklärungen herangezogen werden.

Auf molekularer Ebene gibt es Hinweise darauf, dass die Linksverschiebung durch einen fortwährend aktivierten Zustand von $G_{\alpha_{12/13}}$ -Proteinen vermittelt wird. Diese weisen, verglichen mit anderen $G\alpha$ -Proteinen (α_q , α_s , α_i , α_o), eine 5- bis 40-fach reduzierte Geschwindigkeit bei der GTP-Hydrolyse auf (Kozasa & Gilman, 1995; Dhanasekaran & Dermott, 1996). Dieser prolongierte aktive Zustand würde im vorliegenden Fall den kalziumunabhängigen Kontraktionsweg über MLCP-Hemmung fördern und so die Linksverschiebung der MT_2 -Kurve erklären. Wie auch das Zustandekommen der bisigmoiden MT_1 -Kurve, könnte die Linksverschiebung der MT_2 -Kurve somit biochemischen Eigenheiten der $G_{\alpha_{12/13}}$ -Proteine zugeschrieben werden.

Die glatte Muskelzelle behielte also eine erhöhte Kalziumsensitivität auch nach Druckreduktion bei, vermittelt durch eine persistierend hohe Ratio von $\frac{MLCK_{aktiv}}{MLCP_{aktiv}}$.

Dass im Gegensatz zu MT_1 die MT_2 -Kurve monosigmoid ist, weist ebenfalls darauf hin, dass während MT_2 für die Kontraktion keine sequentielle Aktivierung von G-Proteinen in Frage kommt, sondern beide Kontraktionswege - kalziumabhängig und -unabhängig - gleichzeitig über $G_{q/11}$ - und $G_{12/13}$ -Proteine initiiert werden. Dabei ist der oben diskutierte fortwährend aktive Zustand von $G_{12/13}$ -Proteinen durch die vorangegangene MT_1 -Druckleiter ein gut vorstellbarer Mechanismus, um nicht nur die Linksverschiebung, sondern auch die Transition zur monosigmoiden Form zu erklären. Wichtig ist es schließlich festzuhalten, dass zwischen MT_1 und MT_2 keine Unterschiede für die Werte des myogenen Tonus bei der letzten Druckstufe (120 mmHg) feststellbar waren (siehe auch Abbildung 17). Dies spricht dafür, dass die gegen Ende der MT_1 -Druckleiter erreichte $G_{12/13}$ -Aktivierung in unverändertem Ausmaß während der MT_2 -Druckleiter fortbestand.

Abbildung 36 zeigt die hypothetische G-Protein-Aktivierung während MT_2 nochmals schematisch.

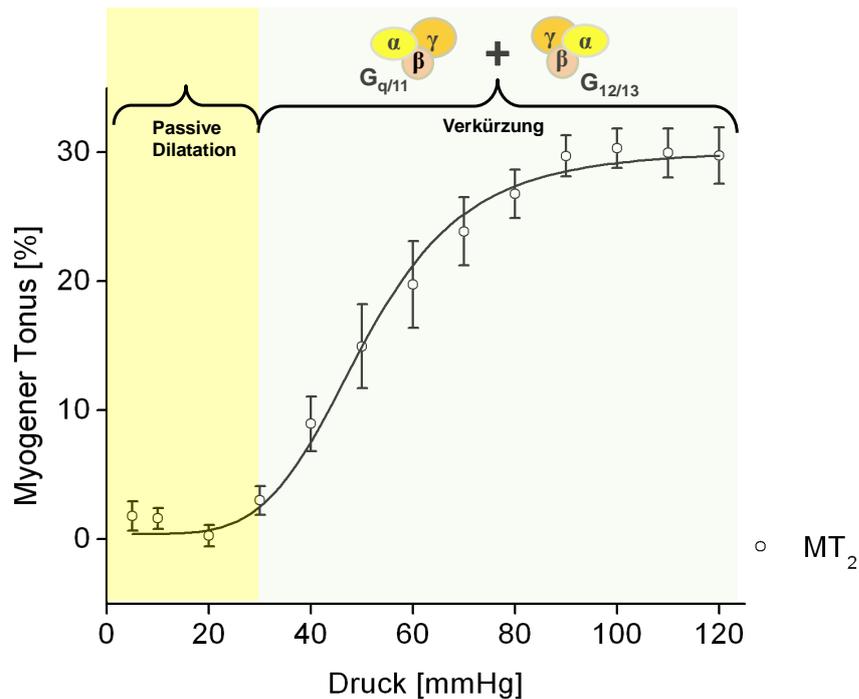


Abbildung 36: Gezeigt ist eine schematische Darstellung der G-Protein-Aktivierung während MT_2 . Auch hier lässt sich der Druckbereich zweiteilen: Von 5-30 mmHg kommt es zur passiven Dilatation (gelb hinterlegt, siehe auch Abbildung 33). Dann folgt sofort die Verkürzung des Gefäßes (grau-blau hinterlegt). Der Unterschied zu MT_1 könnte nun dahingehend interpretiert werden, dass von Beginn an beide G-Protein-Subtypen ($G_{q/11}$ - und $G_{12/13}$ -Proteine) konzentriert zusammenwirken und damit der kalziumabhängige und der kalziumunabhängige Kontraktionsweg gemeinsam aktiviert werden. Damit könnten die glatten Muskelzellen von Beginn ihrer Kontraktion an genug Kraft für eine Verkürzung des Gefäßdurchmessers aufbringen.

In Kremaster-Arteriolen wurde ca. 15 Minuten nach Applikation eines Drucksprunges eine transient erhöhte Aktivierung von Tyrosinkinasen der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Familie festgestellt (Spurrell *et al.*, 2003). Nach 60 Minuten war die MAPK-Aktivität wieder auf dem Ausgangsniveau. Eine weitere Arbeit zeigte, dass 45 Minuten nach Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren die MAPK-Proteine p42/44 MAPK über Basalniveau phosphoryliert, d.h. aktiviert bleiben. Die erhöhte Aktivität von p42/44 MAPK wiederum bewirkt über Phosphorylierung von Caldesmon eine Förderung der kalziumunabhängigen Kontraktion (Dessy *et al.*, 1998). Damit könnte auch im Zeitintervall von 35 Minuten zwischen MT_1 und MT_2 eine vermehrte Caldesmonphosphorylierung die Kontraktilität der Gefäße während MT_2 gesteigert haben.

Die demonstrierte MAPK-Aktivierung wiederum könnte durch Proteinkinase C vermittelt worden sein. Es ist bekannt, dass PKC Raf (für eine Erläuterung der Abkürzung siehe Abkürzungsverzeichnis) aktiviert, was wiederum zu MEK (*mitogen-activated protein kinase* (MAPK) and *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) kinase) -Aktivierung führt, die schließlich MAPK aktiviert (Force & Bonventre, 1998). Auch der MAPK-Signalweg könnte damit auf eine initiale $G_{q/11}$ -Protein-Aktivierung zurückgeführt werden.

Auch eine Beteiligung von Integrinen als vorgeschalteter Schritt ist denkbar, da die Bindung von Inte-

grinen an die extrazelluläre Matrix zur MAPK-Aktivierung führt. Die MAPK-Aktivierung besteht dabei wenigstens 40 Minuten fort (Morino *et al.*, 1995). Integrine sind derzeit in der Diskussion als alternative Mechanosensoren für den myogenen Tonus (siehe auch Tabelle 3, Zeile 1). Damit könnten Integrine auch als Initiatoren einer prolongierten Kontraktilität zusätzliche Bedeutung erhalten.

Die beiden Druckleitern MT_1 und MT_2 trennte ein Zeitintervall von 35 Minuten, in dem eine kontinuierliche Superfusion mit einer Geschwindigkeit von $1 \frac{ml}{min}$ stattfand, d.h. die Badlösung wurde beständig ausgetauscht. Auch während MT_2 war die Superfusion weiter aktiv, anders als während MT_1 . Sollte nun während der einzelnen Druckstufen fortlaufend ein relaxierender Faktor gebildet worden sein, so kann seine kontinuierliche Elimination während MT_2 die erhöhte Kontraktilität während MT_2 erklären. Hinweise auf einen solchen Faktor gibt es jedoch derzeit nicht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei einmaliger Registrierung des myogenen Tonus an kleinen Mesenterialarterien im kontraktilem Gleichgewichtszustand reproduzierbar ein möglicherweise durch zeitversetzte Aktivierung von $G_{q/11}$ - und $G_{12/13}$ -Proteinen bedingter bisigmoider Kurvenverlauf erzeugt werden kann. Eine weitere, nachfolgende Registrierung des myogenen Tonus im selben Gefäß resultiert ebenfalls reproduzierbar in einem monosigmoiden Kurvenverlauf. Dieser Verlauf ist wahrscheinlich durch eine verzögerte Inaktivierung von $G_{12/13}$ -Proteinen aus der ersten MT-Registrierung bedingt. Die nun gemeinsam wirkenden G-Proteine könnten nicht nur einen monosigmoiden Kurvenverlauf bedingen, sondern auch eine Linksverschiebung, d.h. eine Sensitivierung der glatten Muskelzellen auf Druckerhöhung und eine konsekutiv gesteigerte Kontraktionsantwort.

4.3 Hemmung des myogenen Tonus

4.3.1 Zur besonderen Rolle der inversen Agonisten bei der Hemmung von Mechanosensitivität

Wie Tabelle 2 zeigt, sind fast alle Substanzen, die bisher eine mechanische Aktivierung von Transmembranrezeptoren hemmen konnten, ihrer Aktivität nach inverse Agonisten: Icatibant als inverser Agonist hemmte die mechanische Aktivierung des B_2 -Bradykininrezeptors (Chachisvilis *et al.*, 2006), Candesartan als inverser Agonist die mechanische Aktivierung des AT_1 -Angiotensinrezeptors (Zou *et al.*, 2004), Atropin als inverser Agonist die mechanische Aktivierung des M_5 -Azetylcholinrezeptors (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008) und Diphenhydramin als inverser Agonist die mechanische Aktivierung des H_1 -Histaminrezeptors (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008).

Diese Befunde stellen den empirischen Unterbau für die Annahme der vorliegenden Arbeit dar, dass inverse Agonisten in besonderem Maße geeignet sind, Mechanosensitivität zu hemmen.

Für den AT_1 -Rezeptor ist im Detail gezeigt worden, wie ein inverser Agonist die Aktivierung des Rezeptors durch mechanische Dehnung verhindern kann: Candesartan hemmt die Rotation der Transmembrandomäne 7 gegen den Uhrzeigersinn und damit den Übergang des Rezeptors in eine aktive Konformation. Diese aktive Konformation durch Dehnung unterscheidet sich jedoch wesentlich von der aktiven Konformation durch Bindung des endogenen Liganden Angiotensin II (Yasuda *et al.*, 2008).

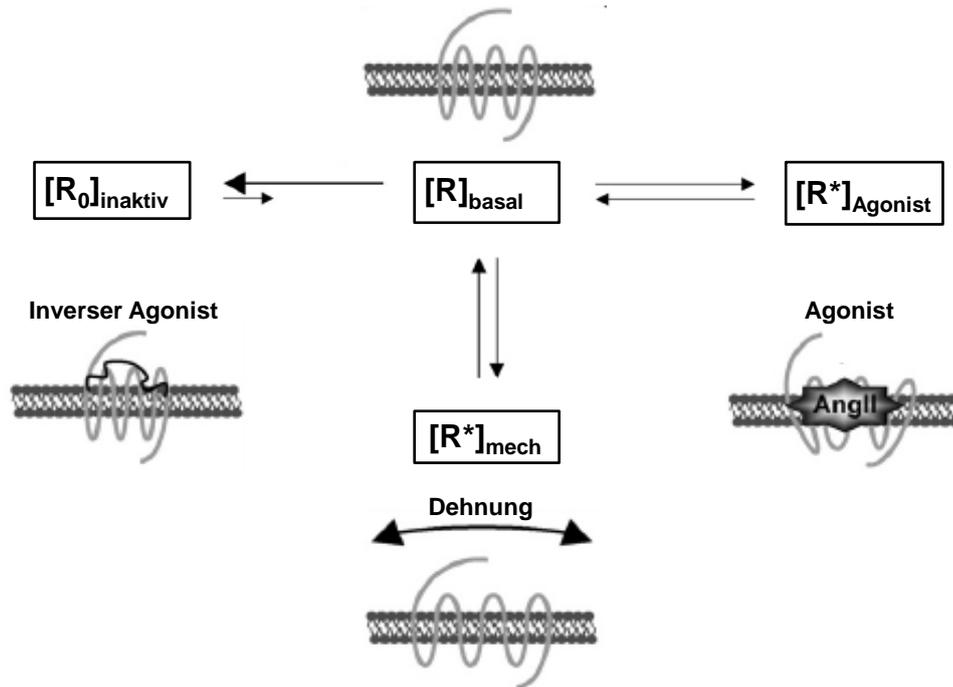


Abbildung 37: Gezeigt ist ein Modell distinkter Konformationszustände des AT₁-Angiotensinrezeptors. Der Ruhezustand des AT₁-Rezeptors ist mit $[R]_{\text{basal}}$ bezeichnet (oben im Bild). Dieser Ruhezustand weist eine geringe Aktivität auf, was sich in einer geringen G-Protein-Aktivierung äußert. Die Aktivität lässt sich verstärken durch Bindung eines chemischen Agonisten, hier Angiotensin II (AngII). Damit wird der Rezeptor im aktiven Zustand $[R^*]_{\text{Agonist}}$ stabilisiert (rechts im Bild). Mechanische Dehnung aktiviert den Rezeptor ebenfalls stärker, allerdings nimmt dieser dadurch eine andere aktive Konformation an ($[R^*]_{\text{mech}}$, unten im Bild). Die Bindung eines inversen Agonisten stabilisiert den Rezeptor schließlich in einem inaktiven Zustand ($[R_0]_{\text{inaktiv}}$, links im Bild) ohne G-Protein-Aktivierung. Dieser Zustand ist sehr stabil, verdeutlicht durch den langen Pfeil der Hinreaktion und den kurzen Pfeil der Rückreaktion. Auch die mechanische Aktivierbarkeit wird damit durch Bindung eines inversen Agonisten verhindert. Abbildung leicht verändert aus Akazawa *et al.*, 2009.

Die Stabilisierung des Rezeptors in einem distinkten Zustand durch den inversen Agonisten (Vilardaga *et al.*, 2005) ist ein wesentlicher Faktor für den funktionellen Zugewinn von inversen Agonisten gegenüber neutralen Antagonisten (Akazawa *et al.*, 2009, 2012). Für den AT₁-Rezeptor beispielsweise existiert ein Modell von vier verschiedenen Konformationszuständen. In Abbildung 37 wird dieses Modell dargestellt. Dabei werden auch die thermodynamischen Eigenheiten des inversen Agonismus symbolisiert: Durch inverse Agonisten wird der Rezeptor in einem inaktiven Zustand stabilisiert (siehe Abbildung 37 links, Reaktion von $[R]$ zu $[R_0]$, verdeutlicht durch den langen Pfeil der Hinreaktion und den kurzen Pfeil der Rückreaktion). Grundlage der Stabilisierung ist vermutlich eine multivalente Bindung zwischen dem inversen Agonisten und seinem Rezeptor (Qin *et al.*, 2009). Damit wird auch der chemisch oder mechanisch induzierte Übergang in eine aktive Konformation erschwert. Zudem muss für den Fall des AT₁-Rezeptors eine Neutralkonformation durchlaufen werden, wenn von der inaktiven Konformation ausgehend eine aktive erreicht werden soll. Damit müssten zwei sukzessive energetische Übergangshürden überwunden werden, was eine Aktivierung des Rezeptors in Gegenwart eines inversen Agonisten unwahrscheinlicher macht.

Ein neutraler Antagonist hingegen verändert nicht das Verhältnis zwischen inaktiver und aktiver Re-

zeptorkonformation. Seine Bindung führt zu keiner Veränderung des zellulären Milieus, da er keine intrinsische Aktivität besitzt; er verhindert lediglich die Bindung anderer Liganden am Rezeptor (Seifert & Wenzel-Seifert, 2002; Neubig *et al.*, 2003). Anders als ein inverser Agonist sollte ein neutraler Antagonist damit auch nicht den mechanisch induzierten Übergang in eine aktive Konformation erschweren, da er keinen Einfluss auf die Rezeptorkonformation ausübt (Akazawa *et al.*, 2009, 2012).

Viele frühere Antagonisten wurden erst in jüngerer Zeit als inverse Agonisten identifiziert (Rossier *et al.*, 1999; Monczor *et al.*, 2003; Fitzsimons *et al.*, 2004; Vilardaga *et al.*, 2005). Dies lag häufig daran, dass die jeweils untersuchten Rezeptoren mit einer niedrigen oder ohne Basalaktivität vorlagen. Somit mussten erst konstitutiv aktive Rezeptormutanten geschaffen werden, die in einem zweiten Schritt auf die Hemmbarkeit ihrer Basalaktivität durch die bisherigen Antagonisten untersucht wurden (Rossier *et al.*, 1999). Auch die künstliche Erhöhung der für die jeweilige Rezeptoraktivierung charakteristischen intrazellulären Signalmolekülkonzentration (beispielsweise cAMP durch Forskolin-Stimulation) und deren folgende Reduktion auf Applikation eines inversen Agonisten stellt eine Strategie dar (Monczor *et al.*, 2003). Schließlich kann auch die Herbeiführung distinkter Rezeptorkonformationen durch die getestete Substanz und die damit einhergehende Änderung eines intramolekularen FRET-Signals auf inverse Agonisten hindeuten (Vilardaga *et al.*, 2005).

4.3.2 Losartan

Da in Mesenterialarterien sowohl AT_{1A}- wie auch AT_{1B}-Rezeptor-RNA detektiert worden war, wurden diese Rezeptoren zunächst an isolierten Mesenterialarterien mit Losartan gehemmt.

Die Applikation von Losartan konnte den myogenen Tonus von Mesenterialarterien nicht signifikant hemmen. Die Datenpunkte von Kontrollgruppe und Losartangruppe ließen sich an eine monosigmoide Funktion anpassen. Dabei unterschied sich der Parameter k , der in den beiden Kurvenfunktionen für den Druckpunkt steht, an dem ein halbmaximaler Tonuseffekt erzielt wurde, nicht signifikant zwischen Kontroll- und Losartangruppe ($p=0,09$).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Losartankonzentration betrug 10 μM . Effekte von Angiotensin II an isolierten Mesenterialarterien dritter Ordnung wurden durch 10 μM Losartan nahezu komplett unterdrückt, sowohl bei Ratten- als auch bei Mausgefäßen (Touyz *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2005b). Diese Befunde sprechen für hinreichende Losartankonzentrationen in der vorliegenden Arbeit.

Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen nicht zu, einen signifikanten Hemmeffekt von Losartan auf die Ausbildung eines myogenen Tonus festzustellen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Mederos y Schnitzler und Kollegen, die eine Hemmung des myogenen Tonus durch Losartan an der isoliert perfundierten Niere und an isolierten Gehirnarterien feststellten. Auch auf Einzelzellebene konnten depolarisierende, durch Membrandehnung über hypotone Lösungen induzierte TRPC6-Ionenströme in Gegenwart von Losartan gehemmt werden. Ein möglicher Einfluss von parakrin freigesetztem Angiotensin II wurde durch Inkubation mit Captopril ausgeschlossen (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Möglicherweise ist dieser Unterschied auf eine zu geringe Anzahl an untersuchten Gefäßen in der vorliegenden Arbeit zurückzuführen, da sich die Unterschiede der Regressionsgleichungen von Kontroll- und Losartangruppe im Parameter k nahe an der Signifikanzgrenze befanden ($p=0,09$).

4.3.3 Pharmakologische Inhibition des myogenen Tonus

Der AT₁-Rezeptor liegt mit einer geringen konstitutiven Aktivität vor (Parnot *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2004). Diese basale Aktivität kann durch inverse Agonisten reduziert werden. Ob Losartan als inverser Agonist fungiert, wird gegenteilig bewertet (Parnot *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003). Dies liegt wahrscheinlich an den unterschiedlichen konstitutiv aktiven Rezeptormutanten, die in den jeweiligen Arbeiten untersucht wurden. Darüberhinaus werden am AT₁-Rezeptor Substanzen, die den Maximaleffekt nicht beeinflussen (*surmountable*) von solchen unterschieden, die eine Reduktion des Maximaleffekts bewirken (*insurmountable*). Losartan zählt zur ersten Gruppe, Candesartan zur zweiten Gruppe (de Gasparo *et al.*, 2000).

Olmesartan hemmt anders als Losartan die dehnungsinduzierte ERK-Aktivierung von renalen Mesangialzellen (Yatabe *et al.*, 2009). Die negative logarithmische halbmaximale inhibitorische Konzentration (pIC₅₀, ausgehend von einer Konzentration in $\frac{\text{mol}}{\text{l}}$) von Olmesartan an AT₁-Rezeptoren beträgt 8,1 (Mizuno *et al.*, 1995), die von Losartan 7,7 (Timmermans *et al.*, 1993). Über den fehlenden Effekt von Losartan gegenüber Olmesartan wird vermutet, er sei entweder durch die geringere Affinität von Losartan zum Rezeptor oder durch eine geringere Aktivität als inverser Agonist bedingt (Yatabe *et al.*, 2009). Es wurde deshalb beschlossen, mit Candesartan einen definitiven inversen Agonisten (Zou *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2008; Akazawa *et al.*, 2009) mit höherer Affinität an AT₁-Rezeptoren zu verwenden (pIC₅₀ = 9,2) (Vanderheyden *et al.*, 1999). Dies sollte verhindern, dass eine Hemmung mechanosensitiver Eigenschaften nicht durch eine zu geringe Rezeptoraffinität des Hemmstoffes oder eine zu geringe Aktivität als inverser Agonist verdeckt würden.

Da in Mesenterialarterien sowohl AT_{1A}⁻, AT_{1B}⁻, V_{1A}⁻, ET_A⁻, α_{1A}⁻ und α_{1D}-Rezeptor-RNA detektiert worden war, wurden diese Rezeptoren an isolierten Mesenterialarterien mit Candesartan, Relcovaptan, BQ-123 und Prazosin kombiniert gehemmt.

Angiotensin-II-induzierte Konstriktionen ließen sich in Kaninchenaorta bereits mit 1 nM Candesartan maximal hemmen (Morsing *et al.*, 1999). Auch die Aktivierung von MAPK in Mauseorta über Angiotensin-II-Applikation konnte durch 100 nM Candesartan gehemmt werden (Tharaux *et al.*, 2000). 100 nM waren schließlich auch ausreichend, um einen pathologisch erhöhten myogenen Tonus in isolierten Mesenterialarterien zu hemmen (Gschwend *et al.*, 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde 1 μM Candesartan eingesetzt, diese Konzentration darf also als supramaximale Hemmkonzentration bezeichnet werden.

Für Relcovaptan wurde an Wildtyp-V_{1A}-Rezeptoren bisher keine Aktivität als inverser Agonist beobachtet. Auch fehlen bis dato konstitutiv aktive Rezeptormutanten, an denen das Vorhandensein einer etwaigen Funktion als inverser Agonist getestet werden könnte (Hawtin, 2006).

An isolierten Mesenterialarterien bewirkten 10 nM Relcovaptan eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Arginin-Vasopressin. Dabei kam es zu einer Vesechzehnfachung der halbmaximalen Effektivkonzentration von Arginin-Vasopressin. Der Maximaleffekt blieb dabei im Sinne eines kompetitiven Antagonisten erhalten (Streefkerk *et al.*, 2003b). In der vorliegenden Arbeit wurden 20 nM Relcovaptan eingesetzt, was somit als hinreichende Konzentration betrachtet werden kann.

Für BQ-123 gilt gleichermaßen, dass es bisher nur als Antagonist beschrieben wurde (Ihara *et al.*, 1992).

Konstitutiv aktive ET_A-Rezeptormutanten wurden bisher nicht auf Hemmbarkeit ihrer Basalaktivität durch BQ-123 getestet.

An isolierten Mesenterialarterien konnten die Effekte höherer Endothelin-1-Konzentrationen (ab 1 nM) signifikant durch 1 µM BQ-123 gehemmt werden. Es resultierte eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Endothelin-1 bei erhaltenem Maximaleffekt im Sinne eines kompetitiven Antagonisten (Mickley *et al.*, 1997). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte BQ-123-Konzentration von 1 µM lag somit in einem hinreichenden Bereich.

Prazosin stellt einen inversen Agonisten an α_1 -Adrenozeptoren dar. Der α_{1A} - und der α_{1B} -Adrenozeptor weisen wenig bzw. geringe konstitutive Aktivität auf, anders als der α_{1D} -Adrenozeptor, der eine moderate Basalaktivität zeigt (Rossier *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2002). An isolierten Mesenterialarterien zeigte sich in Gegenwart steigender Prazosinkonzentrationen eine zunehmende Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve des selektiven α_1 -Agonisten Phenylephrin. Der konstriktorische Effekt von Phenylephrin war mit 300 nM Prazosin signifikant hemmbar (Van der Graaf *et al.*, 1996). In einer anderen Arbeit wurde die pIC₅₀ von Prazosin an kleinen isolierten Mesenterialarterien mit 8,3 bestimmt (Gisbert *et al.*, 2002). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Prazosinkonzentration von 1 µM kann somit als hinreichend bezeichnet werden.

Die kombinierte Hemmung (RCBP) konnte den myogenen Tonus in seinem Maximaleffekt signifikant reduzieren. Der minimale Tonus am Beginn der sigmoiden Kurve hingegen war signifikant höher unter RCBP als in der Kontrollgruppe. Die Steigung und der Druckpunkt für halbmaximalen Effekt unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe. Damit kann festgehalten werden, dass RCBP den myogenen Tonus bei hohen Drücken hemmt, dabei keine Rechtsverschiebung induziert, also die Mechanosensitivität nicht beeinträchtigt. Dass der minimale Tonus am Kurvenanfang unter RCBP höher lag, kann nicht durch eine prinzipiell höhere Kontraktilität der RCBP-Gefäße erklärt werden, da sich deren Konstriktionsausmaß auf 60 mM KCl nicht von dem der Kontrollgruppe unterschied.

Der RCBP-Effekt lässt keine Rückschlüsse auf die relative Wirkung der Einzelsubstanzen zu. Deshalb wurde zunächst die isolierte Wirkung von Prazosin auf den myogenen Tonus analysiert. Hier zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls eine Reduktion des Maximaleffekts. Der Effekt unterschied sich dabei nicht von der RCBP-Gruppe, so dass zunächst vermutet wurde, Prazosin sei die einzig effektive Substanz im RCBP-Experiment gewesen.

Als dann aber das RCB-Gemisch getestet wurde, fiel wiederum auf, dass der myogene Tonus in gleichem Maß gehemmt wurde, wie unter den vorherigen Pharmaka. Der maximale myogene Tonus unterschied sich weder von der RCBP-Gruppe, noch von der Prazosin-Gruppe.

Die Kontraktilitäten der jeweiligen Gefäße auf 60 mM KCl wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Dies spricht gegen eine systematische Verfälschung z.B. durch Schädigung der Gefäße im Zuge der Präparation und Kanülierung.

Aufbauend auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Einzelsubstanzen BQ-123, Relcovaptan und Candesartan auf den myogenen Tonus in unserer Arbeitsgruppe durch Stephanie Blodow untersucht. Die jeweiligen Ergebnisse werden in den folgenden Unterkapiteln erwähnt.

4.3.3.1 Hemmung von α_1 -Adrenozeptoren durch Prazosin Für Prazosin kann konstatiert werden, dass die Substanz den myogenen Tonus hemmt. Interessanterweise stellt Prazosin einen inversen Agonisten dar. Zusätzlich handelt es sich mit den α_1 -Adrenozeptoren um die pharmakologisch untersuchte Rezeptorfraction, die mit den ET_A-Rezeptoren in Mesenterialarterien die höchsten RNA-Level vorwies. Dies deutet wiederum auf eine hohe, für die Gesamtmechanosensitivität entscheidende Anzahl von Rezeptorproteinen auf der Zelloberfläche.

Der myogene Tonus in Skelettmuskelarteriolen spontan hypertensiver Ratten (SHR) wurde nicht durch unspezifischen α -Adrenozeptor-Antagonismus mittels Phentolamin beeinflusst (Falcone *et al.*, 1993). Ob Phentolamin einen inversen Agonisten an α_1 -Adrenozeptoren darstellt (Lee *et al.*, 1997) oder nicht (Villardaga *et al.*, 2005) ist strittig. Falls Phentolamin eine derartige Eigenschaft aufweist, ist wahrscheinlich, dass die komplexe Pathophysiologie der spontan hypertensiven Gefäße für den Unterschied zur vorliegenden Arbeit verantwortlich ist. Der myogene Tonus ist in SHR stärker als in normotensiven Ratten. Unter anderem verlaufen die vaskulären intrazellulären Kalziumlevel auf Druckerhöhung nach einer anderen Kinetik als in normotensiven Ratten. Auch liegt in Gefäßen aus hypertensiven Tieren ein stärkeres Gewicht auf dem RhoA-Rho-Kinase-Kontraktionsweg als im normotensiven Zustand (Jarajapu & Knot, 2005). Diese Unterschiede in der Kontraktionsregulation der vaskulären glatten Muskelzellen könnten für die beobachtete Unempfindlichkeit für inverse Agonisten an α_1 -Adrenozeptoren in Gefäßen aus spontan hypertensiven Ratten verantwortlich sein. Beispielsweise könnte ein chronisch aktiver G $\alpha_{12/13}$ -Signalweg akute Veränderungen durch inversen Agonismus kaschiert haben.

Falls Phentolamin jedoch keinen inversen Agonisten darstellt, so könnte der Unterschied zur vorliegenden Arbeit darin liegen, dass Prazosin anders als Phentolamin α_1 -Adrenozeptoren in einen inaktiven Zustand überführen kann.

Davon unabhängig beweist die Arbeit von Falcone und Mitarbeitern, dass während der Ausbildung eines myogenen Tonus in spontan hypertensiven Ratten keine chemische autokrine Aktivierung (d.h. lokale Bildung und Freisetzung von Noradrenalin) von α -Adrenozeptoren erfolgt.

In isolierten Mesenterialarterien aus Schweinen konnten Nankervis und Kollegen keinen Einfluss von 1 μ M Prazosin auf die Ausbildung eines myogenen Tonus feststellen. Allerdings registrierten sie auch nur einen schwachen myogenen Tonus in Arterien aus Individuen, die einen Tag alt waren. 40-tägige Schweine lieferten nur Mesenterialarterien, die keinen myogenen Tonus ausbildeten. In keiner Altersgruppe konnte Prazosin den myogenen Tonus reduzieren (Nankervis *et al.*, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Mesenterialarterien stammten aus 12 Wochen alten Mäusen und bildeten zuverlässig einen robusten myogenen Tonus aus. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Nankervis und Kollegen konnte Prazosin den myogenen Tonus reduzieren. Der entscheidende Unterschied liegt wahrscheinlich im relativ druckpassiven Verhalten der porcinen Mesenterialarterien. Diese weisen offenbar eine viel geringere Mechanosensitivität auf, als die murinen Mesenterialarterien, so dass auch die Hemmung eines putativen Mechanosensors viel geringer ins Gewicht fallen dürfte.

Für α_1 -Adrenozeptoren fehlen bisher noch Daten zu Mechanosensitivität auf Einzelzellebene. Auch Studien über die Konformationsänderung der Rezeptormoleküle durch mechanischen Stress existieren nicht. Die relative Rolle der einzelnen α_1 -Adrenozeptorsubtypen für den myogenen Tonus muss schließlich ebenfalls geklärt werden. Hierfür bieten sich konditionale gewebe selektive Gendefizienzmodelle (sog.

knockout-Tiere) an.

4.3.3.2 Erhöhung der Ruhekontraktilität durch die RCB-Kombination Die Ruhekontraktilität unter RCBP- sowie unter RCB-Applikation, nicht aber unter Prazosin war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die untersuchten Gefäße selbst waren strukturell und funktionell gleichwertig, was sich in gleichen Konstriktionsausmaßen auf 60mM KCl äußerte. Möglicherweise hängt dieser Befund mit der Substanz Candesartan zusammen: Vraamark und Mitarbeiter beobachteten eine Linksverschiebung der Autoregulationskurve von Zerebralarterien durch Candesartan (Vraamark *et al.*, 1995). Die Arterien kontrahierten sich also bei niedrigeren Druckwerten, dilatierten aber auch schon bei niedrigeren Druckwerten wieder.

Auch die Ergebnisse von Stephanie Blodow aus unserer Arbeitsgruppe sprechen dafür: Candesartan als Monosubstanz erhöhte den Ruhetonus. Schließlich zeigten auch Mesenterialarterien aus AT_{1A} - AT_{1B} -doppelt gendefizienten Mäusen eine Linksverschiebung der MT_2 -Kurve bei reduziertem Maximaltonus. Eine unspezifische hemmende Wirkung von Candesartan auf die Kontraktion der glatten Muskelzellen ist also unwahrscheinlich. Damit scheint eine fehlende Mechanosensitivität von AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptoren (genetisch oder pharmakologisch bedingt) zum einen einen höheren Ruhetonus der Gefäße und zum anderen eine geringere Konstriktion auf steigende intravasale Drücke zu bewirken.

Auch BQ-123 als Monosubstanz führte in den Experimenten von Stephanie Blodow zu einem gesteigerten Ruhetonus. Relcovaptan zeigte keine derartige Wirkung.

Somit kann die erhöhte Ruhekontraktilität in den RCBP- und RCB-Ansätzen Candesartan und BQ-123 zugeschrieben werden. Der Effekt ist durch Kombination der Substanzen nicht-additiv. Die diesem Phänomen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen könnten sich möglicherweise über eine Analyse der nachgeschalteten Signalkaskade erhellen lassen.

4.3.3.3 Hemmung von AT_1 -Angiotensin-II-Rezeptoren durch Candesartan Ob nun Candesartan tatsächlich selbst einen hemmenden Effekt auf den myogenen Tonus ausübt, kann durch die vorliegenden Ergebnisse weder bestätigt noch widerlegt werden, da Candesartan stets nur in Kombination mit anderen Substanzen analysiert wurde. Aus diesem Grund führte Stephanie Blodow die vorliegende Arbeit fort. Die Applikation von Candesartan als Einzelsubstanz führte zu komplexen Effekten:

Candesartan verhinderte die Transition von bisigmoider MT_1 -Kurve zu monosigmoider MT_2 -Kurve. Damit einher ging eine prominente Suppression des myogenen Tonus. Da die MT_2 -Kurve unter RCBP und RCB eine monosigmoide Verlaufsform zeigte, kann gefolgert werden, dass die Wirkung der Einzelsubstanz Candesartan durch die Kombination mit anderen Substanzen kaschiert werden kann. Dessen ungeachtet zeigen die Ergebnisse von Stephanie Blodow, dass Candesartan als inverser Agonist an AT_1 -Rezeptoren den myogenen Tonus hemmen kann. Dies unterstützt die Annahme, dass AT_1 -Rezeptoren eine mechanosensorische Rolle für das Zustandekommen des myogenen Tonus spielen.

Erste Beobachtungen, dass Candesartan die zelluläre Signaltransduktion durch mechanischen Stress inhibiert existieren schon seit 1994. Dabei waren vor allem die Signalwege im Fokus, die mit kardialer Hypertrophie assoziiert sind und weniger mit Kontraktilität (Kojima *et al.*, 1994).

Für Candesartan ist bekannt, dass es eine inaktive Konformation des AT₁-Rezeptors stabilisiert und damit als inverser Agonist fungiert. Ferner hemmt Candesartan die mechanische Aktivierung des AT₁-Rezeptors auf zellulärer Ebene und auf Organebene. Die zellulären Effekte von Candesartan umfassten die Hemmung der G_{α11}-Translokation und der gesteigerte IP₃-Produktion, die sonst durch Dehnung von AT₁-exprimierenden Zellen erfolgt. Auch die Aktivierung von Proteinkinasen, die dem mechanisch aktivierten AT₁-Rezeptor nachgeschaltet sind, wurde durch Candesartan verhindert. Die Organeffekte umfassten eine signifikante Verminderung einer nachlastbedingten kardialen Hypertrophie. Eine Verzerrung der Beobachtungen durch lokal gebildetes Angiotensin II wurde ausgeschlossen (Zou *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2008; Akazawa *et al.*, 2009). Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hemmeffekt könnte nach diesen Befunden auf die alleinige Wirkung von Candesartan oder seine Wirkung in Kombination mit den anderen Substanzen zurückgeführt werden.

In spontan hypertensiven Ratten konnte eine stärkere Autoregulation beobachtet werden, d.h. dass bei gleichem arteriellem Druck ein geringerer zerebraler Blutfluss als in normotensiven Ratten vorlag. Chronische Candesartanzufuhr veränderte die Autoregulation im Sinne eines zunehmend druckpassiven Verhaltens in normotensiven und hypertensiven Ratten. Nach chronischer Candesartanzufuhr konnte in den Gehirnarterien eine Reduktion der Autoregulation beobachtet werden. Dabei war unter Candesartan bei gleichem arteriellem Druck ein stärkerer zerebraler Blutfluss zu beobachten. (Nishimura *et al.*, 1998). Dies entspricht einem reduzierten Strömungswiderstand, damit also einem reduzierten myogenen Tonus. Diese Ergebnisse können also im Sinne einer hemmenden Wirkung von Candesartan auf den myogenen Tonus interpretiert werden. Eingeschränkt wird die Vergleichbarkeit dieser Arbeit mit der vorliegenden durch die Verwendung hypertensiver Ratten.

Auch die Arbeitsgruppe um Vraamark konnte eine Linksverschiebung der zerebralen Autoregulationskurve durch Candesartan feststellen. Dabei setzte bereits bei niedrigeren Druckwerten (48 mmHg) eine Konstriktion ein als in der Kontrollgruppe (60 mmHg). Der zerebrale Blutfluss wurde in den folgenden Druckbereichen konstant gehalten, stieg aber dann wieder früher an (126 mmHg) als ohne Candesartanzufuhr (144 mmHg) (Vraamark *et al.*, 1995). Dies entspricht einer früher einsetzenden passiven Dilatation durch steigenden Druck. Der myogene Tonus wird demnach sowohl durch akute wie durch chronische Candesartanzufuhr gehemmt. Eine ähnliche Linksverschiebung in SHR konnte auch durch *Angiotensin-Converting-Enzyme*-Inhibitoren (ACE-I) induziert werden (Sadoshima *et al.*, 1994). Die Experimente zur zerebralen Autoregulation wurden alle *in vivo* durchgeführt. Die Bildung von systemischem Angiotensin II konnte dabei nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Arbeiten zu Candesartan könnten somit durch die Hemmung der Angiotensin-II-Bindung am AT₁-Rezeptor erklärt werden. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit ist, dass Candesartan über inversen Agonismus an AT₁-Rezeptoren deren Mechanotransduktion hemmt, was wiederum die Autoregulation der Gefäße beeinträchtigt.

In Mesenterialarterien aus Ratten mit ischämischer Kardiomyopathie (KMP) beobachteten Geschwend und Mitarbeiter einen gesteigerten myogenen Tonus (Geschwend *et al.*, 2003). Der myogene Tonus ließ sich nur in der KMP-Gruppe, nicht aber in der Kontrollgruppe durch Candesartan hemmen. Dass nur im KMP-Modell der AT₁-Rezeptor eine Rolle im myogenen Tonus spielen soll, stellt einen Widerspruch zur vorliegenden Arbeit dar. Andererseits wurde von Geschwend und Mitarbeitern ausgeschlossen, dass die Rolle des AT₁-Rezeptors im KMP-Modell durch gesteigerte Angiotensin II-Level bedingt war. Da

zudem die Konstriktionsantwort auf Angiotensin II in der KMP-Gruppe erhöht war, schlossen die Autoren auf höhere AT₁-Rezeptorlevel. Höhere Rezeptorlevel wiederum könnten durch mechanische Aktivierung einen erhöhten myogenen Tonus vermitteln. Autokrine Stimulation durch druckabhängig freigesetzte Liganden über den ACE-Weg konnte ausgeschlossen werden. Die Gefäße der Kontrollgruppe zeigten einen niedrigen myogenen Tonus (ca. 20% bei 120 mmHg), der deutlich niedriger ausfiel als in der vorliegenden Arbeit (ca. 30% bei 120 mmHg). Möglicherweise ist die Vergleichbarkeit beider Experimente durch eine geringere intrinsische Myogenität - z.B. durch niedrigere AT₁-Rezeptorlevel als in der Maus - in Mesenterialarterien der Ratte erschwert. Zusammenfassend können die Ergebnisse von Gschwend *et al.* als Hinweis auf eine ligandenunabhängige Aktivierung erhöhter AT₁-Rezeptorlevel im KMP-Modell aufgefasst werden. Candesartan scheint diese Aktivierung zu hemmen.

Die mechanosensitive Rolle der AT₁-Rezeptoren scheint auf diversen Ebenen gesichert. Auch die Rolle als Mechanosensor für den myogenen Tonus tritt immer klarer hervor. Das relative Gewicht der Subtypen AT_{1A} und AT_{1B} für die Ausbildung eines myogenen Tonus ist jedoch noch völlig unklar. Konditionale, gewebe selektive Knockout-Modelle könnten für die Beantwortung dieser Fragestellung einen vielversprechenden Ansatz darstellen.

4.3.3.4 Hemmung des ET_A-Endothelinrezeptors durch BQ-123 Aufbauend auf den hier vorgestellten Ergebnissen untersuchte Stephanie Blodow für unsere Arbeitsgruppe die Effekte von BQ-123 als Monosubstanz auf den myogenen Tonus. Es zeigte sich, dass BQ-123 eine Rechtsverschiebung der MT₂-Kurve bewirkt. Das Konstriktionsmaximum blieb unbeeinträchtigt. Ferner war auch unter BQ-123 die initiale Kontraktilität erhöht. Damit konnte demonstriert werden, dass der ET_A-Rezeptor als Mechanosensor für den myogenen Tonus fungiert. Er kann wohl aber nicht durch einen BQ-123 in einem inaktiven Zustand stabilisiert werden, da das Tonusmaximum der Kontrollkurve trotzdem noch erreicht werden kann - allerdings erst zu einem späteren Druckpunkt.

Die bereits zitierte Arbeit von Gschwend und Mitarbeitern beschreibt ebenfalls die Auswirkung von 1 µM BQ-123 auf den myogenen Tonus von Mesenterialarterien (Gschwend *et al.*, 2003). Dabei wurde weder in der Kontroll- noch in der KMP-Gruppe ein Effekt festgestellt. Diese Ergebnisse sprechen nicht für eine Rolle von ET_A-Rezeptoren für den myogenen Tonus. Dabei schließt der mangelnde Effekt von BQ-123 zumindest eine autokrine Stimulation von ET_A-Rezeptoren durch druckabhängig freigesetzte Liganden im untersuchten Modell aus.

Eine schrittweise Erhöhung des intravasalen Druckes in Mesenterialarterien der Ratte unter akuter ET_A-Blockade durch Darusentan hatte keinen Einfluss auf den myogenen Tonus (Iglarz *et al.*, 1998). Allerdings ist derzeit noch unbekannt, ob es sich bei Darusentan um einen neutralen Antagonisten oder einen inversen Agonisten handelt. Möglicherweise können nur inverse Agonisten mechano inhibitorische Effekte ausüben.

Im Gegensatz dazu konnten Nguyen und Mitarbeiter zeigen, dass sowohl Bosentan als unselektiver ET-Rezeptorantagonist als auch BQ-123 als selektiver ET_A-Antagonist den myogenen Tonus hemmen (Nguyen *et al.*, 1999). Dabei führen die Autoren die Stimulation des ET_A-Rezeptors und das Zustandekommen des myogenen Tonus zurück auf eine druckabhängig erfolgende lokale Freisetzung von ET-1 durch das Endothel. Dieser Schluss wurde gezogen, da nach Endothelentfernung eine Reduktion des

myogenen Tonus auf ähnliche Ausmaße wie unter BQ-123 und Bosentan erfolgte. Auffallend ist hierbei jedoch eine starke Reduktion des myogenen Tonus nach Endothelentfernung. Andere Arbeiten zeigen durchgängig einen hierdurch verstärkten oder unveränderten myogenen Tonus (Gschwend *et al.*, 2003; Anschütz & Schubert, 2005). Die Integrität der Gefäße nach Endothelentfernung könnte durch die Entfernungspozedur beeinträchtigt worden sein. Damit könnten die identischen Level des myogenen Tonus im deendothelialisierten Gefäß mit und ohne Bosentan als unspezifische Effekte durch Schädigung erklärt werden. Davon unberührt bleibt jedoch die Beobachtung, dass ET_A-Antagonisten den myogenen Tonus reduzieren können.

Zou und Mitarbeiter konnten auf Einzelzellebene keine Mechanosensitivität für den ET_A-Rezeptor feststellen. Der als Maß für die Rezeptoraktivierung registrierte Effekt bestand in einer ERK-Aktivierung (Zou *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse wiederum stehen denen von Mederos y Schnitzler und Kollegen entgegen. Auf Einzelzellebene konnten Mederos y Schnitzler und Kollegen durch osmotische Dehnung ET_A-exprimierender Zellen eine Aktivierung rezeptorgesteuerter TRPC-Kanäle hervorrufen. Die Kanalaktivierung ließ sich durch einen selektiven ET_A-Antagonisten hemmen (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008). Da die Aktivierung von TRPC-Kanälen *in vivo* in einer Depolarisation resultiert, konnte damit ein zur Depolarisation führendes mechanosensitives Ereignis selektiv dem ET_A-Rezeptor zugeordnet werden.

In größeren Beinarterien (ca. 300 µm Durchmesser) der Maus konnten Sonveaux und Mitarbeiter keinen myogenen Tonus registrieren (Sonveaux *et al.*, 2004). Nach Implantation eines Tumors nahmen die Gefäße myogene Eigenschaften an. Der neu auftretende myogene Tonus ließ sich vollständig durch BQ-123 unterdrücken. Die Tumorgefäße wiesen höhere ET_A-Proteinlevel, höhere Sensitivität auf ET-1-Stimulation und eine stärkere ET-1-Expression auf. Die Autoren führen den BQ-123-sensiblen myogenen Tonus auf Stimulation der ET_A-Rezeptoren durch ET-1 zurück. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit wäre schließlich die mechanische, ligandenunabhängige Aktivierung der ET_A-Rezeptoren. Interessanterweise waren die Tumoren, deren myogener Tonus durch BQ-123 gehemmt wurde, strahlensensibler. Möglicherweise war der Tumor durch die reduzierte Autoregulation anfälliger für Strahlenschäden. Damit ergeben sich faszinierende neue Anwendungsmethoden für die pharmakologische Inhibition der Mechanosensitivität des ET_A-Rezeptors.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der ET_A-Rezeptor eine Rolle als Mechanosensor für den myogenen Tonus zu spielen scheint. In unserer Arbeitsgruppe konnte die Substanz BQ-123 jedoch nur eine Rechtsverschiebung des myogenen Tonus induzieren. Wenn man den steigenden intravasalen Druck in Analogie zu einer steigenden Agonistenkonzentration betrachtet, entspräche BQ-123 damit einem kompetitiven Antagonisten (*surmountable* Antagonist) gegen die Aktivierung durch Druck. Vielleicht kann die genauere Untersuchung der Substanz auf ihre Bindungsstellen am Rezeptor und auf eine möglicherweise bisher unentdeckte Funktion als inverser Agonist helfen, die molekularen Grundlagen dieser funktionellen Besonderheit zu enthüllen. Auf den Erkenntnissen zum AT₁-Rezeptor aufbauend ist vorstellbar, dass die Bindungsstellen von BQ-123 am Rezeptor quantitativ zu gering sind, um die Mechanosensitivität nicht-kompetitiv zu inhibieren (Qin *et al.*, 2009).

4.3.3.5 Hemmung des V_{1A} -Vasopressinrezeptors durch Relcovaptan Der einzige Hinweis auf eine mögliche Mechanosensitivität des V_{1A} -Rezeptors stammt aus der Arbeitsgruppe um Mederos y Schnitzler. V_{1A} -exprimierende Zellen zeigten auf osmotische Dehnung eine Aktivierung von TRPC6-Ionenkanälen. Die Kanalaktivierung erfolgte nicht, wenn der TRPC6-Kanal isoliert exprimiert wurde. Da dieser Kanalstrom auch mit dem myogenen Tonus assoziiert wird (Welsh *et al.*, 2002; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008), lag es nahe, auch für den V_{1A} -Vasopressinrezeptor eine Rolle als Mechanosensor im Kontext des myogenen Tonus zu fordern.

Für unsere Arbeitsgruppe untersuchte Stephanie Blodow, an die Arbeit von Mederos y Schnitzler und Kollegen und an die vorliegende Arbeit anknüpfend, die Effekte von Relcovaptan auf den myogenen Tonus. Relcovaptan beeinflusste keinen Parameter der Regressionskurve signifikant. Damit scheint der V_{1A} -Rezeptor als Mechanosensor für den myogenen Tonus keine relevante Rolle zu spielen. Möglicherweise ist er aber an anderen mechanosensitiven Prozessen beteiligt. Hierfür stellt der Rezeptor jedenfalls ein interessantes zukünftiges Untersuchungsobjekt dar.

Bisher sind keine inversen Agonisten für den V_{1A} -Rezeptor bekannt. Antagonisten wie Relcovaptan müssen also empirisch auf ihre Eignung zur Suppression von Mechanosensitivität überprüft werden, da ihre genauen Wechselwirkungen mit dem Rezeptor und die Auswirkungen ihrer Bindung auf die nachgeschaltete Signalkaskade bisher unbekannt sind. Unter Zuhilfenahme von konditionalen gewebe-spezifischen Knockout-Modellen könnten schließlich auch nicht-pharmakologisch weitere Einblicke in die putative Mechanosensorik des Rezeptors möglich werden.

Auch BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer)-Analysen, die eine auf mechanische Rezeptoraktivierung folgende Rekrutierung von β -Arrestin visualisieren, könnten sich als hilfreich erweisen. Die Mechanosensitivität des AT_1 -Rezeptors konnte über diesen Ansatz bereits gut gezeigt werden (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008; Rakesh *et al.*, 2010). Die Anwendung auf andere putative Mechanosensoren und ihre inhibitorischen Moleküle erscheint damit vielversprechend.

4.3.4 Nicht-Additivität von kombinierter pharmakologischer Inhibition des myogenen Tonus

Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied zwischen der Applikation von RCBP, RCB und Prazosin in der jeweiligen reduzierenden Wirkung auf den myogenen Tonus. Dieser fehlende Unterschied soll als Nicht-Additivität bezeichnet werden. Die molekulare Grundlage der Nicht-Additivität findet sich möglicherweise in limitierenden G-Proteinkonzentrationen. Die Rezeptoren konkurrieren sowohl im aktiven wie auch im inaktiven Zustand um G-Proteine und können damit ihre Signale gegenseitig auslöschen. Auch der Begriff „negative Interferenz“ (Tubio *et al.*, 2010) kursiert für diese Beobachtung. Das Phänomen ist in der Literatur für diverse G-Protein-Familien gut dokumentiert und damit auch für alle an sie koppelnden 7TMR relevant.

Monczor und Mitarbeiter transfizierten Zellen mit dem H_2 -Histaminrezeptor. Die Applikation des inversen H_2 -Agonisten Tiotidin reduzierte konzentrationsabhängig die cAMP-Antwort auf den β -Adrenozeptoragonisten Isoproterenol. Die Interpretation der Autoren lautete, dass Tiotidin als inverser Agonist den H_2 -Rezeptor in einem inaktiven, aber G-Protein-affinen Zustand stabilisiert, im Sinne des *cubic ternary complex*-Modells für G-Protein-koppelnde Rezeptoren (Weiss *et al.*, 1996). Diese erhöhte Affinität für G-Proteine

ohne G-Protein-Aktivierung hat ein G-Protein-Minderangebot für andere, an das gleiche G-Protein koppelnde Rezeptoren zur Folge (G-Protein-*hijacking* [Entführung/Festhalten des G-Proteins]). Eine Stimulation anderer, auf das gleiche G-Protein konvergierender Rezeptoren reduziert so den Maximaleffekt der Stimulation (Monczor *et al.*, 2003).

In einer weiteren Arbeit konnten die Autoren zeigen, dass sich die bloße Gegenwart des H₂-Rezeptors negativ auf die cAMP-Antworten auf Stimulation anderer G_s-koppelnder Rezeptoren wie des CT-Kalzitoninrezeptors und des EP₂-Prostaglandinrezeptors auswirkte (Tubio *et al.*, 2010). Dies wurde auf eine hohe G_s-Protein-Sequestrierung des inaktiven H₂-Rezeptors zurückgeführt. Die negative Interferenz zwischen den Rezeptoren ließ sich durch G_{α_s}-Überexpression rückgängig machen. Derselbe Effekt zeigte sich auch bei zusätzlicher Transfektion der H₂-exprimierenden Zellen mit β₂-Adrenozeptor: In Abhängigkeit von der ursprünglichen H₂-Anzahl der Zellen wurde der Effekt einer β₂-Stimulation erniedrigt. In einer endogen β₂-Adrenozeptor exprimierenden Zelllinie führte ein β₂-Adrenozeptor-Knockdown zu höheren cAMP-Leveln auf Stimulation anderer G_s-koppelnder 7TMR. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expressionslevel eines G-Protein-koppelnden Rezeptors entscheidend für eine negative Interferenz mit anderen auf das gleiche G-Protein konvergierenden Rezeptoren sind. Sie stützen damit die Hypothese, dass in der vorliegenden Arbeit eine solche Interferenz stattgefunden haben könnte, da in dieser nur hochexprimierte Rezeptoren pharmakologisch gehemmt wurden.

Die Arbeitsgruppe um Shapira zeigte diesen Effekt auch für G_{i/o}-Proteine. Allerdings wird betont, dass er nur in heterologen Expressionssystemen zu beobachten sei, nicht dagegen in endogenen Expressionssystemen (Shapira *et al.*, 2000). Für 7TMR mit G_{i/o}-Protein-Signaltransduktion könnte die negative Interferenz somit *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle spielen. Es bleibt abzuwarten, was künftige Arbeiten in dieser Hinsicht herausfinden.

Monczor und Kollegen untersuchten nur 7TMR mit G_s-Signaltransduktion. Die vorliegende Arbeit hingegen untersuchte nur den Einfluss von G_{q/11}- oder G_{12/13}-Proteinen auf den myogenen Tonus. Dass die Ergebnisse von Monczor *et al.* dennoch auf die vorliegende Arbeit übertragbar sind, zeigte eine Veröffentlichung von Dasso und Taylor. In dieser konnte eine Konkurrenz von aktivierten V₁-Rezeptoren und aktivierten α₁-Adrenozeptoren um die nachgeschalteten G-Proteine demonstriert werden (Dasso & Taylor, 1992). Arginin-Vasopressin hemmte die Bindung von Adrenalin an seine spezifischen Rezeptoren und umgekehrt. Spezifische Antagonisten verhinderten diesen Effekt.

Die Formierung eines hochaffinen Rezeptor-Agonisten-Komplexes ist abhängig von der Assoziation des Rezeptors mit einem G-Protein (De Lean *et al.*, 1980). Damit kann aus der Hemmung der Aktivierung des zweiten Rezeptors geschlossen werden, dass die Hemmung durch eine G-Protein-Sequestrierung am ersten Rezeptor erfolgte. Es scheint also wahrscheinlich, dass die Aktivierung eines Rezeptors G_{q/11}- oder G_{12/13}-Proteine an diesem Rezeptor konzentriert und deren Aktivierung katalysiert.

Die zitierten Untersuchungen wurden an Membranpräparationen durchgeführt. Die Konkurrenz um G-Proteine war unabhängig von hinzugefügtem GTP. Damit fällt die zitierte Arbeit nicht unter den Vorwurf des Artefakts von Chabre und Kollegen (Chabre *et al.*, 2009). Diese schreiben, dass Kooperativität zwischen verschiedenen 7TMR ein *in-vitro*-Artefakt sei. Die reziproke Beeinflussung des Bindungsverhaltens zweier 7TMR-Liganden sei durch eine GTP-Depletion zu erklären, was eine G-Protein-Sequestrierung und unphysiologisch hohe Affinität des Rezeptors zum Liganden nach sich ziehe. Da in der Arbeit von

Dasso und Taylor der Effekt in Anwesenheit und in Abwesenheit von extern zugefügtem GTP persistierte, greift der Vorwurf des Artefakts hier nicht. Vielmehr wird eine Ausweitung der negativen Interferenz auch auf $G_{q/11}$ - oder $G_{12/13}$ -Protein-koppelnde 7TMR und damit auch auf die vorliegende Arbeit möglich.

Weiter gestützt wird dieses Modell durch Ergebnisse von Fitzsimons und Kollegen, die eine negative Interferenz zwischen dem H_1 -Histaminrezeptor und dem $P2Y_2$ -Purinrezeptor, die beide an $G_{q/11}$ -Proteine koppeln, zeigen konnten. Dabei konnte ein inverser Agonist am H_1 -Rezeptor die Signaltransduktion des $P2Y$ -Purinrezeptors konzentrationsabhängig hemmen. Überexpression von $G_{\alpha_{11}}$ - d.h. Aufhebung der limitierenden G-Proteinkonzentrationen - unterband diesen Effekt (Fitzsimons *et al.*, 2004). $G_{q/11}$ -koppelnde 7TMR können also über den Effekt von inversen Agonisten G-Proteine binden und damit die Signaltransduktion des jeweils anderen Rezeptors erschweren.

Die Anwendung des Modells auf die vorliegenden Ergebnisse wäre also wie folgt:

Dass die hemmenden Effekte von RCBP, RCB und Prazosin in ihrer Höhe gleich ausfallen, könnte durch einen Mangel an $G_{q/11}$ - oder $G_{12/13}$ -Proteinen bedingt sein. Alle Rezeptoren konvergieren auf dieselben G-Proteine und sind zudem in Mesenterialarterien hoch exprimiert. Sollte die G-Proteinkonzentration in einer Zelle also tatsächlich der limitierende Faktor für die Signaltransduktion sein, könnte ein inverser Agonist bereits eine derartige G-Protein-Sequestrierung am inaktivierten Rezeptor induzieren, sodass eine Signaltransduktion durch mechanische Aktivierung der anderen Rezeptoren nicht mehr möglich ist. So könnte Prazosin alleine den gleichen Hemmeffekt erzeugen wie die Kombinationen RCBP oder RCB.

Prazosin und Candesartan sind nachgewiesenermaßen inverse Agonisten. Beide Substanzen waren entweder alleine oder in Kombination in den Experimenten mit RCBP, RCB und Prazosin anwesend. Es ist also vorstellbar, dass sie sich beide eben nicht in ihren Hemmeffekten addieren, sondern ein inverser Agonist durch G-Protein-Sequestrierung den Effekt des anderen inversen Agonisten obskuriert.

Abbildung 38 verdeutlicht nochmals schematisch das Konzept der Nicht-Additivität durch negative Interferenz.

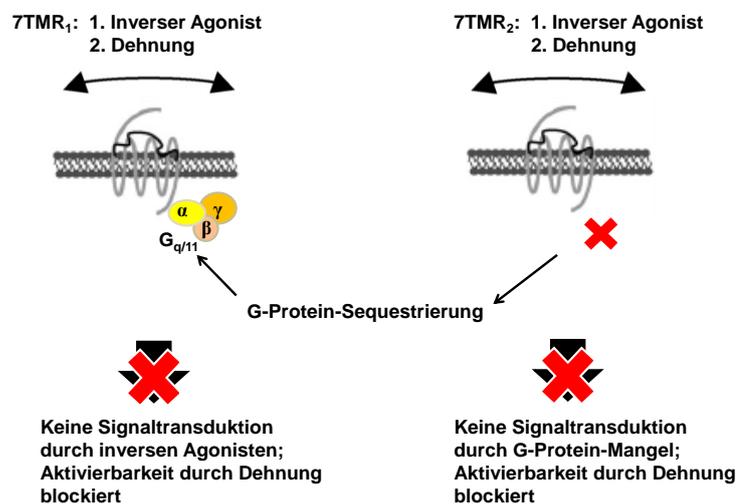
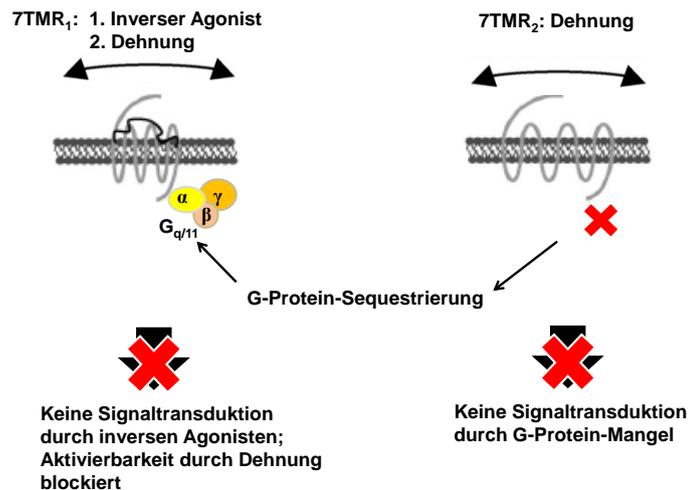


Abbildung 38: Nicht-Additivität durch negative Interferenz. Die obere Bildhälfte zeigt schematisch negative Interferenz von zwei mechanosensitiven 7TMR in Gegenwart eines inversen Agonisten. Bindung des inversen Agonisten an 7TMR₁ führt zur G-Protein-Sequestrierung an 7TMR₁ ohne Signaltransduktion. Eine folgende Membrandehnung führt zu keiner Signaltransduktion an 7TMR₁, da dieser durch den inversen Agonisten in einer inaktiven Konformation stabilisiert wird (siehe auch Abbildung 37). Die Mechanosensitivität von 7TMR₂ bleibt ebenso ohne nachgeschalteten zellulären Effekt, da nicht genügend G-Proteine für die Signaltransduktion zur Verfügung stehen. Die untere Bildhälfte zeigt schematisch negative Interferenz von zwei mechanosensitiven 7TMR in Gegenwart zweier inverser Agonisten. Beide 7TMR sind durch ihre inversen Agonisten in eine inaktive Konformation überführt worden und damit nicht mehr durch Dehnung aktivierbar. Ferner konkurrieren sie um die Bindung und Sequestrierung von G-Proteinen. Eine nun erfolgende Membrandehnung führt zu keiner Signaltransduktion. Damit gleicht das Ausmaß der Signaltransduktion in der oberen Bildhälfte dem in der unteren Bildhälfte. So wird auch die Nicht-Additivität der Effekte von RCB und Prazosin verständlich. Abbildungselemente entnommen aus Akazawa *et al.*, 2009.

Negative Interferenz kann somit auch Beobachtungen erklären, die dem Modell der sequentiellen Aktivierung von 7TMR und TRPC-Kanälen am Anfang der Signalkaskade des myogenen Tonus scheinbar

widersprechen: 7TMR-Agonisten und mechanischer Stress induzieren jeweils einen transmembranären, depolarisierenden TRPC-Ionenstrom. Die Kombination beider Stimuli führt jedoch zu keiner Verstärkung des TRPC-Stroms (Anfinogenova *et al.*, 2011). Diese Beobachtungen müssen trotzdem nicht zur Verwerfung der Hypothese von mechanosensitiven 7TMR führen, da sie gut mit der Konkurrenz um G-Proteine erklärt werden können. Wenn ein limitierter G-Protein-Pool durch einen rezeptoraktivierenden Stimulus bereits erschöpfend rekrutiert wird, kann durch einen zweiten, ebenfalls rezeptoraktivierenden Stimulus keine Steigerung der Antwort erreicht werden.

Auch die Nicht-Additivität der kontraktile Effekte von pharmakologischer Stimulation und Erhöhung des intravasalen Drucks können durch dieses Konzept erklärt werden (Anschütz & Schubert, 2005). Es zeigte sich, dass die gleiche Konstriktionsantwort sowohl durch alleinige Druckerhöhung als auch durch Druckerhöhung plus pharmakologische Vorkonstriktion erreicht wird. Kleinere Druckerhöhungen hingegen, die unter Kontrollbedingungen noch keinen myogenen Tonus auslösten, wurden durch pharmakologische Vorkonstriktion in den myogenen Bereich verschoben. Dies bedeutet, dass ein Synergismus davon abhängig sein könnte, in welchem Ausmaß druckinduzierte und pharmakologische Kontraktionswege aktiviert sind. Ein kleiner Drucksprung aktiviert wahrscheinlich nur eine geringe Population von Rezeptoren. Damit konkurriert er nur um eine entsprechend kleinere Anzahl an G-Proteinen mit den pharmakologisch aktivierten Rezeptoren. Ein großer Drucksprung könnte dagegen unter Umständen in seinem Effekt durch parallele pharmakologische Rezeptoraktivierung verschleiert werden.

Zur Erhärtung der Vermutung, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über negative Interferenz erklärt werden könnten, sind weitere Arbeiten speziell mit den hier untersuchten Rezeptoren notwendig. Insbesondere wäre interessant, ob sich Ergebnisse auf Einzelzellebene im heterologen Expressionssystem mit zwei und mehr 7TMR reproduzieren lassen.

4.4 Ausblicke

Wie schon erwähnt, wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits die Effekte der Einzelsubstanzen Relcovaptan, Candesartan und BQ-123 auf den myogenen Tonus getestet. Mit diesen Kenntnissen kann eine Korrelation zwischen Expressionslevel des Rezeptors und Tonusreduktion durch dessen Hemmung erstellt werden.

Es wurde ein RNA-basiertes Rezeptorexpressionsprofil für mehrere Gefäßgebiete erstellt. Auf Basis dieser Ergebnisse lassen sich weitergehende Experimente planen:

So können auch die untersuchten Leitungsgefäße in ihrer Fähigkeit, einen myogenen Tonus auszubilden, explizit getestet werden. Wenn die diesbezüglichen Daten für Abdominalaorta und A. mesenterica superior vorliegen, können die Daten mit denen der kleinen Mesenterialarterien verglichen werden. Damit könnte über drei Gefäßgenerationen hinweg eine Änderung von Myogenität untersucht werden. Unterschiede zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäßen ließen sich auf diese Weise womöglich genauer erfassen. Es wäre ferner interessant zu wissen, ob es auch in den Leitungsgefäßen zu einer bisigmoiden MT_1 -Kurve mit Linksverschiebung und Transition zur monosigmoiden MT_2 -Kurve kommt. Unterschiede in den Parametern der Regressionskurven könnten ebenfalls weitere Hinweise auf die funktionellen Unterschiede zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäßen und deren molekulare Träger liefern.

Desweiteren könnten über die Applikation von inversen Agonisten an Leitungsgefäßen die erarbeiteten signifikanten Unterschiede in den 7TMR-RNA-Leveln weiter auf ihre funktionelle Relevanz untersucht werden. Damit ließe sich die Vermutung, dass sich Unterschiede zwischen Widerstands- und Leitungsgefäßen an den Expressionsleveln spezifischer, vermutlich mechanosensitiver 7TMR widerspiegeln, weiter erhärten.

Ein Nachteil der vorliegenden Arbeit ist, dass sie den Einfluss anderer hypothetischer Mechanosensoren im Rahmen der MT-Entstehung nicht ausschließen kann. Dies ist wegen der Vielfältigkeit der diskutierten Strukturen nahezu unmöglich in einem einzigen Ansatz zu realisieren.

Da der myogene Tonus durch inverse Agonisten bisher nur in seinem Maximaleffekt gesenkt werden konnte, nicht aber vollständig unterdrückt wurde, ist anzunehmen, dass weitere komplementäre mechanosensitive Strukturen existieren, siehe auch Tabelle 3. Folglich müssen auch die anderen Strukturen, für die über eine Funktion als Mechanosensor des myogenen Tonus bisher spekuliert wurde, mit dem gleichen Ansatz untersucht werden.

Auch hier wäre es interessant, Unterschiede in der Expression und Funktionalität zwischen Leitungs- und Widerstandsgefäßen festzustellen. Schließlich sollte versucht werden, deren relativen Anteil am Zustandekommen des myogenen Tonus durch selektive Ausschaltung zu quantifizieren. Abbildung 39 versucht, den quantitativen Anteil $G_{q/11}$ - bzw. $G_{12/13}$ -Protein-koppelnder sensorischer 7TMR am myogenen Tonus darzustellen.

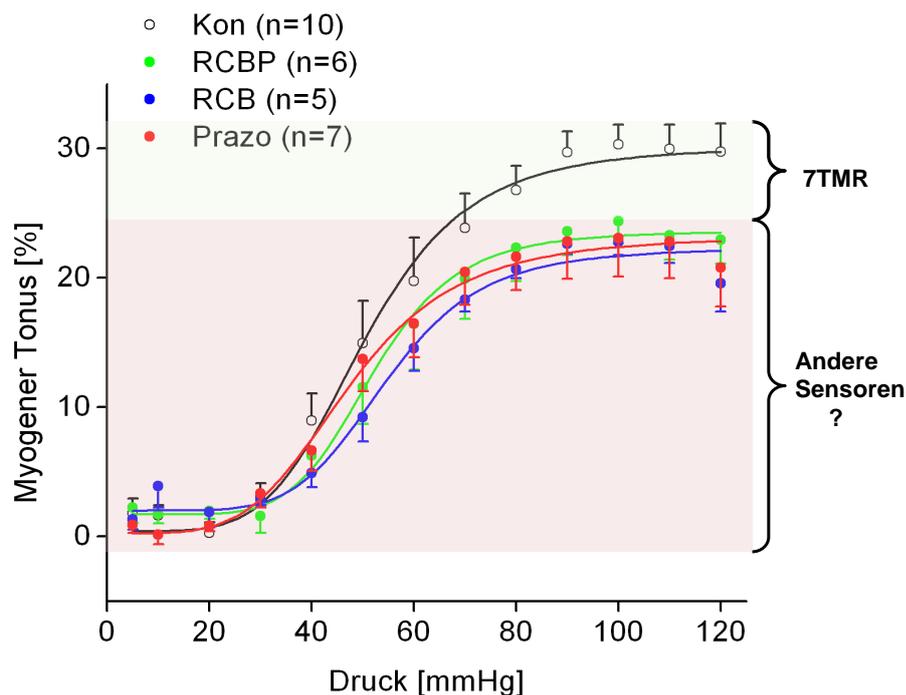


Abbildung 39: Gezeigt ist der relative Anteil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 7TMR (lila hinterlegt) am gesamten myogenen Tonus (blau hinterlegt). Der myogene Tonus konnte durch die Hemmung der 7TMR nicht komplett unterdrückt werden. Damit liegt es nahe, andere putative Sensoren (siehe auch Tabelle 3) für das Zustandekommen des myogenen Tonus zu analysieren. Vielleicht kann künftig deren relativer Anteil ebenfalls beziffert werden und in ein Gesamtmodell mathematisch integriert werden.

Wahrscheinlich liegt in der Konvergenz verschiedener Mechanosensoren der Schlüssel zum Verständnis dieses Organreflexes:

Die Tatsache, dass verschiedene zelluläre Strukturen zur Gesamtmechanosensitivität beitragen, könnte bei Ausfall eines Sensors über Redundanz eine größtmögliche Restsensitivität und damit eine größtmögliche Restantwort garantieren.

Am Ende könnte ein mathematisches Modell des myogenen Tonus stehen, das alle relevanten Sensoren miteinander kombiniert und in ihrem relativen Anteil umfasst. Dieses Modell kann hoffentlich allen bisher diskutierten tonusrelevanten Strukturen ihren Platz im komplexen Gefüge der Signalkaskaden des myogenen Tonus zuweisen.

Auf die Ergebnisse zur Mechanosensitivität von 7TMR und deren Beeinflussung durch inverse Agonisten übertragen, könnte das Stichwort „Mechanopharmaceutics“ wieder aktiviert werden. Dieses bezeichnete ursprünglich die pharmakologische Beeinflussung mechanosensitiver Ionenkanäle (Hamill, 2006). Die Ausweitung auf inverse Agonisten könnte helfen, auf deren Beeinflussung mechanosensitiver Prozesse hinzuweisen, was den bisherigen, rein pharmakochemischen Horizont ihrer Anwendung weit überstiege. Zusätzlich lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass eine Kombination verschiedener inverser Agonisten an auf die gleichen G-Proteine konvergierenden 7TMR durch die resultierende negative Interferenz nicht sinnvoll wäre. Sollten mechanoinhibitorische inverse Agonisten explizit als solche zur Anwendung am Menschen gelangen, müsste eine Kombinationstherapie unbedingt kritisch betrachtet werden.

Die Ergebnisse beschränken sich jedoch nicht nur auf die Mechanoinhibition: Alle sich bisher in therapeutischer Anwendung befindlichen Antagonisten sollten auf intrinsische Eigenschaften als inverse Agonisten überprüft werden. Daran anschließen sollte sich eine kritische Evaluation, welche Substanzen sich zur Kombinationstherapie eignen, und bei welchen eine negative Interferenz zu befürchten ist.

Mechanosensitivität ist ein für den Gesamtorganismus fundamentaler Prozess. Dessen ungeachtet ist noch erstaunlich wenig über die Prozesse bekannt, die mechanische Energie in zelluläre Signale umsetzen (Kung, 2005; Christensen & Corey, 2007). Vielleicht kann künftig das Konzept mechanosensitiver 7TMR helfen, auch auf anderen Gebieten als dem myogenen Tonus Erkenntnisfortschritte zu erzielen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegend präsentierten Experimente hatten zum Ziel, die hypothetische Rolle von $G_{q/11}$ - bzw. $G_{12/13}$ -koppelnden heptahelikalen Transmembrandomänenrezeptoren (7TMR) als Mechanosensoren für die Initiation des myogenen Tonus zu untersuchen.

Um festzustellen, welche 7TMR hierfür besonders relevant sind, wurden Leitungsgefäße mit Widerstandsgefäßen in ihren RNA-Leveln für eine Reihe von 7TMR verglichen. Dies geschah auf der Grundlage, dass Leitungsgefäße einen geringeren myogenen Tonus aufweisen als Widerstandsgefäße. Eine aus höheren RNA-Leveln ableitbare größere Anzahl an putativen Sensormolekülen sollte also über eine größere Mechanosensitivität des Gefäßes zu einem höheren Ausmaß an myogener Vasokonstriktion führen.

Die RNA-Level wurden mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte relativ zum geometrischen Mittel dreier Haushaltsgene. Die untersuchten Widerstandsgefäße um-

fasten kleine Mesenterialarterien, Nierenarterien und Gehirnarterien. Die untersuchten Leitungsgefäße umfassten die A. mesenterica superior, Bauchaorta, A. carotis communis und die Pulmonalarterie.

Folgende Rezeptoren stellten sich in der qRT-PCR aufgrund ihres Expressionsprofils als vielversprechende molekulare Sensorproteine in Widerstandsgefäßen heraus: AT_{1B}-Angiotensinrezeptor, ET_A-Endothelinrezeptor, V_{1A}-Vasopressinrezeptor, α_{1A} -Adrenozeptor.

In einem zweiten Schritt wurde versucht, über pharmakologische Inhibition der vorgenannten Rezeptoren eine Reduktion des myogenen Tonus zu erreichen. Die eingesetzte Methode war die isobare Konstriktionsmessung (Arteriographie) an isolierten kleinen Mesenterialarterien. Die Methode erforderte vor der eigentlichen Applikation der Pharmaka die Registrierung eines myogenen Tonus in Abwesenheit jeglicher Pharmaka. Dann erst wurde der myogene Tonus unter Anwesenheit von Pharmaka ein zweites Mal registriert. Bei der genaueren Analyse des ersten myogenen Tonus fiel dessen bisigmoider Verlauf auf. Möglicherweise liegt dieser charakteristischen Form eine zeitversetzte Aktivierung der an die putativen mechanosensitiven 7TMR koppelnden G-Proteine zugrunde: Zunächst werden wahrscheinlich G_{q/11}-Proteine aktiviert, dann G_{12/13}-Proteine.

Bei der Analyse des Kurvenverlaufs zum zweiten myogenen Tonus zeigte sich unter Kontrollbedingungen, d.h. unter Abwesenheit von Pharmaka, eine Linksverschiebung relativ zum ersten myogenen Tonus. Darüberhinaus änderte sich die Kurvenform von bisigmoid zu monosigmoid. Wahrscheinlich sind auch für diese Charakteristika Eigenheiten der an die putativ mechanosensitiven 7TMR koppelnden G-Proteine verantwortlich: Die im Zuge des ersten myogenen Tonus aktivierten G_{12/13}-Proteine inaktivieren möglicherweise langsamer durch GTP-Hydrolyse als die G_{q/11}-Proteine. Deshalb könnten zu Beginn des zweiten myogenen Tonus beide G-Protein-Spezies aktiv sein und so die Mechanosensitivität der glatten Muskelzellen drastisch erhöhen, was die Linksverschiebung erklären würde. Die nun konzertiert erfolgende G-Protein-Aktivierung könnte ferner den monosigmoiden Kurvenverlauf erklären.

Die Applikation der Pharmaka erfolgte zunächst als Kombination von antagonistischen Substanzen an AT₁, ET_A, V_{1A}- und α_1 -Rezeptoren. Eingesetzt wurden Candesartan, BQ-123, Relcovaptan und Prazosin. Diese Kombination reduzierte den myogenen Tonus signifikant in seiner Amplitude. Anschließend wurde Prazosin als Monosubstanz getestet. Der Hemmeffekt unterschied sich nicht von der ursprünglichen Viererkombination. Schließlich erfolgte eine Testung der ursprünglichen Kombination unter Auslassung von Prazosin. Auch hier war der hemmende Effekt derselbe. Zur Erklärung dieser Befunde wurde das Konzept der negativen Interferenz herangezogen: Dabei konkurrieren 7TMR um einen limitierten Pool an G-Proteinen. Inverse Agonisten (wie sie die Substanzen Candesartan und Prazosin darstellen) führen zu einer Sequestrierung von G-Proteinen an den jeweiligen Rezeptoren ohne folgende Signaltransduktion. Dabei könnte die Applikation eines inversen Agonisten dieselben Effekte erzielen wie eine kombinierte Applikation.

Letztlich konnte durch den hemmenden Effekt von Prazosin für α_1 -Adrenozeptoren bestätigt werden, dass sie eine mechanosensitive Funktion ausüben. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des qPCR-Teils handelt es sich wahrscheinlich um α_{1A} -Adrenozeptoren. Deren Mechanosensitivität kann einen Teil der Kontraktion glatter Muskelzellen auf einen steigenden intravasalen Druck vermitteln und damit einen entsprechenden Anteil am myogenen Tonus erklären.

6 Kongressbeiträge

1. G-Protein coupled receptors serve as mechanosensory elements to determine arterial myogenic tone
Schneider H., Blodow S., Wizemann R., Storch U., Gudermann T., and Mederos y Schnitzler y Schnitzler M.
Acta Physiologica 2011; Volume 201, Supplement 682: P074 (Postervortrag im Rahmen des 90. Jahrestreffens der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG) in Regensburg 2011)
2. $G_{q/11}$ -protein coupled receptors function as mechanosensors in myogenic vasoconstriction.
Schneider H., Blodow S., Wizemann R., Storch U., Gudermann T., and Mederos y Schnitzler y Schnitzler M.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 383, Supplement 1: P224 (Postervortrag im Rahmen der 77. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Frankfurt am Main 2011)
3. The contribution of $G_{q/11}$ -protein coupled receptors to myogenic vasoconstriction
Blodow S., Schneider H., Wizemann R., Storch U., Gudermann T., and Mederos y Schnitzler M. (Postervortrag P218 im Rahmen des Joint Meeting of the European Society of Microcirculation (ESM) and the Society of Microcirculation and Vascular Biology (GfMvB) in München 2011)
4. The role of AT_{1A} and AT_{1B} receptors as mechanosensors in myogenic vasoconstriction
Blodow S., Schneider H., Wizemann R., Storch U., Gudermann T., and Mederos y Schnitzler M. (Vortrag ID-153 im Rahmen der 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Dresden 2012)
5. The contribution of AT_1 receptors as mechanosensors to arterial myogenic tone
Blodow S., Schneider H., Wizemann R., Storch U., Gudermann T., and Mederos y Schnitzler M. (Vortrag O29 im Rahmen der 91. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG) in Dresden 2012)
6. The contribution of GPCRs to myogenic response in murine mesenteric arteries
Blodow S., Mederos y Schnitzler M., Schneider H., Wizemann R., Storch U., and Gudermann T. (Vortrag 0001 im Young Investigator Forum im Rahmen des Joint Meeting of the Society of Microcirculation and Vascular Biology (GfMvB) and the Dutch Society for Endothelial Biology (DEBS) and the Dutch Society for Microcirculation and Vascular Biology (MiVaB) in Mannheim 2012)
7. Contribution of GPCRs to murine myogenic response
Blodow S., Schneider H., Wizemann R., Storch U., Gudermann T., and Mederos y Schnitzler M. (Postervortrag im Rahmen des 2. Munich Heart Alliance [MHA] Meetings in München 2012)
8. Mechanosensation of G-Protein coupled receptors
Blodow S., Erdogmus S., Schneider H., Forst A., Wizemann R., Storch U., Gudermann T., and

Mederos y Schnitzler M.

(Postervortrag im Rahmen des 3. Munich Heart Alliance [MHA] Meetings in München 2013)

7 Internetquellen

1. Roche Applied Science (Mannheim): Universal-Probe-Library.
Im Internet unter <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000>, zuletzt aufgerufen am 12.10.2010.
2. Center for Biomolecular Science & Engineering (University of California, Santa Cruz, USA): Genome Browser - in-silico PCR.
Im Internet unter <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>, zuletzt aufgerufen am 12.10.2010.

Literatur

- Abdul-Majeed, Shakila, & Nauli, Surya M. 2011. Dopamine receptor type 5 in the primary cilia has dual chemo- and mechano-sensory roles. *Hypertension*, **58**(2), 325–331.
- Adner, M., Cantera, L., Ehlert, F., Nilsson, L., & Edvinsson, L. 1996. Plasticity of contractile endothelin-B receptors in human arteries after organ culture. *Br J Pharmacol*, **119**(6), 1159–1166.
- Ahlquist, R. P. 1948. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*, **153**(3), 586–600.
- Akazawa, Hiroshi, Yasuda, Noritaka, & Komuro, Issei. 2009. Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol*, **302**(2), 140–147.
- Akazawa, Hiroshi, Yabumoto, Chizuru, Yano, Masamichi, Kudo-Sakamoto, Yoko, & Komuro, Issei. 2012. ARB and Cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther*, Apr.
- Al Zubair, K., Bexis, S., & Docherty, J. R. 2008. Relaxations to beta-adrenoceptor subtype selective agonists in wild-type and NOS-3-KO mouse mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol*, **587**(1-3), 216–223.
- Amenta, F., Cavallotti, C., Rossi, M. De, & Vatrella, F. 1983. Beta-adrenoceptors in the rat kidney. Immunohistochemical study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **324**(2), 94–98.
- Anfinogenova, Yana, Brett, Suzanne E, Walsh, Michael P, Harraz, Osama F, & Welsh, Donald G. 2011. Do TRPC-like Currents and G-Protein Coupled Receptors Interact to Facilitate Myogenic Tone Development? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Aug.
- Anschütz, Stephanie, & Schubert, Rudolf. 2005. Modulation of the myogenic response by neurogenic influences in rat small arteries. *Br J Pharmacol*, **146**(2), 226–233.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., & Nakanishi, S. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**(6303), 730–732.

- Arch, J. R., Ainsworth, A. T., Cawthorne, M. A., Piercy, V., Sennitt, M. V., Thody, V. E., Wilson, C., & Wilson, S. 1984. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, **309**(5964), 163–165.
- Artigues-Varin, Cécile, Richard, Vincent, Varin, Rémi, Mulder, Paul, & Thuillez, Christian. 2002. Alpha2-adrenoceptor ligands inhibit alpha1-adrenoceptor-mediated contraction of isolated rat arteries. *Fundam Clin Pharmacol*, **16**(4), 281–287.
- Bagher, Pooneh, Beleznai, Timea, Kansui, Yasuo, Mitchell, Ray, Garland, Christopher J, & Dora, Kim A. 2012. Low intravascular pressure activates endothelial cell TRPV4 channels, local Ca²⁺ events, and IKCa channels, reducing arteriolar tone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Oct.
- Bakker, R. A., Schoonus, S. B., Smit, M. J., Timmerman, H., & Leurs, R. 2001. Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol*, **60**(5), 1133–1142.
- Bao, Jun-Xiang, Zhang, Li-Fan, & Ma, Jin. 2007. Angiotensinogen and AT1R expression in cerebral and femoral arteries during hindlimb unloading in rats. *Aviat Space Environ Med*, **78**(9), 852–858.
- Bayliss, W. M. 1902. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol*, **28**(3), 220–31.
- Berkowitz, D. E., Price, D. T., Bello, E. A., Page, S. O., & Schwinn, D. A. 1994. Localization of messenger RNA for three distinct alpha 2-adrenergic receptor subtypes in human tissues. Evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology. *Anesthesiology*, **81**(5), 1235–1244.
- Bevan, J. A., & Laher, I. 1991. Pressure and flow-dependent vascular tone. *FASEB J*, **5**(9), 2267–73.
- Bidani, Anil K, Griffin, Karen A, Williamson, Geoffrey, Wang, Xuemei, & Loutzenhiser, Rodger. 2009. Protective importance of the myogenic response in the renal circulation. *Hypertension*, **54**(2), 393–398.
- Blanco-Rivero, Javier, Balfagón, Gloria, & Ferrer, Mercedes. 2006. Orchidectomy modulates alpha2-adrenoceptor reactivity in rat mesenteric artery through increased thromboxane A2 formation. *J Vasc Res*, **43**(1), 101–108.
- Bolz, Steffen-Sebastian, Vogel, Lukas, Sollinger, Daniel, Derwand, Roland, Boer, Christa, Pitson, Stuart M, Spiegel, Sarah, & Pohl, Ulrich. 2003. Sphingosine kinase modulates microvascular tone and myogenic responses through activation of RhoA/Rho kinase. *Circulation*, **108**(3), 342–347.
- Brakemeier, Susanne, Eichler, Ines, Knorr, Andrea, Fassheber, Til, Köhler, Ralf, & Hoyer, Joachim. 2003. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. *Kidney Int*, **64**(1), 199–207.
- Briley, E. M., Lolait, S. J., Axelrod, J., & Felder, C. C. 1994. The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. *Neuropeptides*, **27**(1), 63–74.

- Briones, Ana M, Daly, Craig J, Jimenez-Altayo, Francesc, Martinez-Revelles, Sonia, Gonzalez, Jose M, McGrath, John C, & Vila, Elisabet. 2005. Direct demonstration of beta1- and evidence against beta2- and beta3-adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*, **146**(5), 679–691.
- Bryan, R. M., Steenberg, M. L., Eichler, M. Y., Johnson, T. D., Swafford, M. W., & Suresh, M. S. 1995. Permissive role of NO in alpha 2-adrenoceptor-mediated dilations in rat cerebral arteries. *Am J Physiol*, **269**(3 Pt 2), H1171–H1174.
- Bulley, Simon, Neeb, Zachary P, Burris, Sarah K, Bannister, John P, Thomas-Gatewood, Candice M, Jangsangthong, Wanchana, & Jaggar, Jonathan H. 2012. TMEM16A Channels Contribute to the Myogenic Response in Cerebral Arteries. *Circ Res*, Aug.
- Burstein, E. S., Spalding, T. A., & Brann, M. R. 1997. Pharmacology of muscarinic receptor subtypes constitutively activated by G proteins. *Mol Pharmacol*, **51**(2), 312–319.
- Bylund, D. B. 1985. Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, **22**(5), 835–843.
- Bylund, D. B., Eikenberg, D. C., Hieble, J. P., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Molinoff, P. B., Ruffolo, R. R., Jr., & Trendelenburg, U. 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, **46**(2), 121–36.
- Cahill, P. A., Hou, M. C., Hendrickson, R., Wang, Y. N., Zhang, S., Redmond, E. M., & Sitzman, J. V. 1998. Increased expression of endothelin receptors in the vasculature of portal hypertensive rats: role in splanchnic hemodynamics. *Hepatology*, **28**(2), 396–403.
- Chabre, Marc, Deterre, Philippe, & Antonny, Bruno. 2009. The apparent cooperativity of some GPCRs does not necessarily imply dimerization. *Trends Pharmacol Sci*, **30**(4), 182–187.
- Chachisvilis, Mirianas, Zhang, Yan-Liang, & Frangos, John A. 2006. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(42), 15463–15468.
- Chamley-Campbell, J., Campbell, G. R., & Ross, R. 1979. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*, **59**(1), 1–61.
- Chassagne, C., Eddahibi, S., Adamy, C., Rideau, D., Marotte, F., Dubois-Randé, J. L., Adnot, S., Samuel, J. L., & Teiger, E. 2000. Modulation of angiotensin II receptor expression during development and regression of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **22**(3), 323–332.
- Chiba, S., & Tsukada, M. 2001. Vascular responses to beta-adrenoceptor subtype-selective agonists with and without endothelium in rat common carotid arteries. *J Auton Pharmacol*, **21**(1), 7–13.
- Chiu, A. T., Herblin, W. F., McCall, D. E., Ardecky, R. J., Carini, D. J., Duncia, J. V., Pease, L. J., Wong, P. C., Wexler, R. R., & Johnson, A. L. 1989. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*, **165**(1), 196–203.

- Chiu, A. T., Dunscomb, J., Kosierowski, J., Burton, C. R., Santomenna, L. D., Corjay, M. H., & Benfield, P. 1993. The ligand binding signatures of the rat AT1A, AT1B and the human AT1 receptors are essentially identical. *Biochem Biophys Res Commun*, **197**(2), 440–449.
- Chlopicki, S., Nilsson, H., & Mulvany, M. J. 2001. Initial and sustained phases of myogenic response of rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**(5), H2176–83.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**(1), 156–9.
- Chotani, Maqsood A, Mitra, Srabani, Su, Baogen Y, Flavahan, Sheila, Eid, Ali H, Clark, K. Reed, Montague, Christine R, Paris, Herve, Handy, Diane E, & Flavahan, Nicholas A. 2004. Regulation of alpha(2)-adrenoceptors in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **286**(1), H59–H67.
- Christensen, Adam P, & Corey, David P. 2007. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci*, **8**(7), 510–521.
- Christensen, K. L., & Mulvany, M. J. 2001. Location of resistance arteries. *J Vasc Res*, **38**(1), 1–12.
- Christensen, P. K., Hansen, H. P., & Parving, H. H. 1997. Impaired autoregulation of GFR in hypertensive non-insulin dependent diabetic patients. *Kidney Int*, **52**(5), 1369–1374.
- Chruscinski, A., Brede, M. E., Meinel, L., Lohse, M. J., Kobilka, B. K., & Hein, L. 2001. Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol*, **60**(5), 955–962.
- Coats, P., Johnston, F., MacDonald, J., McMurray, J. J., & Hillier, C. 2001. Signalling mechanisms underlying the myogenic response in human subcutaneous resistance arteries. *Cardiovasc Res*, **49**(4), 828–837.
- Cole, W. C., & Welsh, D. G. 2011. Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Arch Biochem Biophys*.
- Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., & Kobilka, B. K. 1988. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(19), 7159–7163.
- D'Angelo, G., Davis, M. J., & Meininger, G. A. 1997. Calcium and mechanotransduction of the myogenic response. *Am J Physiol*, **273**(1 Pt 2), H175–H182.
- Daniel, E. E., Gaspar, V., Berezin, I., & Kwan, C. Y. 1995. Characterization of alpha 2 adrenoceptors and other adrenoceptors in membranes isolated from dog mesenteric nerve axons. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**(2), 978–986.
- Daniel, E. E., Brown, R. D., Wang, Y. F., Low, A. M., Lu-Chao, H., & Kwan, C. Y. 1999. Alpha-adrenoceptors in canine mesenteric artery are predominantly 1A subtype: pharmacological and immunochemical evidence. *J Pharmacol Exp Ther*, **291**(2), 671–679.

- Dasso, L. L., & Taylor, C. W. 1992. Different calcium-mobilizing receptors share the same guanine nucleotide-binding protein pool in hepatocytes. *Mol Pharmacol*, **42**(3), 453–457.
- Davenport, A. P. 2002. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, **54**(2), 219–26.
- Davenport, A. P., O'Reilly, G., Molenaar, P., Maguire, J. J., Kuc, R. E., Sharkey, A., Bacon, C. R., & Ferro, A. 1993. Human endothelin receptors characterized using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in situ hybridization, and subtype-selective ligands BQ123 and BQ3020: evidence for expression of ETB receptors in human vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*, **22 Suppl 8**, S22–S25.
- Davie, Neil, Haleen, Stephen J, Upton, Paul D, Polak, Julia M, Yacoub, Magdi H, Morrell, Nicholas W, & Wharton, John. 2002. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med*, **165**(3), 398–405.
- Davis, M. J. 1993. Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am J Physiol*, **264**(6 Pt 2), H2168–H2179.
- Davis, M. J., & Hill, M. A. 1999. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*, **79**(2), 387–423.
- Davis, M. J., & Sikes, P. J. 1990. Myogenic responses of isolated arterioles: test for a rate-sensitive mechanism. *Am J Physiol*, **259**(6 Pt 2), H1890–900.
- Davis, M. J., Ferrer, P. N., & Gore, R. W. 1986. Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol*, **250**(2 Pt 2), H291–H303.
- Davis, M. J., Wu, X., Nurkiewicz, T. R., Kawasaki, J., Davis, G. E., Hill, M. A., & Meininger, G. A. 2001. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**(4), H1427–H1433.
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., & Unger, T. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, **52**(3), 415–72.
- De Keyser, J., Ebinger, G., De Backer, J. P., Convents, A., Vanderheyden, P., & Vauquelin, G. 1988. Subtypes of adrenergic and dopaminergic receptors in bovine cerebral blood vessels. *Neurosci Lett*, **85**(2), 272–276.
- De Lean, A., Stadel, J. M., & Lefkowitz, R. J. 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **255**(15), 7108–17.
- Dessy, C., Kim, I., Sougnez, C. L., Laporte, R., & Morgan, K. G. 1998. A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation. *Am J Physiol*, **275**(4 Pt 1), C1081–C1086.

- Dessy, C., Matsuda, N., Hulvershorn, J., Sougnez, C. L., Sellke, F. W., & Morgan, K. G. 2000. Evidence for involvement of the PKC- α isoform in myogenic contractions of the coronary microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**(3), H916–H923.
- Dhanasekaran, N., & Dermott, J. M. 1996. Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal*, **8**(4), 235–245.
- Dimitropoulou, C., White, R. E., Fuchs, L., Zhang, H., Catravas, J. D., & Carrier, G. O. 2001. Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor and Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) channels. *Hypertension*, **37**(2), 301–307.
- DiSanto, M. E., Cox, R. H., Wang, Z., & Chacko, S. 1997. NH₂-terminal-inserted myosin II heavy chain is expressed in smooth muscle of small muscular arteries. *Am J Physiol*, **272**(5 Pt 1), C1532–C1542.
- Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Strader, C. D. 1986. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, **321**(6065), 75–79.
- Docherty, J. R. 1998. Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, **361**(1), 1–15.
- Dubroca, Caroline, Loyer, Xavier, Retailleau, Kevin, Loirand, Gervaise, Pacaud, Pierre, Feron, Olivier, Balligand, Jean-Luc, Lévy, Bernard I, Heymes, Christophe, & Henrion, Daniel. 2007. RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries. *Cardiovasc Res*, **73**(1), 190–197.
- Earley, S., Straub, S. V., & Brayden, J. E. 2007. Protein kinase C regulates vascular myogenic tone through activation of TRPM4. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **292**(6), H2613–22.
- Earley, Scott, Waldron, Brian J, & Brayden, Joseph E. 2004. Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res*, **95**(9), 922–929.
- Eason, M. G., & Liggett, S. B. 1993. Human alpha 2-adrenergic receptor subtype distribution: widespread and subtype-selective expression of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 mRNA in multiple tissues. *Mol Pharmacol*, **44**(1), 70–75.
- Edvinsson, L., & Owman, C. 1974. Pharmacological characterization of adrenergic alpha and beta receptors mediating the vasomotor responses of cerebral arteries in vitro. *Circ Res*, **35**(6), 835–849.
- Emorine, L. J., Marullo, S., Briend-Sutren, M. M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C., & Strosberg, A. D. 1989. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*, **245**(4922), 1118–1121.
- Evora, P. R., Pearson, P. J., & Schaff, H. V. 1993. Arginine vasopressin induces endothelium-dependent vasodilatation of the pulmonary artery. V1-receptor-mediated production of nitric oxide. *Chest*, **103**(4), 1241–1245.

- Faber, James E, & Yang, Nengyu. 2006. Balloon injury alters alpha-adrenoceptor expression across rat carotid artery wall. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **33**(3), 204–210.
- Fain, J. N., & García-Sáinz, J. A. 1980. Role of phosphatidylinositol turnover in alpha 1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha 2 effects of catecholamines. *Life Sci*, **26**(15), 1183–1194.
- Falcone, J. C., Davis, M. J., & Meininger, G. A. 1991. Endothelial independence of myogenic response in isolated skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol*, **260**(1 Pt 2), H130–H135.
- Falcone, J. C., Granger, H. J., & Meininger, G. A. 1993. Enhanced myogenic activation in skeletal muscle arterioles from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, **265**(6 Pt 2), H1847–55.
- Faraci, Frank M, Lamping, Kathryn G, Modrick, Mary L, Ryan, Michael J, Sigmund, Curt D, & Didion, Sean P. 2006. Cerebral vascular effects of angiotensin II: new insights from genetic models. *J Cereb Blood Flow Metab*, **26**(4), 449–455.
- Fathy, D. B., Leeb, T., Mathis, S. A., & Leeb-Lundberg, L. M. 1999. Spontaneous human B2 bradykinin receptor activity determines the action of partial agonists as agonists or inverse agonists. Effect of basal desensitization. *J Biol Chem*, **274**(42), 29603–29606.
- Fenger-Gron, J., Mulvany, M. J., & Christensen, K. L. 1995. Mesenteric blood pressure profile of conscious, freely moving rats. *J Physiol*, **488** (Pt 3)(Nov), 753–760.
- Fitzsimons, Carlos P, Monczor, Federico, Fernández, Natalia, Shayo, Carina, & Davio, Carlos. 2004. Mepyramine, a histamine H1 receptor inverse agonist, binds preferentially to a G protein-coupled form of the receptor and sequesters G protein. *J Biol Chem*, **279**(33), 34431–34439.
- Folkow, B. 1989. Myogenic mechanisms in the control of systemic resistance. Introduction and historical background. *J Hypertens Suppl*, **7**(4), S1–S4.
- Force, T., & Bonventre, J. V. 1998. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*, **31**(1 Pt 2), 152–161.
- Frielle, T., Collins, S., Daniel, K. W., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Kobilka, B. K. 1987. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(22), 7920–7924.
- Fukuroda, T., Fujikawa, T., Ozaki, S., Ishikawa, K., Yano, M., & Nishikibe, M. 1994. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **199**(3), 1461–1465.
- Ganly, Ian, Talbot, Simon, Carlson, Diane, Viale, Agnes, Maghami, Ellie, Osman, Iman, Sherman, Eric, Pfister, David, Chuai, Shaokun, Shaha, Ashok R, Kraus, Dennis, Shah, Jatin P, Socci, Nicholas D, & Singh, Bhuvanesh. 2007. Identification of angiogenesis/metastases genes predicting chemoradiotherapy response in patients with laryngopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol*, **25**(11), 1369–1376.
- Gannon, K. P., Vanlandingham, L. G., Jernigan, N. L., Grifoni, S. C., Hamilton, G., & Drummond, H. A. 2008. Impaired pressure-induced constriction in mouse middle cerebral arteries of ASIC2 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **294**(4), H1793–803.

- Gardiner, S. M., Compton, A. M., & Bennett, T. 1989. The effects of infusions of arginine vasopressin or 1-deamino-8-D-arginine vasopressin on common carotid vascular resistance in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol*, **97**(1), 153–157.
- Garry, A., Fromy, B., Blondeau, N., Henrion, D., Brau, F., Gounon, P., Guy, N., Heurteaux, C., Lazdunski, M., & Saumet, J. L. 2007. Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. *EMBO Rep*, **8**(4), 354–9.
- Ge, Yubin, Haska, Christina L, LaFiura, Katherine, Devidas, Meenakshi, Linda, Stephen B, Liu, Mingjun, Thomas, Ronald, Taub, Jeffrey W, & Matherly, Larry H. 2007. Prognostic role of the reduced folate carrier, the major membrane transporter for methotrexate, in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res*, **13**(2 Pt 1), 451–457.
- Gebremedhin, D., Lange, A. R., Lowry, T. F., Taheri, M. R., Birks, E. K., Hudetz, A. G., Narayanan, J., Falck, J. R., Okamoto, H., Roman, R. J., Nithipatikom, K., Campbell, W. B., & Harder, D. R. 2000. Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. *Circ Res*, **87**(1), 60–65.
- Gisbert, Regina, Ziani, Khalid, Miquel, Raquel, Noguera, M. Antonia, Ivorra, M. Dolores, Anselmi, Elsa, & D'Ocon, Pilar. 2002. Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, **135**(1), 206–216.
- Gong, M. C., Fujihara, H., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. 1997. Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem*, **272**(16), 10704–10709.
- Goyal, Ravi, Mittal, Ashwani, Chu, Nina, Zhang, Lubo, & Longo, Lawrence D. 2010. alpha(1)-Adrenergic receptor subtype function in fetal and adult cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **298**(6), H1797–H1806.
- Graham, R. M., Perez, D. M., Hwa, J., & Piascik, M. T. 1996. alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res*, **78**(5), 737–749.
- Gschwend, S., Henning, R. H., Pinto, Y. M., de Zeeuw, D., van Gilst, W. H., & Buikema, H. 2003. Myogenic constriction is increased in mesenteric resistance arteries from rats with chronic heart failure: instantaneous counteraction by acute AT1 receptor blockade. *Br J Pharmacol*, **139**(7), 1317–25.
- Gudi, S., Nolan, J. P., & Frangos, J. A. 1998a. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(5), 2515–2519.
- Gudi, S. R., Lee, A. A., Clark, C. B., & Frangos, J. A. 1998b. Equibiaxial strain and strain rate stimulate early activation of G proteins in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol*, **274**(5 Pt 1), C1424–C1428.
- Guimaraes, S., & Pinheiro, H. 2005. Functional evidence that in the cardiovascular system AT1 angiotensin II receptors are AT1B prejunctionally and AT1A postjunctionally. *Cardiovasc Res*, **67**(2), 208–15.

- Gustafsson, D. 1987. Microvascular mechanisms involved in calcium antagonist edema formation. *J Cardiovasc Pharmacol*, **10 Suppl 1**, S121–S131.
- Hamill, O. P. 2006. Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflugers Arch*, **453**(3), 333–351.
- Handy, D. E., Johns, C., Bresnahan, M. R., Tavares, A., Bursztyn, M., & Gavras, H. 1998. Expression of alpha2-adrenergic receptors in normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Hypertension*, **32**(2), 311–317.
- Hansen, Frank H, Øyvind B Vågnes, & Iversen, Bjarne M. 2005. Enhanced response to AVP in the interlobular artery from the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Renal Physiol*, **288**(5), F1023–F1031.
- Harada, K., Komuro, I., Sugaya, T., Murakami, K., & Yazaki, Y. 1999. Vascular injury causes neointimal formation in angiotensin II type 1a receptor knockout mice. *Circ Res*, **84**(2), 179–185.
- Harder, D. R. 1984. Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circ Res*, **55**(2), 197–202.
- Harder, D. R. 1987. Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependent on intact endothelium. *Circ Res*, **60**(1), 102–107.
- Harder, David R, Narayanan, Jayashree, & Gebremedhin, Debebe. 2011. Pressure-induced myogenic tone and role of 20-HETE in mediating autoregulation of cerebral blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **300**(5), H1557–H1565.
- Harrison, J. K., Pearson, W. R., & Lynch, K. R. 1991. Molecular characterization of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. *Trends Pharmacol Sci*, **12**(2), 62–67.
- Hawtin, Stuart R. 2006. Pharmacological chaperone activity of SR49059 to functionally recover misfolded mutations of the vasopressin V1a receptor. *J Biol Chem*, **281**(21), 14604–14614.
- Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J., & Kobilka, B. K. 1995. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature*, **377**(6551), 744–747.
- Hein, L., Altman, J. D., & Kobilka, B. K. 1999. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*, **402**(6758), 181–184.
- Henrion, D., Terzi, F., Matrougui, K., Duriez, M., Boulanger, C. M., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Briand, P., Friedlander, G., Poitevin, P., & Levy, B. I. 1997. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest*, **100**(11), 2909–14.
- Henriques, Tracy, Zhang, Xuan, Yiannikouris, Frederique B, Daugherty, Alan, & Cassis, Lisa A. 2008. Androgen increases AT1a receptor expression in abdominal aortas to promote angiotensin II-induced AAAs in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**(7), 1251–1256.
- Hieble, J. P., Bylund, D. B., Clarke, D. E., Eikenburg, D. C., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., & Ruffolo, R. R. 1995. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev*, **47**(2), 267–270.

- Hill, M. A., Falcone, J. C., & Meininger, G. A. 1990. Evidence for protein kinase C involvement in arteriolar myogenic reactivity. *Am J Physiol*, **259**(5 Pt 2), H1586–94.
- Hill, M. A., Davis, M. J., Song, J., & Zou, H. 1996. Calcium dependence of indolactam-mediated contractions in resistance vessels. *J Pharmacol Exp Ther*, **276**(3), 867–874.
- Hill, M. A., Meininger, G. A., Davis, M. J., & Laher, I. 2009. Therapeutic potential of pharmacologically targeting arteriolar myogenic tone. *Trends Pharmacol Sci*, **30**(7), 363–74.
- Hill, Michael A, Yang, Yan, Ella, Srikanth R, Davis, Michael J, & Braun, Andrew P. 2010. Large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling. *FEBS Lett*, **584**(10), 2033–2042.
- Hirasawa, A., Shibata, K., Kotosai, K., & Tsujimoto, G. 1994a. Cloning, functional expression and tissue distribution of human cDNA for the vascular-type vasopressin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **203**(1), 72–9.
- Hirasawa, A., Hashimoto, K., & Tsujimoto, G. 1994b. Distribution and developmental change of vasopressin V1A and V2 receptor mRNA in rats. *Eur J Pharmacol*, **267**(1), 71–75.
- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, **397**(6716), 259–63.
- Holmes, Cheryl L, Landry, Donald W, & Granton, John T. 2003. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1–receptor physiology. *Crit Care*, **7**(6), 427–434.
- Hosoda, Chihiro, Tanoue, Akito, Shibano, Mari, Tanaka, Yoshio, Hiroyama, Masami, aki Koshimizu, Taka, Cotecchia, Susanna, Kitamura, Tadaichi, Tsujimoto, Gozoh, & Koike, Katsuo. 2005. Correlation between vasoconstrictor roles and mRNA expression of alpha1-adrenoceptor subtypes in blood vessels of genetically engineered mice. *Br J Pharmacol*, **146**(3), 456–466.
- Hrometz, S. L., Edelmann, S. E., McCune, D. F., Olges, J. R., Hadley, R. W., Perez, D. M., & Piascik, M. T. 1999. Expression of multiple alpha1-adrenoceptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction. *J Pharmacol Exp Ther*, **290**(1), 452–463.
- Hwa, J. J., & Bevan, J. A. 1986. Stretch-dependent (myogenic) tone in rabbit ear resistance arteries. *Am J Physiol*, **250**(1 Pt 2), H87–H95.
- Iaccarino, Guido, Cipolletta, Ersilia, Fiorillo, Antonia, Anneschiarico, Mario, Ciccarelli, Michele, Cimini, Vincenzo, Koch, Walter J, & Trimarco, Bruno. 2002. Beta(2)-adrenergic receptor gene delivery to the endothelium corrects impaired adrenergic vasorelaxation in hypertension. *Circulation*, **106**(3), 349–355.
- Iglarz, M., Matrougui, K., Levy, B. I., & Henrion, D. 1998. Chronic blockade of endothelin ETA receptors improves flow dependent dilation in resistance arteries of hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, **39**(3), 657–64.

- Ihara, M., Noguchi, K., Saeki, T., Fukuroda, T., Tsuchida, S., Kimura, S., Fukami, T., Ishikawa, K., Nishikibe, M., & Yano, M. 1992. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci*, **50**(4), 247–255.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyachi, T., Goto, K., & Masaki, T. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(8), 2863–2867.
- Inoue, R., Jensen, L. J., Jian, Z., Shi, J., Hai, L., Lurie, A. I., Henriksen, F. H., Salomonsson, M., Morita, H., Kawarabayashi, Y., Mori, M., Mori, Y., & Ito, Y. 2009. Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/diacylglycerol and phospholipase A2/omega-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circ Res*, **104**(12), 1399–409.
- Inscho, Edward W, Cook, Anthony K, Webb, R. Clinton, & Jin, Li-Ming. 2009. Rho-kinase inhibition reduces pressure-mediated autoregulatory adjustments in afferent arteriolar diameter. *Am J Physiol Renal Physiol*, **296**(3), F590–F597.
- Ishiguro, Masanori, Puryear, Corey B, Bisson, Erica, Saundry, Christine M, Nathan, David J, Russell, Sheila R, Tranmer, Bruce I, & Wellman, George C. 2002. Enhanced myogenic tone in cerebral arteries from a rabbit model of subarachnoid hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**(6), H2217–H2225.
- Jarajapu, Yagna P R, & Knot, Harm J. 2005. Relative contribution of Rho kinase and protein kinase C to myogenic tone in rat cerebral arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**(5), H1917–H1922.
- Jard, S., Gaillard, R. C., Guillon, G., Marie, J., Schoenenberg, P., Muller, A. F., Manning, M., & Sawyer, W. H. 1986. Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptor in the rat adenohypophysis. *Mol Pharmacol*, **30**(2), 171–177.
- Jernigan, Nikki L, & Drummond, Heather A. 2005. Vascular ENaC proteins are required for renal myogenic constriction. *Am J Physiol Renal Physiol*, **289**(4), F891–F901.
- Johnson, P. C., & Intaglietta, M. 1976. Contributions of pressure and flow sensitivity to autoregulation in mesenteric arterioles. *Am J Physiol*, **231**(6), 1686–1698.
- Johnson, Rosalyn P, El-Yazbi, Ahmed F, Takeya, Kosuke, Walsh, Emma J, Walsh, Michael P, & Cole, William C. 2009. Ca²⁺ sensitization via phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit at threonine-855 by Rho kinase contributes to the arterial myogenic response. *J Physiol*, **587**(Pt 11), 2537–2553.
- Jones, S. B., Halenda, S. P., & Bylund, D. B. 1991. 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**(2), 239–245.

- Juliano, R. L. 2002. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **42**, 283–323.
- Kaidi, S., Brutel, F., Van Deun, F., Kramer, K., Remie, R., Dewe, W., Remusat, P., Delaunois, A., & Depelchin, O. 2007. Comparison of two methods (left carotid artery and abdominal aorta) for surgical implantation of radiotelemetry devices in CD-1 mice. *Lab Anim*, **41**(3), 388–402.
- Kakar, S. S., Sellers, J. C., Devor, D. C., Musgrove, L. C., & Neill, J. D. 1992. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **183**(3), 1090–1096.
- Kakinuma, Y., Fogo, A., Inagami, T., & Ichikawa, I. 1993. Intrarenal localization of angiotensin II type 1 receptor mRNA in the rat. *Kidney Int*, **43**(6), 1229–1235.
- Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T., & Inagami, T. 1993. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem*, **268**(33), 24543–24546.
- Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K., Harada, K., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K. J., & Sato, K. 1997. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*, **49**(2), 157–230.
- Katusic, Z. S., Shepherd, J. T., & Vanhoutte, P. M. 1987. Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries. *Am J Physiol*, **252**(3 Pt 2), H671–H673.
- Kauffenstein, G., Drouin, A., Thorin-Trescases, N., Bachelard, H., Robaye, B., D'Orleans-Juste, P., Marceau, F., Thorin, E., & Sevigny, J. 2010. NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. *Cardiovasc Res*, **85**(1), 204–13.
- Kauffenstein, Gilles, Laher, Ismail, Matrougui, Khalid, Guéroux, Nathalie C, & Henrion, Daniel. 2012. Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. *Cardiovasc Res*, May.
- Keller, Matthias, Lidington, Darcy, Vogel, Lukas, Peter, Bernhard Friedrich, Sohn, Hae-Young, Pagano, Patrick J, Pitson, Stuart, Spiegel, Sarah, Pohl, Ulrich, & Bolz, Steffen-Sebastian. 2006. Sphingosine kinase functionally links elevated transmural pressure and increased reactive oxygen species formation in resistance arteries. *FASEB J*, **20**(6), 702–704.
- Ketsawatsomkron, Pimonrat, Lorca, Ramón A, Keen, Henry L, Weatherford, Eric T, Liu, Xuebo, Pelham, Christopher J, Grobe, Justin L, Faraci, Frank M, England, Sarah K, & Sigmund, Curt D. 2012. PPAR γ Regulates Resistance Vessel Tone Through a Mechanism Involving RGS5-Mediated Control of PKC and BKCa Channel Activity. *Circ Res*, Sep.
- Kitami, Y., Okura, T., Marumoto, K., Wakamiya, R., & Hiwada, K. 1992. Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, **188**(1), 446–452.

- Klugbauer, Norbert, Marais, Else, & Hofmann, Franz. 2003. Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr*, **35**(6), 639–647.
- Knot, H. J., & Nelson, M. T. 1998. Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol*, **508 (Pt 1)**, 199–209.
- Kobayashi, T., Miyauchi, T., Iwasa, S., Sakai, S., Fan, J., Nagata, M., Goto, K., & Watanabe, T. 2000. Corresponding distributions of increased endothelin-B receptor expression and increased endothelin-1 expression in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice with advanced atherosclerosis. *Pathol Int*, **50**(12), 929–36.
- Kobayashi, Tsuneo, Matsumoto, Takayuki, Ooishi, Kazuyuki, & Kamata, Katsuo. 2004. Differential expression of alpha2D-adrenoceptor and eNOS in aortas from early and later stages of diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **287**(1), H135–H143.
- Kobilka, B. K., Matsui, H., Kobilka, T. S., Yang-Feng, T. L., Francke, U., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Regan, J. W. 1987. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science*, **238**(4827), 650–656.
- Kojima, M., Shiojima, I., Yamazaki, T., Komuro, I., Zou, Z., Wang, Y., Mizuno, T., Ueki, K., Tobe, K., & Kadowaki, T. 1994. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation*, **89**(5), 2204–2211.
- Koltsova, S. V., Maximov, G. V., Kotelevtsev, S. V., Lavoie, J. L., Tremblay, J., Grygorczyk, R., Hamet, P., & Orlov, S. N. 2009. Myogenic tone in mouse mesenteric arteries: evidence for P2Y receptor-mediated, Na(+), K (+), 2Cl (-) cotransport-dependent signaling. *Purinergic Signal*, **5**(3), 343–9.
- Kozasa, T., & Gilman, A. G. 1995. Purification of recombinant G proteins from Sf9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. Characterization of alpha 12 and inhibition of adenylyl cyclase by alpha z. *J Biol Chem*, **270**(4), 1734–1741.
- Kristiansen, Kurt. 2004. 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**(1), 21–80.
- Kuc, R. E., Maguire, J. J., & Davenport, A. P. 2006. Quantification of endothelin receptor subtypes in peripheral tissues reveals downregulation of ET(A) receptors in ET(B)-deficient mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, **231**(6), 741–5.
- Kung, C. 2005. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*, **436**(7051), 647–54.
- Kuo, L., Chilian, W. M., & Davis, M. J. 1990. Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium. *Circ Res*, **66**(3), 860–866.
- Laher, I., & Bevan, J. A. 1987. Protein kinase C activation selectively augments a stretch-induced, calcium-dependent tone in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, **242**(2), 566–72.

- Lai, En Yin, Wellstein, Anton, Welch, William J, & Wilcox, Christopher S. 2011. Superoxide Modulates Myogenic Contractions of Mouse Afferent Arterioles. *Hypertension*, Aug.
- Lakhlani, P. P., Amenta, F., Napoleone, P., Felici, L., & Eikenburg, D. C. 1994. Pharmacological characterization and anatomical localization of prejunctional beta-adrenoceptors in the rat kidney. *Br J Pharmacol*, **111**(4), 1296–1308.
- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P., & Brown, T. G. 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, **214**(5088), 597–598.
- Langer, S. Z. 1974. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol*, **23**(13), 1793–1800.
- Langer, S. Z. 1999. History and nomenclature of alpha1-adrenoceptors. *Eur Urol*, **36 Suppl 1**, 2–6.
- Lanier, S. M., Downing, S., Duzic, E., & Homcy, C. J. 1991. Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the alpha 2-adrenergic receptor. Identification of a unique receptor subtype. *J Biol Chem*, **266**(16), 10470–10478.
- Lavhale, Manish S, Briyal, Seema, Parikh, Niket, & Gulati, Anil. 2010. Endothelin modulates the cardiovascular effects of clonidine in the rat. *Pharmacol Res*, **62**(6), 489–499.
- Leather, H. Alex, Segers, Patrick, Berends, Noor, Vandermeersch, Eugène, & Wouters, Patrick F. 2002. Effects of vasopressin on right ventricular function in an experimental model of acute pulmonary hypertension. *Crit Care Med*, **30**(11), 2548–2552.
- Lee, T. W., Cotecchia, S., & Milligan, G. 1997. Up-regulation of the levels of expression and function of a constitutively active mutant of the hamster alpha1B-adrenoceptor by ligands that act as inverse agonists. *Biochem J*, **325 (Pt 3)**(Aug), 733–739.
- Lehtonen, J. Y., & Kinnunen, P. K. 1995. Phospholipase A2 as a mechanosensor. *Biophys J*, **68**(5), 1888–1894.
- Li, Q., Pfaffendorf, M., & van Zwieten, P. A. 2001. Different types of antagonism by losartan and irbesartan on the effects of angiotensin II and its degradation products in rabbit arteries. *Fundam Clin Pharmacol*, **15**(2), 143–150.
- Lindstedt, Isak, Xu, Cang-Bao, Zhang, Yaping, & Edvinsson, Lars. 2009. Increased perfusion pressure enhances the expression of endothelin (ETB) and angiotensin II (AT1, AT2) receptors in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Blood Press*, **18**(1-2), 78–85.
- Link, R. E., Desai, K., Hein, L., Stevens, M. E., Chruscinski, A., Bernstein, D., Barsh, G. S., & Kobilka, B. K. 1996. Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science*, **273**(5276), 803–805.
- Liu, J., Hill, M. A., & Meininger, G. A. 1994. Mechanisms of myogenic enhancement by norepinephrine. *Am J Physiol*, **266**(2 Pt 2), H440–H446.

- Llorens-Cortes, C., Greenberg, B., Huang, H., & Corvol, P. 1994. Tissue expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Hypertension*, **24**(5), 538–548.
- Lolait, S. J., O'Carroll, A. M., McBride, O. W., Konig, M., Morel, A., & Brownstein, M. J. 1992. Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature*, **357**(6376), 336–339.
- Lomasney, J. W., Lorenz, W., Allen, L. F., King, K., Regan, J. W., Yang-Feng, T. L., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. 1990. Expansion of the alpha 2-adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human alpha 2-adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(13), 5094–5098.
- Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W. Y., Schwinn, D. A., Yang-Feng, T. L., Brownstein, M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. 1991. Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J Biol Chem*, **266**(10), 6365–6369.
- Loutzenhiser, Rodger, Griffin, Karen, Williamson, Geoffrey, & Bidani, Anil. 2006. Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290**(5), R1153–R1167.
- MacDonald, A., McLean, M., MacAulay, L., & Shaw, A. M. 1999. Effects of propranolol and L-NAME on beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat carotid artery. *J Auton Pharmacol*, **19**(3), 145–149.
- MacLean, M. R., McCulloch, K. M., & McGrath, J. C. 1993. Influences of the endothelium and hypoxia on alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor-mediated responses in the rabbit isolated pulmonary artery. *Br J Pharmacol*, **108**(1), 155–161.
- MacPherson, R. D., McLeod, L. J., & Rasiah, R. L. 1991. Myogenic response of isolated pressurized rabbit ear artery is independent of endothelium. *Am J Physiol*, **260**(3 Pt 2), H779–H784.
- Maddahi, Aida, & Edvinsson, Lars. 2008. Enhanced expressions of microvascular smooth muscle receptors after focal cerebral ischemia occur via the MAPK MEK/ERK pathway. *BMC Neurosci*, **9**, 85.
- Maguire, J. J., & Davenport, A. P. 1995. ETA receptor-mediated constrictor responses to endothelin peptides in human blood vessels in vitro. *Br J Pharmacol*, **115**(1), 191–197.
- Maguire, J. J., Kuc, R. E., O'Reilly, G., & Davenport, A. P. 1994. Vasoconstrictor endothelin receptors characterized in human renal artery and vein in vitro. *Br J Pharmacol*, **113**(1), 49–54.
- Makino, Ayako, Prossnitz, Eric R, Bünemann, Moritz, Wang, Ji Ming, Yao, Weijuan, & Schmid-Schönbein, Geert W. 2006. G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**(6), C1633–C1639.

- Martin, M. M., White, C. R., Li, H., Miller, P. J., & Elton, T. S. 1995. A functional comparison of the rat type-1 angiotensin II receptors (AT1AR and AT1BR). *Regul Pept*, **60**(2-3), 135–147.
- Martinez-Lemus, Luis A, Crow, Tracy, Davis, Michael J, & Meininger, Gerald A. 2005. alphavbeta3- and alpha5beta1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of skeletal muscle resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**(1), H322–H329.
- Martínez-Revelles, S., Caracuel, L., Márquez-Martín, A., Dantas, A. P., Oliver, E., D'Ocon, P., & Vila, E. 2011. Increased endothelin-1 vasoconstriction in mesenteric resistance arteries after superior mesenteric ischemia-reperfusion. *Br J Pharmacol*, Aug.
- Maybauer, Marc O, Maybauer, Dirk M, Enkhbaatar, Perenlei, & Traber, Daniel L. 2008. Physiology of the vasopressin receptors. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, **22**(2), 253–263.
- McCarron, J. G., Osol, G., & Halpern, W. 1989. Myogenic responses are independent of the endothelium in rat pressurized posterior cerebral arteries. *Blood Vessels*, **26**(5), 315–319.
- McCarron, J. G., Crichton, C. A., Langton, P. D., MacKenzie, A., & Smith, G. L. 1997. Myogenic contraction by modulation of voltage-dependent calcium currents in isolated rat cerebral arteries. *J Physiol*, **498** (Pt 2)(Jan), 371–379.
- McQueen, J., Murray, G. D., & Semple, P. F. 1984. Identification of the angiotensin II receptor in rat mesenteric artery. *Biochem J*, **223**(3), 659–671.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Essin, K., Gollasch, M., & Gudermann, T. 2008. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J*, **27**(23), 3092–103.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., & Gudermann, T. 2011. AT1 receptors as mechanosensors. *Curr Opin Pharmacol*, **11**(2), 112–116.
- Medina, P., Vila, J. M., Martinez, M. C., Aldasoro, M., Chuan, P., & Lluch, S. 1996. Effects of vasopressin on human renal arteries. *Eur J Clin Invest*, **26**(11), 966–972.
- Meininger, G. A., & Davis, M. J. 1992. Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response. *Am J Physiol*, **263**(3 Pt 2), H647–H659.
- Michell, R. H., Kirk, C. J., & Billah, M. M. 1979. Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin. *Biochem Soc Trans*, **7**(5), 861–865.
- Michelotti, G. A., Price, D. T., & Schwinn, D. A. 2000. Alpha 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol Ther*, **88**(3), 281–309.
- Mickley, E. J., Gray, G. A., & Webb, D. J. 1997. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*, **120**(7), 1376–1382.

- Miller, J. W., Hu, Z. W., Okazaki, M., Fujinaga, M., & Hoffman, B. B. 1996. Expression of alpha 1 adrenergic receptor subtype mRNAs in the rat cardiovascular system with aging. *Mech Ageing Dev*, **87**(2), 75–89.
- Miura, Shin-Ichiro, Saku, Keijiro, & Karnik, Sadashiva S. 2003. Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertens Res*, **26**(12), 937–943.
- Mizuno, M., Sada, T., Ikeda, M., Fukuda, N., Miyamoto, M., Yanagisawa, H., & Koike, H. 1995. Pharmacology of CS-866, a novel nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, **285**(2), 181–188.
- Molderings, G. J., & Göthert, M. 1995. Subtype determination of presynaptic alpha 2-autoreceptors in the rabbit pulmonary artery and human saphenous vein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **352**(5), 483–490.
- Monczor, Federico, Fernandez, Natalia, Legnazzi, Bibiana Lemos, Riveiro, Maria Eugenia, Baldi, Alberto, Shayo, Carina, & Davio, Carlos. 2003. Tiotidine, a histamine H2 receptor inverse agonist that binds with high affinity to an inactive G-protein-coupled form of the receptor. Experimental support for the cubic ternary complex model. *Mol Pharmacol*, **64**(2), 512–520.
- Monge, Luis, Fernández, Nuria, Salcedo, Adely, García-Villalón, Angel Luis, & Diéguez, Godofredo. 2010. Role of alpha-adrenoceptors and prostacyclin in the enhanced adrenergic reactivity of goat cerebral arteries after ischemia-reperfusion. *Brain Res*, **1346**(Jul), 121–131.
- Morel, A., O'Carroll, A. M., Brownstein, M. J., & Lolait, S. J. 1992. Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature*, **356**(6369), 523–526.
- Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Tobe, K., Ueki, K., Kikuchi, K., Takehara, K., Kadowaki, T., Yazaki, Y., & Nojima, Y. 1995. Matrix/integrin interaction activates the mitogen-activated protein kinase, p44erk-1 and p42erk-2. *J Biol Chem*, **270**(1), 269–273.
- Morita, H., Cousins, H., Onoue, H., Ito, Y., & Inoue, R. 1999. Predominant distribution of nifedipine-insensitive, high voltage-activated Ca²⁺ channels in the terminal mesenteric artery of guinea pig. *Circ Res*, **85**(7), 596–605.
- Morrow, A. L., & Creese, I. 1986. Characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3H]WB4104 and [3H]prazosin binding. *Mol Pharmacol*, **29**(4), 321–330.
- Morsing, P., Adler, G., Brandt-Eliasson, U., Karp, L., Ohlson, K., Renberg, L., Sjöquist, P. O., & Abrahamsson, T. 1999. Mechanistic differences of various AT1-receptor blockers in isolated vessels of different origin. *Hypertension*, **33**(6), 1406–1413.
- Mulder, P., Compagnon, P., Devaux, B., Richard, V., Henry, J. P., Elfertak, L., Wimart, M. C., Thibout, E., Comoy, E., Macé, B., & Thuillez, C. 1997. Response of large and small vessels to alpha and beta adrenoceptor stimulation in heart failure: effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Fundam Clin Pharmacol*, **11**(3), 221–230.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263–273.
- Murphy, Timothy V, Spurrell, Brian E, & Hill, Michael A. 2002. Cellular signalling in arteriolar myogenic constriction: involvement of tyrosine phosphorylation pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **29(7)**, 612–619.
- Naik, J. S., Earley, S., Resta, T. C., & Walker, B. R. 2005. Pressure-induced smooth muscle cell depolarization in pulmonary arteries from control and chronically hypoxic rats does not cause myogenic vasoconstriction. *J Appl Physiol*, **98(3)**, 1119–24.
- Nankervis, C. A., Dunaway, D. J., & Nowicki, P. T. 2001. Determinants of terminal mesenteric artery resistance during the first postnatal month. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **280(4)**, G678–86.
- Narayanan, J., Imig, M., Roman, R. J., & Harder, D. R. 1994. Pressurization of isolated renal arteries increases inositol trisphosphate and diacylglycerol. *Am J Physiol*, **266(5 Pt 2)**, H1840–H1845.
- Neubig, Richard R, Spedding, Michael, Kenakin, Terry, Christopoulos, Arthur, of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature, International Union, & Classification, Drug. 2003. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev*, **55(4)**, 597–606.
- Nguyen, T. D., Vequaud, P., & Thorin, E. 1999. Effects of endothelin receptor antagonists and nitric oxide on myogenic tone and alpha-adrenergic-dependent contractions of rabbit resistance arteries. *Cardiovasc Res*, **43(3)**, 755–61.
- Nilsson, T., Cantera, L., Adner, M., & Edvinsson, L. 1997. Presence of contractile endothelin-A and dilatory endothelin-B receptors in human cerebral arteries. *Neurosurgery*, **40(2)**, 346–51; discussion 351–3.
- Nishimura, Y., Xu, T., Jöhren, O., Häuser, W., & Saavedra, J. M. 1998. The angiotensin AT1 receptor antagonist CV-11974 regulates cerebral blood flow and brain angiotensin AT1 receptor expression. *Basic Res Cardiol*, **93 Suppl 2**, 63–68.
- Nowicki, P. T., Flavahan, S., Hassanain, H., Mitra, S., Holland, S., Goldschmidt-Clermont, P. J., & Flavahan, N. A. 2001. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ Res*, **89(2)**, 114–116.
- O'Connell, Timothy D, Ishizaka, Shinji, Nakamura, Akihiro, Swigart, Philip M, Rodrigo, M. C., Simpson, Gregory L, Cotecchia, Susanna, Rokosh, D. Gregg, Grossman, William, Foster, Elyse, & Simpson, Paul C. 2003. The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest*, **111(11)**, 1783–1791.
- Ohgushi, M., Yasue, H., Kugiyama, K., Murohara, T., & Sakaino, N. 1993. Contraction and endothelium dependent relaxation via alpha adrenoceptors are variable in various pig arteries. *Cardiovasc Res*, **27(5)**, 779–784.

- Oliver, Eduardo, Martí, Daniel, Montó, Fermí, Flacco, Nicla, Moreno, Lucrecia, Baretino, Domingo, Ivorra, M. Dolores, & D'Ocon, Pilar. 2009. The impact of alpha1-adrenoceptors up-regulation accompanied by the impairment of beta-adrenergic vasodilatation in hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*, **328**(3), 982–990.
- Oliverio, M. I., Best, C. F., Kim, H. S., Arendshorst, W. J., Smithies, O., & Coffman, T. M. 1997. Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *Am J Physiol*, **272**(4 Pt 2), F515–20.
- Osol, G., Laher, I., & Cipolla, M. 1991. Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation. *Circ Res*, **68**(2), 359–367.
- Osol, G., Laher, I., & Kelley, M. 1993. Myogenic tone is coupled to phospholipase C and G protein activation in small cerebral arteries. *Am J Physiol*, **265**(1 Pt 2), H415–H420.
- Osol, George, Brekke, Johan Fredrik, McElroy-Yaggy, Keara, & Gokina, Natalia I. 2002. Myogenic tone, reactivity, and forced dilatation: a three-phase model of in vitro arterial myogenic behavior. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**(6), H2260–H2267.
- Owen, M. P. 1993. Functional characterization of alpha adrenoceptors on rabbit intrarenal arteries in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, **265**(2), 807–812.
- Owens, G. K. 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, **75**(3), 487–517.
- Ozaki, N., Kawakita, S., & Toda, N. 1982. Effects of dobutamine on isolated canine cerebral, coronary, mesenteric, and renal arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, **4**(3), 456–461.
- Parnot, C., Bardin, S., Miserey-Lenkei, S., Guedin, D., Corvol, P., & Clauser, E. 2000. Systematic identification of mutations that constitutively activate the angiotensin II type 1A receptor by screening a randomly mutated cDNA library with an original pharmacological bioassay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(13), 7615–7620.
- Peach, M. J., & Dostal, D. E. 1990. The angiotensin II receptor and the actions of angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol*, **16 Suppl 4**, S25–S30.
- Peirson, S. N., Butler, J. N., & Foster, R. G. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res*, **31**(14), e73.
- Perez, D. M., Piascik, M. T., & Graham, R. M. 1991. Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. *Mol Pharmacol*, **40**(6), 876–883.
- Pernomian, Larissa, Gomes, Mayara Santos, Restini, Carolina Baraldi Araujo, Ramalho, Leandra Naira Zambelli, Tirapelli, Carlos Renato, & de Oliveira, Ana Maria. 2012. The role of reactive oxygen species in the modulation of the contraction induced by angiotensin II in carotid artery from diabetic rat. *Eur J Pharmacol*, **678**(1-3), 15–25.

- Persson, Björn P, Boels, Piet J M, Lövdahl, Cecilia, Rossi, Patrik, Arner, Anders, & Oldner, Anders. 2011. Endotoxin induces differentiated contractile responses in porcine pulmonary arteries and veins. *J Vasc Res*, **48**(3), 206–218.
- Phillips, J. K., Vidovic, M., & Hill, C. E. 1997. Variation in mRNA expression of alpha-adrenergic, neurokinin and muscarinic receptors amongst four arteries of the rat. *J Auton Nerv Syst*, **62**(1-2), 85–93.
- Phillips, P. A., Abrahams, J. M., Kelly, J. M., Mooser, V., Trinder, D., & Johnston, C. I. 1990. Localization of vasopressin binding sites in rat tissues using specific V1 and V2 selective ligands. *Endocrinology*, **126**(3), 1478–1484.
- Piasecki, M. T., Guarino, R. D., Smith, M. S., Soltis, E. E., Saussy, D. L., & Perez, D. M. 1995. The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**(3), 1583–1589.
- Piasecki, M. T., Hrometz, S. L., Edelmann, S. E., Guarino, R. D., Hadley, R. W., & Brown, R. D. 1997. Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther*, **283**(2), 854–868.
- Platts, S. H., Falcone, J. C., Holton, W. T., Hill, M. A., & Meininger, G. A. 1999. Alteration of microtubule polymerization modulates arteriolar vasomotor tone. *Am J Physiol*, **277**(1 Pt 2), H100–H106.
- Qin, Yingjie, Yasuda, Noritaka, Akazawa, Hiroshi, Ito, Kaoru, Kudo, Yoko, Liao, Chien-Hui, Yamamoto, Rie, Miura, Shin-Ichiro, Saku, Keiji, & Komuro, Issei. 2009. Multivalent ligand-receptor interactions elicit inverse agonist activity of AT(1) receptor blockers against stretch-induced AT(1) receptor activation. *Hypertens Res*, **32**(10), 875–883.
- Radel, Chris, Carlisle-Klusacek, Maryellen, & Rizzo, Victor. 2007. Participation of caveolae in beta1 integrin-mediated mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun*, **358**(2), 626–631.
- Rakesh, Kriti, Yoo, ByungSu, Kim, Il-Man, Salazar, Natasha, Kim, Ki-Seok, & Rockman, Howard A. 2010. beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Sci Signal*, **3**(125), ra46.
- Regan, J. W., Kobilka, T. S., Yang-Feng, T. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Kobilka, B. K. 1988. Cloning and expression of a human kidney cDNA for an alpha 2-adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(17), 6301–6305.
- Regard, Jean B, Sato, Isaac T, & Coughlin, Shaun R. 2008. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell*, **135**(3), 561–571.
- Resch, M., Wiest, R., Moleda, L., Fredersdorf, S., Stoelcker, B., Schroeder, J. A., Scholmerich, J., & Endemann, D. H. 2009. Alterations in mechanical properties of mesenteric resistance arteries in experimental portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **297**(4), G849–57.

- Riechers, H., Albrecht, H. P., Amberg, W., Baumann, E., Bernard, H., Böhm, H. J., Klinge, D., Kling, A., Müller, S., Raschack, M., Unger, L., Walker, N., & Wernet, W. 1996. Discovery and optimization of a novel class of orally active nonpeptidic endothelin-A receptor antagonists. *J Med Chem*, **39**(11), 2123–2128.
- Rieg, Annette D, Rossaint, Rolf, Uhlig, Stefan, & Martin, Christian. 2011. Cardiovascular agents affect the tone of pulmonary arteries and veins in precision-cut lung slices. *PLoS One*, **6**(12), e29698.
- Rossier, O., Abuin, L., Fanelli, F., Leonardi, A., & Cotecchia, S. 1999. Inverse agonism and neutral antagonism at alpha(1a)- and alpha(1b)-adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol*, **56**(5), 858–866.
- Ruan, X., Wagner, C., Chatziantoniou, C., Kurtz, A., & Arendshorst, W. J. 1997. Regulation of angiotensin II receptor AT1 subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet. *J Clin Invest*, **99**(5), 1072–1081.
- Ruan, X., Oliverio, M. I., Coffman, T. M., & Arendshorst, W. J. 1999. Renal vascular reactivity in mice: AngII-induced vasoconstriction in AT1A receptor null mice. *J Am Soc Nephrol*, **10**(12), 2620–2630.
- Rubanyi, G. M. 1988. Endothelium-dependent pressure-induced contraction of isolated canine carotid arteries. *Am J Physiol*, **255**(4 Pt 2), H783–H788.
- Rudner, X. L., Berkowitz, D. E., Booth, J. V., Funk, B. L., Cozart, K. L., D'Amico, E. B., El-Moalem, H., Page, S. O., Richardson, C. D., Winters, B., Marucci, L., & Schwinn, D. A. 1999. Subtype specific regulation of human vascular alpha(1)-adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation*, **100**(23), 2336–2343.
- Rump, L. C., Ruff, G., Wolk, V., & Schollmeyer, P. 1991. Alpha 2-adrenoceptor activation inhibits noradrenaline release in human and rabbit isolated renal arteries. *Eur J Pharmacol*, **196**(3), 277–283.
- Rutschmann, B., Evequoz, D., Aubert, J. F., Brunner, H. R., & Waeber, B. 1998. Vasopressin dilates the rat carotid artery by stimulating V1 receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*, **32**(4), 637–641.
- Saavedra, J. M. 1999. Emerging features of brain angiotensin receptors. *Regul Pept*, **85**(1), 31–45.
- Sachidanandam, Kamakshi, Elgebaly, Mostafa M, Harris, Alex K, Hutchinson, Jim R, Mezzetti, Erin M, Portik-Dobos, Vera, & Ergul, Adviye. 2008. Effect of chronic and selective endothelin receptor antagonism on microvascular function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **294**(6), H2743–H2749.
- Sachidanandam, Kamakshi, Hutchinson, Jim R, Elgebaly, Mostafa M, Mezzetti, Erin M, Wang, Mong-Heng, & Ergul, Adviye. 2009. Differential effects of diet-induced dyslipidemia and hyperglycemia on mesenteric resistance artery structure and function in type 2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*, **328**(1), 123–130.

- Sadoshima, S., Nagao, T., Ibayashi, S., & Fujishima, M. 1994. Inhibition of angiotensin-converting enzyme modulates the autoregulation of regional cerebral blood flow in hypertensive rats. *Hypertension*, **23**(6 Pt 1), 781–785.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**(4732), 1350–1354.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., & Masaki, T. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**(6303), 732–735.
- Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J. E., Pratt, R. E., Kobilka, B. K., & Dzau, V. J. 1992. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun*, **185**(1), 253–259.
- Sathishkumar, K., Ross, Gracious R, Prakash, Vellanki Ravi, & Mishra, Santosh K. 2006. Relative contribution of intracellular and extracellular Ca²⁺ to alpha2-adrenoceptor-mediated contractions of ovine pulmonary artery. *Pharmacol Res*, **54**(3), 219–225.
- Schneider, Markus P, Boesen, Erika I, & Pollock, David M. 2007. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **47**, 731–759.
- Schubert, Rudolf, Kalentchuk, Vjatcheslav U, & Krien, Ulrike. 2002. Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**(6), H2288–H2295.
- Schubert, Rudolf, Lidington, Darcy, & Bolz, Steffen-Sebastian. 2008. The emerging role of Ca²⁺ sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction. *Cardiovasc Res*, **77**(1), 8–18.
- Schwinn, D. A., Lomasney, J. W., Lorenz, W., Szklut, P. J., Fremeau, R. T., Yang-Feng, T. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Cotecchia, S. 1990. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem*, **265**(14), 8183–8189.
- Scotland, R. S., Chauhan, S., Vallance, P. J., & Ahluwalia, A. 2001. An endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor moderates myogenic constriction of mesenteric resistance arteries in the absence of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Hypertension*, **38**(4), 833–839.
- Seifert, Roland, & Wenzel-Seifert, Katharina. 2002. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **366**(5), 381–416.
- Shapira, M., Vogel, Z., & Sarne, Y. 2000. Opioid and cannabinoid receptors share a common pool of GTP-binding proteins in cotransfected cells, but not in cells which endogenously coexpress the receptors. *Cell Mol Neurobiol*, **20**(3), 291–304.

- Sharifi, A. M., & Schiffrin, E. L. 1996. Endothelin receptors mediating vasoconstriction in rat pressurized small arteries. *Can J Physiol Pharmacol*, **74**(8), 934–939.
- Shaul, P. W., Muntz, K. H., & Buja, L. M. 1990. Comparison of beta adrenergic receptor binding characteristics and coupling to adenylate cyclase in rat pulmonary artery versus aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, **252**(1), 86–92.
- Shimamoto, H., Bourreau, J. P., Kwan, C. Y., & Daniel, E. E. 1992. Amplification of alpha adrenergic vasoconstriction in canine isolated mesenteric artery and vein. *J Pharmacol Exp Ther*, **260**(3), 1119–1127.
- Shraga-Levine, Z., & Sokolovsky, M. 2000. Functional coupling of G proteins to endothelin receptors is ligand and receptor subtype specific. *Cell Mol Neurobiol*, **20**(3), 305–317.
- Siehler, Sandra. 2009. Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol*, **158**(1), 41–49.
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D., & Gabbiani, G. 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*, **103**(6 Pt 2), 2787–2796.
- Soma, S., Takahashi, H., Muramatsu, M., Oka, M., & Fukuchi, Y. 1999. Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **20**(4), 620–630.
- Somlyo, Andrew P, & Somlyo, Avril V. 2003. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, **83**(4), 1325–1358.
- Sonveaux, Pierre, Dessy, Chantal, Martinive, Philippe, Havaux, Xavier, Jordan, Bénédicte F, Gallez, Bernard, Grégoire, Vincent, Balligand, Jean-Luc, & Feron, Olivier. 2004. Endothelin-1 is a critical mediator of myogenic tone in tumor arterioles: implications for cancer treatment. *Cancer Res*, **64**(9), 3209–3214.
- Spurrell, Brian E, Murphy, Timothy V, & Hill, Michael A. 2003. Intraluminal pressure stimulates MAPK phosphorylation in arterioles: temporal dissociation from myogenic contractile response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **285**(4), H1764–H1773.
- Stam, W. B., der Graaf, P. H. Van, & Saxena, P. R. 1998. Characterization of receptors mediating contraction of the rat isolated small mesenteric artery and aorta to arginine vasopressin and oxytocin. *Br J Pharmacol*, **125**(4), 865–873.
- Stassen, F. R., Maas, R. G., Schiffers, P. M., Janssen, G. M., & Mey, J. G. De. 1998. A positive and reversible relationship between adrenergic nerves and alpha-1A adrenoceptors in rat arteries. *J Pharmacol Exp Ther*, **284**(1), 399–405.
- Storch, Ursula, y Schnitzler, Michael Mederos, & Gudermann, Thomas. 2012. G protein-mediated stretch reception. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **302**(6), H1241–H1249.

- Streefkerk, J. O., Pfaffendorf, M., & van Zwieten, P. A. 2003a. Endothelium-dependent, vasopressin-induced contractions in rabbit renal arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, **42**(6), 703–9.
- Streefkerk, J. O., Pfaffendorf, M., & van Zwieten, P. A. 2003b. Vasopressin-induced facilitation of adrenergic responses in the rat mesenteric artery is V1-receptor dependent. *Auton Autacoid Pharmacol*, **23**(1), 35–41.
- Su, Baogen Y, Reber, Kristina M, & Nankervis, Craig A. 2004. Developmental expression of endothelin receptors in postnatal swine mesenteric artery. *Pediatr Res*, **56**(3), 359–365.
- Su, Wan-Lin, Modrek, Barmak, GuhaThakurta, Debraj, Edwards, Stephen, Shah, Jyoti K, Kulkarni, Amit V, Russell, Archie, Schadt, Eric E, Johnson, Jason M, & Castle, John C. 2008. Exon and junction microarrays detect widespread mouse strain- and sex-bias expression differences. *BMC Genomics*, **9**, 273.
- Sugimoto, T., Saito, M., Mochizuki, S., Watanabe, Y., Hashimoto, S., & Kawashima, H. 1994. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. *J Biol Chem*, **269**(43), 27088–27092.
- Tan, L. M., & Sim, M. K. 2000. Actions of angiotensin peptides on the rabbit pulmonary artery. *Life Sci*, **66**(19), 1839–1847.
- Tanabe, Yoshiyuki, Morikawa, Yuki, Kato, Takao, Kanai, Satoshi, Watakabe, Taichi, Nishijima, Ami, Iwata, Hijiri, Isobe, Kaori, Ishizaki, Mayumi, & Nakayama, Koichi. 2006. Effects of olmesartan, an AT1 receptor antagonist, on hypoxia-induced activation of ERK1/2 and pro-inflammatory signals in the mouse lung. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **374**(3), 235–248.
- Tang, B., Ma, S., Yang, Y., Yang, D., Chen, J., Su, X., Tan, Y., Sun, M., & Li, D. 2011. Overexpression of angiotensin II type 2 receptor suppresses neointimal hyperplasia in a rat carotid arterial balloon injury model. *Mol Med Report*, **4**(2), 249–54.
- Tazawa, S., Nakane, T., & Chiba, S. 1999. Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents up-regulation of angiotensin II type 1A receptors in rat injured artery. *J Pharmacol Exp Ther*, **288**(2), 898–904.
- Tharaux, P. L., Chatziantoniou, C., Fakhouri, F., & Dussaule, J. C. 2000. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension*, **36**(3), 330–336.
- Thibonnier, M. 1992. Signal transduction of V1-vascular vasopressin receptors. *Regul Pept*, **38**(1), 1–11.
- Thorin, E., Huang, P. L., Fishman, M. C., & Bevan, J. A. 1998. Nitric oxide inhibits alpha2-adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilation. *Circ Res*, **82**(12), 1323–1329.
- Tian, Y., Baukal, A. J., Sandberg, K., Bernstein, K. E., Balla, T., & Catt, K. J. 1996. Properties of AT1a and AT1b angiotensin receptors expressed in adrenocortical Y-1 cells. *Am J Physiol*, **270**(5 Pt 1), E831–9.

- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A., & Smith, R. D. 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*, **45**(2), 205–251.
- Tirapelli, Carlos R, Casolari, Debora A, Yogi, Alvaro, Montezano, Augusto C, Tostes, Rita C, Legros, Eurode, D'Orléans-Juste, Pedro, & de Oliveira, Ana M. 2005. Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K⁺ channels in ETB-induced relaxation. *Br J Pharmacol*, **146**(6), 903–912.
- Toda, N., & Okamura, T. 1990. Beta adrenoceptor subtype in isolated human, monkey and dog epicardial coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther*, **253**(2), 518–524.
- Touyz, R. M., Endemann, D., He, G., Li, J. S., & Schiffrin, E. L. 1999. Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension*, **33**(1 Pt 2), 366–372.
- Tsukahara, T., Taniguchi, T., Shimohama, S., Fujiwara, M., & Handa, H. 1986. Characterization of beta adrenergic receptors in human cerebral arteries and alteration of the receptors after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, **17**(2), 202–207.
- Tubio, Maria Rosario, Fernandez, Natalia, Fitzsimons, Carlos Patricio, Copsel, Sabrina, Santiago, Sergio, Shayo, Carina, Davio, Carlos, & Monczor, Federico. 2010. Expression of a G protein-coupled receptor (GPCR) leads to attenuation of signaling by other GPCRs: experimental evidence for a spontaneous GPCR constitutive inactive form. *J Biol Chem*, **285**(20), 14990–14998.
- Van der Graaf, P. H., Saxena, P. R., Shankley, N. P., & Black, J. W. 1995. Exposure and characterization of the action of noradrenaline at dopamine receptors mediating endothelium-independent relaxation of rat isolated small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*, **116**(8), 3237–3242.
- Van der Graaf, P. H., Shankley, N. P., & Black, J. W. 1996. Analysis of the effects of alpha 1-adrenoceptor antagonists on noradrenaline-mediated contraction of rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, **118**(5), 1308–1316.
- VanBavel, E., van der Meulen, E. T., & Spaan, J. A. 2001. Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Exp Physiol*, **86**(5), 585–592.
- Vanderheyden, P. M., Fierens, F. L., Backer, J. P. De, Fraeyman, N., & Vauquelin, G. 1999. Distinction between surmountable and insurmountable selective AT₁ receptor antagonists by use of CHO-K1 cells expressing human angiotensin II AT₁ receptors. *Br J Pharmacol*, **126**(4), 1057–1065.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, **3**(7), RESEARCH0034.
- VanLandingham, L. G., Gannon, K. P., & Drummond, H. A. 2009. Pressure-induced constriction is inhibited in a mouse model of reduced betaENaC. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **297**(3), R723–8.

- Velat, Gregory J, Kimball, Matthew M, Mocco, J. D., & Hoh, Brian L. 2011. Vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: review of randomized controlled trials and meta-analyses in the literature. *World Neurosurg*, **76**(5), 446–454.
- Vågnes, O., Feng, J. J., Iversen, B. M., & Arendshorst, W. J. 2000. Upregulation of V(1) receptors in renal resistance vessels of rats developing genetic hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, **278**(6), F940–F948.
- Vilardaga, Jean-Pierre, Steinmeyer, Ralf, Harms, Greg S, & Lohse, Martin J. 2005. Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol*, **1**(1), 25–28.
- Vraamark, T., Waldemar, G., Strandgaard, S., & Paulson, O. B. 1995. Angiotensin II receptor antagonist CV-11974 and cerebral blood flow autoregulation. *J Hypertens*, **13**(7), 755–761.
- Waldsee, Roya, Ahnstedt, Hilda, Eftekhari, Sajedeh, & Edvinsson, Lars. 2010. Involvement of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II in endothelin receptor expression in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **298**(3), H823–H832.
- Warner, T. D., de Nucci, G., & Vane, J. R. 1989. Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. *Eur J Pharmacol*, **159**(3), 325–326.
- Weiss, J. M., Morgan, P. H., Lutz, M. W., & Kenakin, T. P. 1996. The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J Theor Biol*, **181**(4), 381–397.
- Wellbrock, Claudia, Karasarides, Maria, & Marais, Richard. 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**(11), 875–885.
- Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T., & Brayden, J. E. 2002. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res*, **90**(3), 248–50.
- Wenzel, Daniela, Knies, Ralf, Matthey, Michaela, Klein, Alexandra M, Welschoff, Julia, Stolle, Vanessa, Sasse, Philipp, Röhl, Wilhelm, Breuer, Johannes, & Fleischmann, Bernd K. 2009. beta(2)-adrenoceptor antagonist ICI 118,551 decreases pulmonary vascular tone in mice via a G(i/o) protein/nitric oxide-coupled pathway. *Hypertension*, **54**(1), 157–163.
- Wilcoxon, Frank. 1945. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*, **1**(6), pp. 80–83.
- Wong, Emily S W, Man, Ricky Y K, Vanhoutte, Paul M, & Ng, Kwok F J. 2010. Dexmedetomidine induces both relaxations and contractions, via different alpha2-adrenoceptor subtypes, in the isolated mesenteric artery and aorta of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **335**(3), 659–664.
- Xie, Yan-Hua, Wang, Si-Wang, Zhang, Yaping, Edvinsson, Lars, & Xu, Cang-Bao. 2010. Up-regulation of G-protein-coupled receptors for endothelin and thromboxane by lipid-soluble smoke particles in renal artery of rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **107**(4), 803–812.

- Xu, K. M., Tang, F., & Han, C. 1997. Alterations of mRNA levels of alpha 1-adrenoceptor subtypes with maturation and ageing in different rat blood vessels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **24**(6), 415–417.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K., & Masaki, T. 1988. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl*, **6**(4), S188–S191.
- Yasuda, N., Miura, S., Akazawa, H., Tanaka, T., Qin, Y., Kiya, Y., Imaizumi, S., Fujino, M., Ito, K., Zou, Y., Fukuhara, S., Kunimoto, S., Fukuzaki, K., Sato, T., Ge, J., Mochizuki, N., Nakaya, H., Saku, K., & Komuro, I. 2008. Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep*, **9**(2), 179–86.
- Yatabe, Junichi, Sanada, Hironobu, Yatabe, Midori Sasaki, Hashimoto, Shigeatsu, Yoneda, Minoru, Felder, Robin A, Jose, Pedro A, & Watanabe, Tsuyoshi. 2009. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates the activation of ERK and NADPH oxidase by mechanical strain in mesangial cells in the absence of angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol*, **296**(5), F1052–F1060.
- Yeon, Dong Soo, Kim, Jung Sup, Ahn, Duck Sun, Kwon, Seong Chun, Kang, Bok Soon, Morgan, Kathleen G, & Lee, Young Ho. 2002. Role of protein kinase C- or RhoA-induced Ca(2+) sensitization in stretch-induced myogenic tone. *Cardiovasc Res*, **53**(2), 431–438.
- Yuan, Joshua S, Reed, Ann, Chen, Feng, & Stewart, C. Neal. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, **7**, 85.
- Zhang, Yan-Liang, Frangos, John A, & Chachisvilis, Mirianas. 2009. Mechanical stimulus alters conformation of type 1 parathyroid hormone receptor in bone cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **296**(6), C1391–C1399.
- Zhou, J., Ernsberger, P., & Douglas, J. G. 1993. A novel angiotensin receptor subtype in rat mesangium. Coupling to adenylyl cyclase. *Hypertension*, **21**(6 Pt 2), 1035–8.
- Zhou, Jin, Ando, Hiromichi, Macova, Miroslava, Dou, Jingtao, & Saavedra, Juan M. 2005a. Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, **25**(7), 878–886.
- Zhou, Y., Dirksen, W. P., Chen, Y., Morris, M., Zweier, J. L., & Periasamy, M. 2005b. A major role for AT1b receptor in mouse mesenteric resistance vessels and its distribution in heart and neuroendocrine tissues. *J Mol Cell Cardiol*, **38**(4), 693–6.
- Zhou, Yingbi, Chen, Yanfang, Dirksen, Wessel P, Morris, Mariana, & Periasamy, Muthu. 2003a. AT1b receptor predominantly mediates contractions in major mouse blood vessels. *Circ Res*, **93**(11), 1089–1094.
- Zhou, Yingbi, Dirksen, Wessel P, Babu, Gopal J, & Periasamy, Muthu. 2003b. Differential vasoconstrictions induced by angiotensin II: role of AT1 and AT2 receptors in isolated C57BL/6J mouse blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **285**(6), H2797–H2803.

- Zou, H., Ratz, P. H., & Hill, M. A. 1995. Role of myosin phosphorylation and $[Ca^{2+}]_i$ in myogenic reactivity and arteriolar tone. *Am J Physiol*, **269**(5 Pt 2), H1590–H1596.
- Zou, Yunzeng, Akazawa, Hiroshi, Qin, Yingjie, Sano, Masanori, Takano, Hiroyuki, Minamino, Tohru, Makita, Noriko, Iwanaga, Koji, Zhu, Weidong, Kudoh, Sumiyo, Toko, Haruhiro, Tamura, Koichi, Kihara, Minoru, Nagai, Toshio, Fukamizu, Akiyoshi, Umemura, Satoshi, Iiri, Taroh, Fujita, Toshiro, & Komuro, Issei. 2004. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol*, **6**(6), 499–506.
- Zwaveling, J., Prins, E. A. Winkler, Pfaffendorf, M., & van Zwieten, P. A. 1996. The influence of hyperthyroidism on beta-adrenoceptor-mediated relaxation of isolated small mesenteric arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **353**(4), 438–444.

8 Danksagungen

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann danke ich für die Möglichkeit, unter seiner Leitung promovieren und wissenschaftliche Erfahrung sammeln zu können.

Meinem Betreuer und Lehrer PD Dr. Michael Mederos y Schnitzler danke ich für den kreativen Austausch und die vielfältigen Anregungen zu neuen Experimenten. Auch für den großzügigen Freiraum zum Einbringen eigener Ideen bin ich ihm sehr dankbar.

Herrn Dr. Richard Wizemann möchte ich danken, dass er mich mit seiner umfangreiche Expertise in der Arteriographie angelernt und auch darüber hinaus unterstützt hat. Auch die Beratung durch Frau Dr. Ursula Storch war hierbei wertvoll.

Dr. Thomas Büch möchte ich für die methodische Unterstützung beim Durchführen der qPCR danken. Dr. Vladimir Chubanov und Ludmila Sytik haben mir dabei ebenfalls beratend zur Seite gestanden. Frau Clara-Mae Beer danke ich für ihre Unterweisung im genauen Pipettieren.

Für die selbstlose Programmierung und Implementierung der sigmoiden Fit-Modelle in Origin bin ich Nico Blodow (Intelligent Autonomous Systems, Fakultät für Informatik der TU München) zu großem Dank verpflichtet.

Ohne die ständige beratende Unterstützung von Frau Renate Heilmair wäre die vorliegende Arbeit sicher nicht möglich gewesen. Meinen herzlichen Dank hierfür.

Die Korrektur der Arbeit haben Stephanie Blodow und Dr. Mederos y Schnitzler hingebungsvoll übernommen. Für diese Mühe kann ich mich gar nicht genug bedanken.

Ferner möchte ich auch der Ludwig-Maximilians-Universität München für die materielle und geistige Förderung im Rahmen des FöFoLe-Promotionsstudiengangs danken.

Zum Stichwort materieller und geistiger Förderung muss an dieser Stelle natürlich noch meinen elterlichen Mäzenen ganz herzlich gedankt werden.

Und meiner Freundin Anna-Maria danke ich für ihre Geduld und Unterstützung während des Schreibprozesses.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand