

Aus dem Institut für Physiologie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Rettig)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:
**Einfluss der sympathischen Innervation auf
L-Typ-Ca²⁺-Kanal abhängige Signalwege in renalen Widerstandsgefäßen**

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald

2018

vorgelegt von:
Philipp Heumann
geb. am: 21.04.1990
in: Bad Muskau

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. O. Grisk

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. C. de Wit

Ort, Raum: Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Straße, DZ7 Seminarraum J04.33

Tag der Disputation: 22.10.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Begriffe.....	IV
Symbole	VII
SI-Einheiten.....	VII
Abgeleitete SI-Einheiten.....	VIII
Zusammenfassung.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Arterielle Hypertonie.....	1
1.1.1 Definition, Epidemiologie, Einteilung, Ursachen	1
1.1.2 Essentielle Hypertonie – Überfunktion des sympathischen Nervensystems und Interaktion mit Gefäß- und Nierenfunktionen.....	2
1.2 Kontraktionsmechanismen der glatten Gefäßmuskulatur	7
1.2.1 Noradrenalin-induzierte Vasokontraktion.....	8
1.2.2 Mechanismen des Calciumeinstroms aus dem Extrazellulärraum	12
1.3 Sympathische Denervierung in der Behandlung der arteriellen Hypertonie .	16
1.4 Zielstellung und Arbeitshypothesen	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Laborgeräte und Hilfsmittel.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterial	21
2.1.3 Chemikalien und Substanzen.....	22
2.1.4 Lösungen und Puffer	23
2.1.5 Antikörper.....	25
2.1.6 Protein-Größenstandard.....	25
2.1.7 Versuchstiere und Tierhaltung.....	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Neonatale Sympathektomie und Scheinsympathektomie	27
2.2.2 Gewebeentnahme.....	28
2.2.3 Gefäßpräparation	29
2.2.4 Small-Vessel-Myographie (SVM).....	31
2.2.4.1 Grundlagen und Versuchsaufbau	31
2.2.4.2 Vorbereitung der Myographie-Versuche	34
2.2.4.3 Einbau der Gefäße	36

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.4	Vordehnung und Vitalitätsprüfung.....	37
2.2.4.5	Waschvorgang	38
2.2.4.6	Versuchsprotokolle.....	39
2.2.4.7	Übersicht Pharmaka.....	44
2.2.5	Western-Blot	45
2.2.5.1	Gewebeaufarbeitung	45
2.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	45
2.2.5.3	Proteinextraktion	46
2.2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	46
2.2.5.5	Proteintransfer auf die Nitrozellulose-Membran (Tank-Blot-Verfahren).....	48
2.2.5.6	Immundetektion der $\alpha 1$ -Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals.....	50
2.2.5.7	Immundetektion des Strukturproteins β -Aktin	50
2.2.5.8	Messung der Chemilumineszenz.....	51
2.2.6	Membranpotentialmessung	52
2.2.6.1	Grundlagen und Versuchsaufbau	52
2.2.6.2	Vorbereitung der Versuche.....	53
2.2.6.3	Einbau der Gefäße	54
2.2.6.4	Durchführung	54
2.2.6.5	Auswertungskriterien.....	56
2.3	Statistik und Datenanalyse.....	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Small-Vessel-Myographie (SVM).....	59
3.1.1	Effekt der neonatalen Sympathektomie auf die Noradrenalin-Sensitivität	59
3.1.2	Effekt der L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockade auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion	61
3.1.3	Effekt der simultanen L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockade auf die Y-27632 vermittelte Rechtsverschiebung der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve	63
3.1.4	S-(-)-BayK8644-induzierte L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Aktivierung.....	66
3.1.5	Beitrag der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum.....	67
3.1.6	Effekt der neonatalen Sympathektomie auf die Depolarisations-induzierte Vasokontraktion.....	69
3.1.7	Effekt des Membranpotentials auf die Aktivierbarkeit der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle.....	73
3.2	Western-Blot	75
3.3	Membranpotentialmessung.....	76
4	Diskussion	77
5	Literaturverzeichnis.....	86

Inhaltsverzeichnis

6	Abbildungsverzeichnis	101
7	Tabellenverzeichnis.....	102
8	Publikationen	103
9	Eidesstaatliche Erklärung	104
10	Danksagung	105
11	Anhang	106
11.1	Publikation	106

Abkürzungsverzeichnis

Begriffe

A.	Arterie, <i>lat. arteria</i>
A. dest.	destilliertes Wasser, <i>lat. aqua destillata</i>
Aa.	Arterien, <i>lat. arteriae</i>
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym, <i>engl. angiotensin-converting enzyme</i>
Ach	Acetylcholin
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AngII	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AR	Adrenorezeptor
AT ₁ -R.	Subtyp 1 des Angiotensinogen-Rezeptors
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cADPR	cyclische Adenosindiphosphat-Ribose, <i>engl. cyclic ADP ribose</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca _v 1.2	Gen für die porenbildende α 1-Untereinheit Typ C des L-Typ-Calciumkanals
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Triphenylmethanfarbstoff)
CBTM	Centrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPI-17	Inhibitor der Proteinphosphatase 1, <i>engl. C-kinase potentiated Protein phosphatase-1 Inhibitor</i>
CRAC	via Ca ²⁺ -Freisetzung aktivierter Kanal, <i>engl. calcium release-activated channel</i>
CrI:Wi	Wistar-Ratte, Züchter Charles River
CTR	Kontrolle, Tier der Kontrollgruppe (Scheinsympathektomie)
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ECL	Chemolumineszenzreaktion, <i>engl. enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure

Abkürzungsverzeichnis

EGTA	Ethylglycoltetraessigsäure
eH	essentielle Hypertonie
ERM	Proteinfamilie, welche die Proteine Ezrin, Radixin und Moesin beinhaltet
ESH	European Society of Hypertension
EZR	Extrazellularraum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor, <i>engl. guanosine nucleotide exchange factor</i>
GTP	Guanosintrisphosphat
H ⁺	Proton
HA	Hebelarm
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>engl. horseradish peroxidase</i>
HVA	hochspannungsaktivierten Ca ²⁺ -Kanal, <i>engl. high-voltage activated</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IP ₃ -R	Inositoltrisphosphat-Rezeptor
K ⁺	Kalium-Ion
K125	kaliumreiche Krebs-Ringer-Bicarbonat Lösung
KA	Kraftarm
kDa	Kilo-Dalton (atomare Masseinheit)
KCl	Kaliumchlorid
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonat Lösung
LC ₂₀	Myosin-leichte-Kette; <i>engl. myosin light chain</i>
LM	Lösungsmittel
LVA	niedrigspannungsaktivierter Ca ²⁺ -Kanal; <i>engl. low-voltage activated</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase; <i>engl. myosin light chain kinase</i>
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase; <i>engl. myosin light chain phosphatase</i>
mRNA	einsträngige Ribonukleinsäure, welche komplementär zur Gensequenz des codogenen Strangs der DNA ist; <i>engl. messenger RNA</i>
MSNA	Aktivität der muskulären sympathischen Nervenfasern
MYPT1	regulatorische Einheit der MLCP, <i>engl. myosin phosphatase target subunit 1</i>
n	Anzahl der verwendeten Tiere
NA	Noradrenalin
NGF	Nervenwachstumsfaktor; <i>engl. nervth growth factor</i>
Nif	Nifedipin+
NO	Stickstoffmonoxid

Abkürzungsverzeichnis

NPY	Neuropeptid-Y
NPY1-R	Subtyp 1 des Neuropeptid-Y-Rezeptors
NPY2-R	Subtyp 2 des Neuropeptid-Y-Rezeptors
NZ-Membran	Nitrozellulose-Membran
n.s.	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
P2X-R	Subtyp P2X des purinergen Rezeptors, Liganden-aktivierter Ionenkanal
P2Y-R	Subtyp P2Y des purinergen Rezeptors, G-Protein-gekoppelter Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RhoA	kleines G-Protein der Rho-Familie
PI	Proteaseinhibitor
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase C Subtyp β
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RDN	renale Denervierung
RKI	Robert-Koch-Institut
ROC	Rezeptor-gesteuerter Kanal, <i>engl. receptor-operated channel</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>engl. reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SHR	spontanhypertensive Ratte, <i>engl. spontaneouslyhypertensive rat</i>
SNS	sympathisches Nervensystem
SOC	Speicher-gesteuerter Kanal, <i>engl. store-operated channel</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SVM	Small-Vessel-Myography
SYX	sympathektomiert, Tier der Interventionsgruppe
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, <i>engl. tris buffered saline</i>
TBST	Tween20-haltige Tris-gepufferte Salzlösung
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRH	Therapieresistente Hypertonie

Abkürzungsverzeichnis

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRP-C1	Subtyp C1 des nichtselektiven Kationenkanals
TRP-C3	Subtyp C3 des nichtselektiven Kationenkanals
TRP-C5	Subtyp C5 des nichtselektiven Kationenkanals
TRP-C6	Subtyp C6 des nichtselektiven Kationenkanals
TRP-Kanal	Nichtselektiver Kationenkanal, <i>engl. transient receptor potential channel</i>
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
V.	Vene, <i>lat. vena</i>
VDCC	spannungsgesteuerter Ca ²⁺ -Kanal, <i>engl. voltage-dependent calcium channel</i>
vs.	gegen(übergestellt), <i>lat. versus</i>
Vv.	Venen, <i>lat. venae</i>
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation, <i>engl. World Health Organization</i>
WKY	Wistar-Kyoto-Ratte
Y-27632	Hemmer der Rho-Kinase, (<i>R</i>)-(+)- <i>trans</i> -4-(1-Aminoethyl)-N-(4-Pyridyl)-cyclohexanecarboxamide dihydrochloride
ZNS	Zentralnervensystem

Symbole

∅	Durchmesser
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
μ	Mikro

SI-Einheiten

Basisgröße	Dimensionssymbol (Größensymbol)	Einheitenzeichen		
Länge	L (l)	cm (Zentimeter)	mm (Millimeter)	μ m (Mikrometer)
Masse	M (m)	kg (Kilogramm)	g (Gramm)	mg (Milligramm)
Stoffmenge	N (n)	mol (Mol)	mmol (Millimol)	μ mol (Mikromol)
Stromstärke	I (I)	A (Ampère)	mA (Milliampère)	nA (Nanoampère)
Zeit	T (t)	h (Stunde)	min (Minute)	s (Sekunde)

Abgeleitete SI-Einheiten

Größe	Formelzeichen	Einheitenzeichen	
Atomare Masseneinheit	m	kDa (Kilo-Dalton)	Da (Dalton)
elektr. Spannung U	U	V (Volt)	mV (Millivolt)
Druck	p	kPa (Kilopascal)	Pa (Pascal)
Kraft	F	N (Newton)	mN (Millinewton)

Zusammenfassung

Die neonatale sympathische Denervierung steigert die Agonist-induzierte Gefäßkontraktion. Dieser Effekt kommt möglicherweise durch modifizierte Signaltransduktionsmechanismen zustande. Dazu könnten Veränderungen in Rho-Kinase(ROCK)- und L-Typ-Ca²⁺-Kanal-abhängigen Signalwegen gehören, welche den Rezeptoren der vasoaktiven Agonisten nachgeschaltet sind. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die verstärkte Aktivierung der ROCK und/oder L-Typ-Ca²⁺-Kanäle zur gesteigerten Noradrenalin(NA)-induzierten Gefäßkontraktion bei renalen Widerstandsgefäßen neonatal sympathektomierter Ratten beitragen. Für die experimentellen Untersuchungen wurden normotensive männliche Wistar-Ratten (CrI:Wi) verwendet. Diese wurden neonatal sympathektomiert oder scheinsympathektomiert. Es folgte die Untersuchung isolierter renaler Widerstandsarterien 9 bis 12 Wochen alter Tiere mittels Small-Vessel-Myographie. Die Expression der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle isolierter renaler Widerstandsgefäße wurde mittels Western-Blot untersucht. Zusätzlich wurde das Ruhemembranpotential der glatten Gefäßmuskelzellen mittels Mikroelektroden registriert. Die neonatale sympathische Denervierung führte im Vergleich zur Scheinsympathektomie zu einer gesteigerten NA-Sensitivität bei Gefäßen normotensiver Ratten. Sowohl die Inhibition der ROCK als auch die Blockade von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen führte zur Rechtsverschiebung der NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Diese Effekte waren bei Gefäßen sympathektomierter Tiere im Vergleich zu scheinbehandelten Kontrollen deutlicher ausgeprägt. L-Typ-Ca²⁺-Kanalaktivierung mittels S(-)-BayK8644 löste bei Nierenarterien sympathektomierter Ratten starke Gefäßkontraktionen aus. Die Gefäße der Kontrollen reagierten hingegen nur schwach auf S(-)-BayK8644. Der Proteingehalt der α 1-Untereinheit der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle glatter Gefäßmuskelzellen unterschied sich nicht zwischen beiden Gruppen. Das Ruhemembranpotential glatter Gefäßmuskelzellen unterschied sich statistisch signifikant zwischen beiden Gruppen ($p < 0,05$) und betrug $-57,5 \pm 2,2$ mV bei renalen Widerstandsgefäßen sympathektomierter Tiere und $-64,3 \pm 0,3$ mV bei Kontrollen. Die Depolarisation der glattmuskulären Zellmembran durch kaliumreiche Organbadlösung steigerte die S(-)-BayK8644-induzierte Kontraktion der Gefäße sympathektomierter Tiere und löste Kontraktionen bei Gefäßen der Kontrolltiere aus. Die Aktivierung von K_{ATP}-Kanälen führte zum vollständigen Verschwinden der S(-)-BayK8644-induzierten Kontraktion bei Gefäßen sympathektomierter Tiere. Diese Befunde zeigen, dass die sympathische Denervierung renaler Gefäße zu einer Depolarisation des Membranpotentials der Gefäßmuskelzellen führt, die zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit L-Typ-Ca²⁺-Kanal-abhängiger Signalwege beiträgt.

1 Einleitung

1.1 Arterielle Hypertonie

1.1.1 Definition, Epidemiologie, Einteilung, Ursachen

Der arterielle Bluthochdruck (arterielle Hypertonie) ist eines der größten Gesundheitsprobleme der heutigen Zeit und der größte Risikofaktor für die weltweit steigende Krankheitslast [155;219]. Das Auftreten erhöhter Blutdruckwerte ist der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Schlaganfall, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz sowie für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz [44]. Als arterielle Hypertonie wird die dauerhafte Erhöhung des Blutdrucks auf durchschnittliche Werte über 140 mmHg systolisch und/oder 90 mmHg diastolisch definiert [44;118;125]. Für Diabetiker und Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen liegt der Grenzwert bei 130/80 mmHg [44;133]. Der optimale Blutdruck wird als systolischer Druck unter 120 mmHg und diastolischer Druck unter 80 mmHg angegeben [44]. Für den Bereich zwischen den optimalen Werten und der Definition als arterielle Hypertonie (130 – 139/85 – 89 mmHg) wurde der Begriff des prähypertensiven Stadiums bzw. der Borderline-Hypertonie eingeführt [44;242]. Werte in diesem Bereich gehen bereits mit einer individuellen Blutdruck-assoziierten Risikoerhöhung für Herz-Kreislauf-Erkrankungen einher [242]. Das Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Ereignisse verdoppelt sich mit jeder Erhöhung des systolischen Blutdrucks um 20 mmHg bzw. des diastolischen Drucks um 10 mmHg [151;219]. Im Jahr 2000 wurde die weltweite Gesamtprävalenz der arteriellen Hypertonie auf 26,4 % geschätzt, wobei keine geschlechtsspezifischen Unterschiede registriert wurden [132]. In Deutschland haben nach Ergebnissen der vom Robert-Koch-Institut (RKI) durchgeführten Studie „Gesundheit in Deutschland aktuell 2010“ gut ein Viertel der Frauen (27 %) und Männer (26 %) einen bekannten arteriellen Bluthochdruck. Nach Angaben der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) ist die arterielle Hypertonie für etwa 13 % der weltweiten Todesfälle verantwortlich. Dies entspricht jährlich circa 9,4 Millionen Todesfällen [155].

Es wird die essentielle Hypertonie (eH) von sekundären Hypertonieformen unterschieden. Mehr als 90 % aller diagnostizierten Hypertonien werden als essentielle (primäre), 5 bis 10 % als sekundäre Formen eingestuft [168;185]. Die der eH zugrundeliegende Ätiologie bleibt nach wie vor nur unzureichend geklärt [35;178]. In der Literatur werden für ihre Entstehung verschiedene pathophysiologische Mechanismen diskutiert und es gilt als sicher, dass multiple Faktoren zur Pathogenese beitragen [24]. Aktuell existieren zahlreiche Hinweise für die Beteiligung genetischer, epigenetischer und verhaltens- bzw. umweltbezogener Faktoren an der Pathogenese der eH [42;139;154]. Das sympathische Nervensystem (SNS) trägt wesentlich zur Regulierung des arteriellen Blutdrucks bei. Eine pathologisch erhöhte Aktivität

des SNS ist bei Menschen mit Bluthochdruck beispielsweise nachweisbar durch Messung der Herzfrequenz oder durch Bestimmung der Plasmakonzentration von Adrenalin und Noradrenalin [86]. Die Entwicklung neuartiger und sensitiver Techniken zur direkten und indirekten Messung der Aktivität sympathischer Nervenfasern hat zum besseren Verständnis der Rolle des SNS für die langfristige Regulation des Blutdrucks beigetragen [170;245]. Aktuell besteht eine hohe Evidenz für die Beteiligung des SNS an der langfristigen Blutdruckregulation und an der Entstehung, Aufrechterhaltung und Progression der eH [186;245]. Des Weiteren trägt die langfristig erhöhte Aktivität des SNS zur Entstehung Hypertonie-assoziiierter Endorganschäden bei [92].

Die pathophysiologischen Mechanismen, welche den sekundären Formen des arteriellen Hypertonus zugrunde liegen, sind hingegen gut untersucht [185;203]. Eine der häufigsten Ursachen für die Entstehung der sekundären Hypertonie ist das Vorliegen eines obstruktiven Schlafapnoesyndroms (OSAS) [159;189]. Nächtliche Hypoxiephasen führen zu einer erhöhten Aktivität des SNS und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Beides trägt zur Etablierung erhöhter Blutdruckwerte bei [83;150]. Des Weiteren führen Erkrankungen des Nierenparenchyms (z. B. chronische Niereninsuffizienz, Glomerulonephritiden, zystische Nierenerkrankungen, Nierenzellkarzinom u.a.) und eine Minderperfusion der Nieren (z. B. auf Grund von Stenosen der A. renalis) zu einer verstärkten Aktivierung des RAAS mit konsekutiv erhöhten Blutdruckwerten [80]. Bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) kommt es zur Angiotensin-unabhängigen Stimulation der Aldosteronsynthese. Die exzessive Reabsorption von Natrium in distalen Nephronabschnitten führt zum Anstieg des Plasmavolumens und zur Etablierung hypertensiver Blutdruckwerte [220]. Weitere Ursachen sind Hypo- und Hyperthyreose, Glukokortikoidexzess (Cushing-Syndrom), das Katecholaminproduzierende Phäochromozytom und Renin-sezernierende Tumore [203;262].

1.1.2 Essentielle Hypertonie – Überfunktion des sympathischen Nervensystems und Interaktion mit Gefäß- und Nierenfunktionen

Die Innervation der arteriellen Gefäße erfolgt durch viszeroafferente und efferente Nervenfasern [54;107;122]. Die efferente Innervation des menschlichen Blutgefäßsystems erfolgt hauptsächlich durch das SNS und ist nur zu einem kleinen Teil parasympathischen Ursprungs [53;107]. Der sympathische Teil des vegetativen Nervensystems wird durch zwei hintereinandergeschaltete Neurone gebildet. Die Umschaltung vom präganglionären auf das postganglionäre Neuron erfolgt im thorakolumbalen sympathischen Grenzstrang und in den prävertebralen Ganglien durch den Neurotransmitter Acetylcholin (Ach) [224]. In der Peripherie am Endorgan setzen die postganglionären sympathischen Neurone das

Katecholamin Noradrenalin (NA) als Transmitter frei, welches seine Wirkung über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Adrenorezeptoren vermittelt. Dazu zählen α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - und β_3 -Rezeptoren. Neben NA werden die Kotransmitter Adenosintriphosphat (ATP) und Neuropeptid-Y (NPY) freigesetzt [224]. ATP aktiviert purinerge Rezeptoren, welche als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (P2Y-R) bzw. Liganden-aktivierte Ionenkanäle (P2X-R) agieren. NPY vermittelt seine Wirkung ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (NPY1-R, NPY2-R). Die Freisetzung von NA und der Kotransmitter wird durch präsynaptisch lokalisierte α_2 -Adrenorezeptoren und purinerge Rezeptoren sowie den NPY2-R reguliert [254].

Das SNS beeinflusst den Blutdruck durch Effekte auf den peripheren Gefäßwiderstand, die Größe des Herzzeitvolumens und die Nierenfunktion. Im physiologischen Bereich vermittelt das SNS kurzfristige hämodynamische Wirkungen durch Erhöhung des Herzzeitvolumens und des arteriellen Gefäßtonus und hat langfristige Effekte auf die Struktur und Funktion arterieller Gefäße [50;122;167;199]. Eine chronische Erhöhung der Sympathikusaktivität fördert Remodellierungs- und Hypertrophieprozesse des Herzens und der Gefäßwände [67]. Um die Bedeutung der Wechselwirkungen zwischen dem SNS und der Nieren- bzw. Gefäßfunktion für die Entstehung der arteriellen Hypertonie zu untersuchen, sind zuverlässige Methoden zur Messung der Aktivität sympathischer Nervenfasern notwendig. In Tierexperimenten kann mit Hilfe extrazellulärer Ableitelektroden direkt und organspezifisch die Aktivität einzelner oder mehrerer sympathischer Nerven untersucht werden (Single-Unit-Recording bzw. Multifaserableitung). Beim Menschen sind die Möglichkeiten der Bestimmung der Aktivität des SNS zu inneren Organen, wie Niere und Herz, limitiert. Es besteht jedoch die Option, die Aktivität subkutan gelegener sympathischer Nervenfasern, welche Haut und Skelettmuskulatur innervieren, zu messen [89;252]. Mit Hilfe dieser Methodik können jedoch nur indirekt Rückschlüsse auf die organspezifische sympathische Aktivität abgeleitet werden [88]. Durch den Einsatz von Tracer-Methoden (radioaktive Markierung von NA) kann die organspezifische NA-Freisetzung in das Blutplasma (NA-Spillover) bestimmt werden [59-62].

Zur Erforschung der eH dient vor allem das Tiermodell der spontan-hypertensiven Ratte (SHR), welches durch Züchtung aus Wistar-Kyoto-Ratten hervorgegangen ist [14]. SHR werden weltweit am häufigsten zur Erforschung der eH eingesetzt, da sie Ähnlichkeiten zur multifaktoriellen Pathogenese der eH in humanen Individuen aufweisen [93].

Die Resultate verschiedener tierexperimenteller Studien deuten darauf hin, dass die eH mit einer verstärkten Aktivierung des SNS einhergeht. Es konnte gezeigt werden, dass die NA-Konzentration im Blutplasma von SHR im Vergleich zu normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) signifikant erhöht ist [30;146;246;251]. Ein Nachteil der Messung von Katecholaminen im Blutplasma ist, dass nur die globale Aktivität des SNS abgebildet wird,

jedoch nicht die diskreten Beiträge der organspezifischen sympathischen Innervation. Im Muskel- und Fettgewebe sowie in den Nieren der SHR konnten im Vergleich zu normotensiven WKY ebenfalls erhöhte Katecholaminkonzentrationen registriert werden [30;103]. Darüber hinaus konnte für SHR im Vergleich zu WKY eine erhöhte Dichte der sympathischen Innervation festgestellt werden [103]. Mikroneurographische Untersuchungen haben durch direkte Registrierung der neuronalen Aktivität mittels Multifaserableitung gezeigt, dass bei SHR im Vergleich zu normotensiven WKY die Aktivität renaler sympathischer Nervenfasern erhöht ist [48;127;228;241]. Diese Ergebnisse konnten nicht in allen Studien reproduziert werden. Als Ursache der bestehenden Diskrepanzen wurden methodische Unterschiede aufgeführt [77;243]. Durch Entwicklung des Single-Unit-Recording wurde die Evidenz für einen bestehenden Unterschied hinsichtlich der renalen sympathischen Nervenaktivität zwischen spontan hypertensiven und normotensiven Ratten erneut gestärkt [165]. Diese mikroneurographischen Aufnahmen liefern wertvolle Momentaufnahmen der neuronalen Aktivität, jedoch besteht keine Möglichkeit zur langfristigen Überwachung der Nervenaktivität. Zuletzt wurde durch die Einführung der telemetrischen Messung der Aktivität renaler Nervenfasern bei Kaninchen ein wichtiger methodischer Fortschritt erlangt [16]. Der Einsatz dieser Technologie bei kleineren Nagetieren und weiter verbreiteten Tiermodellen wird es in Zukunft ermöglichen, telemetrische Langzeitaufzeichnungen der renalen Nervenaktivität zu registrieren und weitere Erkenntnisse über die Bedeutung des SNS für die Pathogenese der eH zu erlangen [213].

Mehrere experimentelle Studien haben gezeigt, dass die eH auch bei hypertensiven Patienten mit einer verstärkten Aktivität des SNS assoziiert ist. In einer Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der Katecholamine Adrenalin und NA im Blutplasma bei Patienten mit eH im Vergleich zu Individuen mit normotensiven Blutdruckwerten erhöht ist [82;85]. Mit Hilfe radioaktiver Markierung von NA ist es möglich, die Netto-Freisetzung des Neurotransmitters aus adrenergen sympathischen Nervenendigungen zu quantifizieren und die Clearance des Transmitters aus dem Blutplasma zu bestimmen [60-61]. Der regionale renale und kardiale NA-Spillover war im Plasma hypertensiver Patienten im Vergleich zu altersgleichen normotensiven Kontrollen erhöht [60;62;221-222]. Des Weiteren haben mikroneurographische Untersuchungen bei Patienten im Übergangsbereich von normotensiven zu hypertensiven Blutdruckwerten und bei Patienten mit manifester arterieller Hypertonie eine erhöhte Impulsfrequenz der muskulären sympathischen Nervenfasern (MSNA) gezeigt [10;75;142]. Die Aktivität muskulärer sympathischer Nervenfasern steigt kontinuierlich mit dem Schweregrad der Hypertonie [86-87].

Die Ätiologie der verstärkten Aktivierung des SNS ist bisher nicht hinreichend geklärt. Es werden mehrere Mechanismen vorgeschlagen, um die Überaktivität des SNS bei Patienten

mit essentieller Hypertonie zu erklären. Eine viel diskutierte Hypothese ist, dass die verstärkte Aktivierung des SNS von der Konzentration des zirkulierenden Angiotensin II (AngII) abhängig ist. Es wurde wiederholt gezeigt, dass AngII eine stimulierende Wirkung auf die Aktivität sympathischer Nervenfasern ausübt, die Freisetzung von NA aus sympathischen Nervenendigungen forciert und die Aktivierbarkeit adrenerger Rezeptoren erhöht [169]. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Überaktivität des SNS durch eine verstärkte Aktivität zentraler Strukturen, insbesondere des Hypothalamus, zustande kommt [169]. Möglicherweise trägt auch eine verminderte Sensitivität arterieller Barorezeptoren zu einer verstärkten Aktivität des SNS bei [87;169].

Die grundlegende hämodynamische Veränderung bei Patienten mit eH ist ein erhöhter peripherer Gefäßwiderstand [177;204]. Der größte Teil des peripheren Gefäßwiderstands (45 bis 50 %) wird durch terminale Arterien (Widerstandsarterien, $\varnothing < 300 \mu\text{m}$) und Arteriolen determiniert [144;177]. Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille ist der Gefäßwiderstand umgekehrt proportional zur vierten Potenz des inneren Gefäßradius. Dadurch ergeben sich signifikante Veränderungen des arteriellen Widerstands in Folge leichter Veränderungen des Gefäßlumens. Sowohl die funktionellen als auch die strukturellen Eigenschaften der Gefäße bestimmen die Größe des inneren Gefäßdurchmessers und damit deren Widerstand [144;177]. Die arterielle Gefäßwand ist eine aktive und dynamische Einheit, welche aus zellulären (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) und nichtzellulären (extrazelluläre Matrix) Komponenten besteht und die Fähigkeit besitzt, auf physiologische und pathologische Reize mit der Reorganisation der einzelnen Komponenten zu reagieren. Dadurch kann die Integrität der Gefäßwand auch unter wechselnden physiologischen Bedingungen aufrechterhalten werden. Die Fähigkeit zur dynamischen Reorganisation der Gefäßwandkomponenten ist die Grundlage für die auftretenden Gefäßveränderungen bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Bluthochdruck und Arteriosklerose [56].

Zahlreiche Studien an humanen Widerstandsarterien haben gezeigt, dass die eH mit einem reduzierten Gefäßlumen und einer Erhöhung des Verhältnisses zwischen Mediadicke zu Lumendurchmesser assoziiert ist [3;66;104]. Auch in tierexperimentellen Studien an SHR konnten diese Veränderungen beobachtet werden [51]. Der arterielle Remodellierungsprozess läuft dabei ohne Vergrößerung der Media-Querschnittsfläche und bei gleichbleibender Gefäßmuskulatur ab [105;144;177;205]. Diese Form der strukturellen Gefäßwandveränderung wird als eutrophes Remodeling bezeichnet und ist spezifisch für die primäre bzw. essentielle Form der arteriellen Hypertonie. Hingegen sind strukturelle Veränderungen arterieller Widerstandsarterien bei Patienten mit sekundärer Hypertonie durch hypertrophes Remodelling charakterisiert [207]. Die Faktoren, welche dem eutrophen Remodeling zugrunde liegen, sind bisweilen nicht vollständig bekannt. Nach einer beschriebenen Hypothese führt

die langfristig erhöhte Aktivität gefäßwirksamer neuraler und humoraler Faktoren zur anhaltenden Vasokontraktion mit konsekutiver Erhöhung des arteriellen Blutdrucks [177]. Es resultiert eine Abnahme des inneren Gefäßradius mit konsekutivem Anstieg des transmuralen Drucks und einer Zunahme der Gefäßwanddicke. Nach dem Gesetz von Laplace entsteht hierbei keine Erhöhung der Gefäßwandspannung und es kommt somit nicht zum hypertrophen Remodeling, sondern zur Neuordnung der vorhandenen Muskelzellen um ein kleineres Gefäßlumen [177]. Hinweise deuten darauf hin, dass die verstärkte Aktivierung des SNS in den Prozess des eutrophen Remodeling eingebunden ist. Studien haben gezeigt, dass die anhaltende Exposition von NA und AngII zum eutrophen Remodeling arterieller Gefäße führt [171-172]. An dem Prozess sind die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) beteiligt [172].

Die Nieren kontrollieren über den Mechanismus der Drucknatriurese das Plasmavolumen und nehmen dadurch Einfluss auf die langfristige Höhe des arteriellen Blutdrucks. Ein Anstieg des Blutdrucks führt zu einer erhöhten renalen Wasser- und Elektrolytausscheidung. Dadurch kommt es über die Abnahme des Blutvolumens zu einer Reduzierung des Herzzeitvolumens und letztendlich zur Senkung des Blutdrucks. Senkungen des arteriellen Blutdrucks lösen entgegengesetzte Reaktionen aus. Durch diesen Regelkreis werden abweichende Blutdruckwerte auf die Ausgangswerte zurückgebracht [96]. Die Sensitivität dieses renalen Kontrollsystems wird durch nervale und hormonelle Einflüsse moduliert, die an der Niere und an der glatten Gefäßmuskulatur angreifen. Die Aktivierung efferenter sympathischer Nervenfasern in der Niere führt durch Aktivierung von β_1 -Rezeptoren zur verstärkten Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat und durch Aktivierung von α_1 -Rezeptoren zur Erhöhung des renalen Gefäßwiderstands. Über die Stimulation der Reninfreisetzung ist das SNS direkt mit dem RAAS vernetzt. Des Weiteren steigt durch den verstärkten Einfluss des SNS die Kochsalz- und Wasserreabsorption im renalen Tubulussystem. Gemeinsam tragen diese Mechanismen bei chronischer Aktivierung des SNS zur langfristigen Erhöhung des arteriellen Blutdrucks bei [54;121]. Über afferente Nervenfasern sind die Nieren mit Strukturen des zentralen Nervensystems verbunden. Die Aktivierung afferenter Nerven über sensorische Nervenendigungen (Dehnungs-, Schmerz und Chemorezeptoren) nimmt Einfluss auf die Aktivität efferenter sympathischer Nervenfasern, welche wiederum die Gefäßmuskulatur, Herz und Niere innervieren und somit Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks nehmen [32;54]. Die sensorischen Nerven der Nieren können sowohl sympathoexzitatorische als auch sympathinhibitorische Reflexe auslösen [54].

In der Nierenzirkulation wird der präglomeruläre Gefäßwiderstand vor allem durch die terminalen Arterien (Aa. interlobares, Aa. arcuatae, Aa. interlobulares) und präglomerulären

(afferenten) Arteriolen bestimmt. Der renale Gefäßwiderstand ist bei SHR im Vergleich zu normotensiven Kontrolltieren erhöht [182].

Die Forschungsergebnisse liefern Hinweise für die Beteiligung des SNS an der Pathogenese der eH. Auf Grund der weltweit steigenden Prävalenz der eH besteht großes Interesse, die Effekte des SNS auf das Kontraktionsverhalten arterieller Widerstandsgefäße und die Nierenfunktion differenzierter zu untersuchen. Dies wird dazu beitragen, die Pathogenese der eH besser zu verstehen und in der Zukunft optimierte Therapieoptionen anbieten zu können.

1.2 Kontraktionsmechanismen der glatten Gefäßmuskulatur

Der Tonus glatter Gefäßmuskelzellen wird durch eine Vielzahl vasoaktiver Substanzen reguliert. Dazu zählen die Transmitter des vegetativen Nervensystems (u.a. NA, Ach, ATP, NPY), zirkulierende Hormone (u.a. AngII, Endothelin-1), zahlreiche Gewebehormone (u.a. Histamin, Serotonin, Eikosanoide), lokale Metabolite und Atemgase (u.a. O₂, CO₂, H⁺, K⁺) sowie vom Endothel freigesetzte Substanzen (u.a. NO, Endothelin-1). Weiterhin tragen mechanische Dehnungsreize zur Veränderung des Gefäßtonus bei (myogene Antwort). Die postganglionären sympathischen Neurone, welche die glatten Gefäßmuskelzellen innervieren, setzen NA als Transmitter frei. Die Kontraktion der Gefäße ist abhängig von der Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in den glatten Gefäßmuskelzellen („vascular smooth muscle cells“, VSMC). Es wird zwischen extrazellulären und intrazellulären Wegen unterschieden, die zum Anstieg der Ca²⁺-Konzentration führen. Beide Mechanismen können sowohl durch Änderungen des Membranpotentials als auch unabhängig von Änderungen des Membranpotentials aktiviert werden („receptor-operated channel“, ROC). Der relative Beitrag beider Mechanismen variiert je nach Konzentration des Agonisten, Dauer des Stimulus und Art des Gefäßes [73;164;259].

Die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur wird durch den Status der Phosphorylierung regulatorischer leichter Ketten des Myosins („20 kDa light-chain“, LC₂₀) gesteuert. Der Prozess der Myosinphosphorylierung wird vom dynamischen Gleichgewicht der Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Kinase („myosin light chain kinase“, MLCK) und der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase („myosin light chain phosphatase“, MLCP) bestimmt [173]. Der entscheidende Faktor für die Entwicklung glattmuskulärer Kontraktionen ist ein Anstieg der Ca²⁺-Konzentration im Zytoplasma glatter Muskelzellen, da die Aktivität der MLCK von der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration abhängig ist [78;173]. Ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt zur Bildung von Ca²⁺/Calmodulin-Komplexen [49;173]. Der Ca²⁺/Calmodulin-Komplex aktiviert die MLCK, welche eine Phosphatgruppe von ATP auf die LC₂₀ überträgt [6]. Die phosphorylierte LC₂₀ bindet hochaffin an Aktinfilamente, welche die

ATPase-Aktivität des Myosins aktivieren und dadurch den Querbrückenzyklus in Gang setzen [6]. Die Aktivitäten der MLCP und MLCK werden darüber hinaus durch diverse Signalkaskaden Ca^{2+} -unabhängig reguliert. Dadurch kann die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente des kontraktile Apparats angepasst werden.

Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma glatter Gefäßmuskelzellen erfolgt durch Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und durch Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum (EZR). Zu den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern gehören das sarkoplasmatische Retikulum (SR) und die Mitochondrien, wobei letztere nicht wesentlich zur Regulierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration glatter Gefäßmuskelzellen beitragen [214]. Der Ca^{2+} -Einstrom aus dem EZR erfolgt über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle („voltage-dependent calcium channels“, VDCCs), spannungsunabhängige nichtselektive Kationenkanäle (v.a. TRP-Kanäle) und Liganden-aktivierte Ionenkanäle [173]. Die relative Bedeutung des Ca^{2+} -Einstroms aus dem EZR gegenüber der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung nach NA-Stimulation variiert zwischen verschiedenen glattmuskulären Präparaten. Für die Agonist-induzierte Vasokontraktion kleiner arterieller Widerstandsgefäße („*small arteries*“) konnte im Vergleich zu großen arteriellen Gefäßen nachgewiesen werden, dass der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vor allem durch den Ca^{2+} -Einstrom aus dem EZR und weniger durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgt [39;174]. Bei afferenten Arteriolen der renalen Mikrozirkulation erfolgt der Ca^{2+} -Einstrom vorwiegend über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle [117;214]. Im Gegensatz dazu leistet die Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und/oder der Ca^{2+} -Einstrom über Ca^{2+} -Kanäle, welche nicht den L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle entsprechen, den entscheidenden Beitrag für die intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma efferenter Arteriolen der renalen Mikrozirkulation [117;214]. Für die Homöostase der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sind eine Vielzahl spezifischer Ionenkanäle und Membrantransportsysteme verantwortlich.

1.2.1 Noradrenalin-induzierte Vasokontraktion

Auf NA-Stimulation reagieren isolierte renale Gefäßsegmente mit einer Verringerung des arteriellen Gefäßdurchmessers und einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [57;136;214;260]. NA vermittelt seine kontraktile Wirkungen auf der Zelloberfläche glatter Muskelzellen arterieller Nierengefäße vor allem über die Aktivierung von α_1 -Adrenorezeptoren (α_1 -AR) [47;55;225;257]. Die Klassifizierung der α_1 -AR erfolgt nach pharmakologischen Kriterien in drei Subtypen (α_{1A} , $_{1B}$, $_{1D}$ -AR) [29;97;149;192]. Bei renalen Interlobararterien und afferenten sowie efferenten glomerulären Arteriolen der Ratte wird die Wirkung von NA hauptsächlich über α_{1A} -AR vermittelt [21;41;216]. In Rezeptorbindungsstudien konnte der

dominante Einfluss des α_{1A} -AR für die Regulation der renalen Hämodynamik bestätigt werden [217]. Eine Bedeutung der α_1 -AR für die Entstehung der eH wird durch Beobachtungen vermittelt, welche eine verstärkte Aktivierbarkeit dieser Rezeptoren bei Nierengefäßen von SHR im Vergleich zu normotensiven WKY zeigten [247]. Renale Widerstandsgefäße von SHR zeigten zudem im Vergleich zu Kontrolltieren eine erhöhte Dichte des α_1 -AR [191;210]. Es wird vermutet, dass sich in verschiedenen pathophysiologischen Zuständen der funktionelle Beitrag der verschiedenen α_1 -AR-Subtypen ändert [114]. Bei genetisch hypertensiven Tiermodellen wird eine zunehmende Bedeutung des α_{1D} -AR diskutiert [114;217].

Bei der NA-vermittelten Vasokonstriktion nach Stimulation von α_1 -Adrenorezeptoren lässt sich nach beginnender schneller Gefäßtonuszunahme (phasische Komponente) ein weiterer langsamer und langanhaltender Anstieg des Gefäßmuskeltonus beobachten (tonische Komponente). Der anfängliche Anstieg des Gefäßtonus ist im Wesentlichen Folge der Inositoltrisphosphat (IP_3)-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Die tonische Komponente der Kontraktion hängt vom zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom aus dem EZR ab. In Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} kann diese Phase der glattmuskulären Kontraktion nicht aufrechterhalten werden [188].

Die Bindung des Liganden NA an den α_1 -AR reguliert über die Aktivierung des heterotrimeren $G_{q/11}$ -Protein die Aktivität membranassoziierter Enzyme. Nach Rezeptorstimulation kommt es nach Aktivierung der Phospholipase C Subtyp β ($PLC\beta$) zur Bildung der sekundären Botenstoffe IP_3 und Diacylglycerol (DAG) [64]. Diese werden durch die Hydrolaseaktivität der $PLC\beta$ aus dem membrangebundenen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) gebildet [18;64]. Durch Konzentrationsänderungen der Botenstoffe werden die auf Adrenorezeptoraktivierung folgenden zellulären Reaktionen vermittelt. IP_3 stimuliert die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Aktivierung von Inositoltrisphosphat-Rezeptoren (IP_3 -R), einem ligandenaktivierten Ca^{2+} -Kanal (Abb. 1-1) [253]. Untersuchungen proximaler Interlobararterien haben gezeigt, dass durch Inhibition der $PLC\beta$ und der daraus resultierenden verminderten Bildung von IP_3 , die myogene Gefäßkontraktion um bis zu 50 % abgeschwächt wird [237]. Die lokale Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors (RyR). Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen in der Plasmamembran des SR lokalisierten Ca^{2+} -Kanal [214]. In zahlreichen Studien konnte die funktionelle und strukturelle Kollokalisierung von IP_3 -R und RyR für verschiedene Typen glatter Muskulatur bestätigt werden [158]. Simultane Messungen intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen und transmembranärer Ionenströme haben gezeigt, dass auch der Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsgesteuerte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR durch Aktivierung von RyR stimuliert

[71;158;240]. Die Aktivierung der RyR durch lokale Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung („calcium-induced calcium release“, CICR) bezeichnet und bildet die funktionelle Grundlage der „ Ca^{2+} -Waves“. Der Mechanismus dient als positives Feedback und verstärkt die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR kaskadenartig [71]. Die RyR werden zudem durch cyclische Adenosindiphosphat-Ribose („cyclic ADP ribose“, cADPR) stimuliert bzw. in ihrer Sensitivität gegenüber zytosolischen Ca^{2+} -Ionen moduliert [71]. Durch die enge räumliche Beziehung der zellulären Plasmamembran und der Membran des SR führt die lokale Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung membranständiger Ca^{2+} -abhängiger K^+ - und Cl^- -Kanäle. Die Aktivierung der K^+ -Kanäle führt über den Ausstrom von K^+ -Ionen zur Hyperpolarisation der Zellmembran und die Aktivierung der Cl^- -Kanäle über den Ausstrom von Cl^- -Ionen zur Depolarisation der Zellmembran. Die Veränderungen des Membranpotentials beeinflussen die Aktivität der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und bilden die Grundlage der „Calcium-Sparks“ [143].

DAG ist für die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) verantwortlich, welche wiederum die Phosphorylierung vieler Zielproteine katalysiert [253]. Durch Phosphorylierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen leistet die PKC einen Beitrag zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in glatte Gefäßmuskelzellen. Des Weiteren inaktiviert sie durch Substratphosphorylierung die regulatorische Untereinheit („myosin phosphatase target subunit 1“, MYPT1) der MLCP, sodass der Anteil der phosphorylierten LC_{20} zunimmt und die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparats ansteigt (Abb. 1-1) [253].

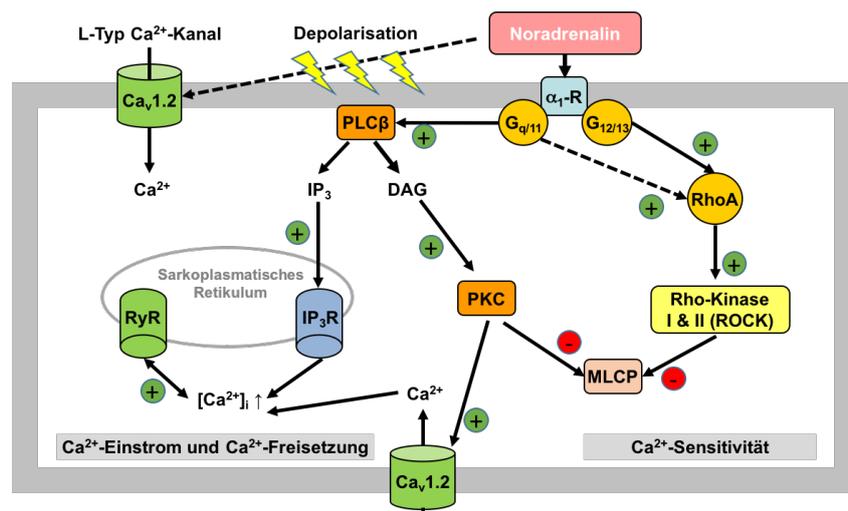


Abb. 1-1 Noradrenalin(NA)-induzierte Kontraktionsmechanismen. NA vermittelt seine kontraktile Effekte in den renalen Widerstandsgefäßen vor allem über die Aktivierung von α_1 -Adrenorezeptoren (α_1 -AR). Eine entscheidende Funktion für den transmembranären Ca^{2+} -Einstrom übernehmen die spannungsgesteuerten L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ($\text{Ca}_v1.2$). Des Weiteren wird Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über IP_3 -Rezeptoren (IP_3 -R) und Ryanodin-Rezeptoren (RyR) freigesetzt. Beide Prozesse erhöhen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und stimulieren die Aktivität der MLCK. Die Aktivität des RhoA/Rho-Kinase(ROCK)-Signalweges leistet einen wesentlichen Beitrag zur Ca^{2+} -Sensitivierung des kontraktile Apparates, durch Inhibition der MLCP. („+“ stimulierender Effekt, „-“ hemmender Effekt)

Neben der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung der MLCK wird vor allem bei neurohumoraler Stimulation der glatten Muskulatur zusätzlich die Ansprechbarkeit der Myofilamente für Ca^{2+} (sog. Ca^{2+} -Sensitivität) reguliert. Eine besondere Bedeutung für die Regulation der Ca^{2+} -Sensitivität hat die RhoA/Rho-Kinase(ROCK)-Signalkaskade [196]. Die NA-induzierte Stimulation der α_1 -Adrenozeptoren führt neben der Aktivierung des heterotrimeren $\text{G}_{q/11}$ -Protein auch zur Aktivierung des heterotrimeren $\text{G}_{11/12}$ -Protein [211]. Die aktive Form beider G-Proteine ist in der Lage, durch Aktivierung der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren („guanosine nucleotide exchange factor“, GEF) das kleine monomere G-Protein RhoA von der inaktiven GDP-gebundenen Form in die aktive GTP-gebundene Form zu überführen [196]. Aktiviertes RhoA aktiviert seinerseits die Rho-Kinase (ROCK). Diese phosphoryliert die regulatorische Untereinheit (MYPT1) der MLCP, wodurch deren Aktivität abnimmt und die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparats zunimmt (Abb. 1-1) [196]. Über diese Prozesse löst NA nicht nur durch Ca^{2+} -Freisetzung und Aktivierung der MLCK, sondern zusätzlich durch Hemmung der MLCP eine Kontraktion der glatten Muskulatur aus.

Es existieren zwei Isoformen der ROCK, die als ROCK1 und ROCK2 bezeichnet werden. Die glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäße exprimieren beide Isoformen [94;256]. Neben der Kontraktion glatter Muskelzellen ist die ROCK an der Regulation verschiedener Zellfunktionen beteiligt, wie der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, der Zellwanderung (Migration) und der Zellvermehrung (Proliferation) [256]. Studien an menschlichen renalen Widerstandsarterien haben gezeigt, dass die α_1 -Adrenorezeptor-induzierte Vasokontraktion stark von der Funktion der ROCK abhängig ist und durch ROCK-Inhibition mittels Y-27632 stark abgeschwächt wird [94]. Darüber hinaus haben Messungen an Widerstandsgefäßen unter isotonen Untersuchungsbedingungen ergeben, dass die RhoA/Rho-Kinase(ROCK)-Signalkaskade auch in Abwesenheit von Vasokonstriktoren aktiv ist. Dies leistet möglicherweise einen Beitrag zur Aufrechterhaltung eines hohen basalen Gefäßtonus und einer erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit des kontraktile Apparats [161]. Des Weiteren ist bekannt, dass die ROCK bei glatten Gefäßmuskelzellen an der Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms nach NA-induzierter Stimulierung von α_1 -Adrenorezeptoren beteiligt ist. Dabei soll es sich um Eintrittswege handeln, die sich von denen durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und Speicher-operierter Ca^{2+} -Kanäle unterscheiden [81]. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration trägt wiederum zur Aktivierung der ROCK bei [212]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sich die Signalwege der RhoA/ROCK-abhängigen Ca^{2+} -Sensibilisierung und Ca^{2+} -Eintrittsmechanismen wechselseitig beeinflussen.

Durch Studien an hypertensiven Ratten konnten Hinweise für die Beteiligung des RhoA/ROCK-Systems an der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie gewonnen werden. Es zeigte sich, dass durch In-vivo-Applikation verschiedener ROCK-Inhibitoren (u.a. Y-27632,

Fasudil, SAR407899) der arterielle Blutdruck bei diversen hypertensiven Tiermodellen normalisiert werden konnte [52;131;160;248]. Direkte Messungen der Menge des aktiven GTP-gebundenen RhoA legen nahe, dass eine erhöhte RhoA-Aktivität für die verstärkte Aktivierung der ROCK verantwortlich ist [227]. Die systemische Gabe von ROCK-Inhibitoren führt zur Verminderung des peripheren Gefäßwiderstands. Dies deutet darauf hin, dass die Vasodilatation für die akut blutdrucksenkende Wirkung der ROCK-Inhibitoren verantwortlich ist [36;52]. Für die Regulation der renalen Mikrozirkulation hat die ROCK ebenfalls eine zentrale Bedeutung. Die pharmakologische Hemmung der ROCK führt in den renalen Gefäßen zur Abschwächung der Agonist-induzierten Vasokontraktion. Zudem kommt es nach ROCK-Inhibition zur Reduzierung der myogenen Antwort und zur Abschwächung der Vasokontraktion nach Membrandepolarisation [40;116;209].

In Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit zeigten Gefäße sympathektomierter Tiere (SYX) im Vergleich zu denen scheinsympathektomierter Kontrollen (CTR) nach ROCK-Inhibition durch Y-27632 eine signifikant stärkere Rechtsverschiebung der NA-Konzentrations-Wirkungskurve ($\Delta \log EC_{50} = 0,28 \pm 0,07 \text{ mol/l}$ vs. $0,79 \pm 0,14 \text{ mol/l}$, CTR vs. SYX, $p < 0,05$). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine verstärkte Aktivierung der ROCK zur Entstehung der NA-Supersensitivität nach neonataler Sympathektomie beiträgt.

1.2.2 Mechanismen des Calciumeinstroms aus dem Extrazellulärraum

Durch Aktionspotentiale oder länger anhaltende Depolarisation der Zellmembran öffnen sich spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (VDCCs). Dieser Mechanismus wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet und verbindet die Depolarisation der Zellmembran mit der Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen. Eine Reihe von Agonisten sind in der Lage den Prozess der elektromechanischen Kopplung zu aktivieren. Dazu zählen u. a. die Transmitter des SNS.

Bei vielen arteriellen Widerstandsgefäßen, einschließlich denen der renalen Mikrozirkulation, induziert NA neben der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR auch einen extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran durch Depolarisations-induzierte Aktivierung spannungsgesteuerter L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle [218]. Sowohl die NA-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration isolierter afferenter renaler Arteriolen als auch deren Kontraktion wird durch die Applikation von Nifedipin in *in-vivo*-Experimenten um circa 50 % abgeschwächt [214-215]. Diese Ergebnisse stützen die Bedeutung Dihydropyridin-sensitiver Ca^{2+} -Kanäle für die Gefäßkontraktion nach Stimulation mit NA. Die Depolarisation der Zellmembran wird weiterhin durch Inhibition von K^+ -Kanälen, Aktivierung von Cl^- -Kanälen und/oder Aktivierung von TRP-Kanälen („transient receptor potential

channel“, TRP-channel) ausgelöst [130]. TRP-C1/TRP-C5 können durch PLC β -gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind. Darüber hinaus können L-Typ-Ca²⁺-Kanäle direkt oder indirekt durch GTP-bindende Proteine und/oder Proteinkinasen in Abwesenheit einer Membrandepolarisation aktiviert werden [130]. Es besteht hohe Evidenz dafür, dass neben den Dihydropyridin-sensitiven L-Typ-Ca²⁺-Kanälen weitere Ionenkanäle für den Ca²⁺-Einstrom aus dem EZR verantwortlich sind. Dazu zählen die ebenfalls spannungsgesteuerten T- und P/Q-Typ-Ca²⁺-Kanäle und die spannungsunabhängigen nichtselektiven Kationenkanäle [98-99;214]. *Ex-vivo*-Experimente haben gezeigt, dass isolierte renale Widerstandsgefäße nach NA-Stimulation in nominell Ca²⁺-freier Badlösung mit einer stärkeren Abschwächung (80 bis 90 %) des Anstiegs der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration reagieren als bei pharmakologischer L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade in Badlösung mit physiologischer Ca²⁺-Konzentration [214]. Diese Befunde sprechen für das Vorhandensein alternativer Ca²⁺-Eintrittsmechanismen.

Die Klassifikation der VDCC erfolgt nach pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften in drei Gruppen Cav1 bis Cav3 [112]. Cav1 und Cav2 bilden die Familie der hochspannungsaktivierten Ca²⁺-Kanäle („high-voltage activated“, HVA) und unterscheiden sich von der Familie der niedrigspannungsaktivierten Kanäle („low-voltage activated“, LVA), zu denen die Gruppe der Cav3 zählt (Tab. 1-1) [112].

Tab. 1-1 Übersicht der spannungsgesteuerten Calciumkanäle - Nomenklatur und Vorkommen (modifiziert nach: „Hayashi et al. „CircRes 100; 2007“)

Familie	Gruppe	Subgruppe	porenbildende Untereinheit	Gen	Lokalisation
HVA	Cav1	L-Typ	Cav1.1 (α 1S)	CACNA1S	Skelettmuskel
			Cav1.2 (α 1C)	CACNA1C	Herz, ZNS, Niere, glatte Muskulatur
			Cav1.3 (α 1D)	CACNA1D	ZNS, Niere, Pankreas
			Cav1.4 (α 1F)	CACNA1F	Retina
	Cav2	P/Q-Typ	Cav2.1 (α 1A)	CACNA1A	ZNS, Niere, Hypophyse
		N-Typ	Cav2.2 (α 1B)	CACNA1B	ZNS
R-Typ		Cav2.3 (α 1E)	CACNA1E	Herz, ZNS, Hypophyse	
LVA	Cav3	T-Typ	Cav3.1 (α 1G)	CACNA1G	ZNS, Niere
			Cav3.2 (α 1H)	CACNA1H	Herz, ZNS, Niere, Leber
			Cav3.3 (α 1I)	CACNA1I	ZNS

Die VDCC der Familie der HVA bestehen aus einer porenbildenden, den Spannungssensor enthaltenden α 1-Untereinheit und den regulatorischen β -, α 2 δ - und γ -Untereinheiten. Im Gegensatz dazu werden die T-Typ-Kanäle aus der Familie der LVA funktionell als einzelne

α 1-Untereinheit betrachtet, wobei die Bedeutung zusätzlicher Untereinheiten für die Funktion der Kanäle bisher nicht abschließend geklärt werden konnte [112]. Menschliche Nierengefäße und die der Ratten exprimieren die α 1-Untereinheiten der L-Typ- ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$), T-Typ- ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$) und P/Q-Typ-Kanäle ($Ca_v2.1$) [102]. Tierexperimentelle Studien konnten für glatte Muskelzellen der präglomerulären Gefäße sowohl VDCC vom L-Typ ($Ca_v1.2$), T-Typ ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$) als auch P/Q-Typ ($Ca_v2.1$) nachweisen. [11;98-99]. Postglomeruläre Gefäße zeigen ein uneinheitliches Expressionsmuster der VDCC. Für efferente Arteriolen juxtamedullärer Glomeruli konnten VDCC vom L-Typ ($Ca_v1.2$) und T-Typ ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$) identifiziert werden. Hingegen konnten bei efferenten Arteriolen kortikaler Glomeruli nur VDCC von T-Typ nachgewiesen werden [99;194].

Die heterogene Verteilung der VDCC innerhalb der renalen Mikrozirkulation besitzt große Relevanz für die vasodilatorischen Effekte von Ca^{2+} -Kanalinhhibitoren. Untersuchungen haben gezeigt, dass L-Typ-spezifische Ca^{2+} -Kanalblocker (Nifedipin, Amlodipin, Nicardipin) die NA- und ANGII-induzierte Vasokontraktion vornehmlich bei afferenten Arteriolen antagonisieren. Im Unterschied dazu vermitteln Ca^{2+} -Kanalblocker mit Selektivität für L- und T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Mibefradil, Efonidipin, Benidipin, Manidipin) sowohl bei vorkontrahierten afferenten als auch efferenten Arteriolen eine konzentrationsabhängige Vasodilatation [100]. In *in-vivo*-Versuchen konnten diese Befunde bestätigt werden [113]. Zudem hat die inhomogene Verteilung der VDCC in der renalen Mikrozirkulation klinische Relevanz. Aktuell wurde in mehreren klinischen Studien gezeigt, dass Ca^{2+} -Kanalblocker mit hoher Selektivität für T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle im Vergleich zu herkömmlichen L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockern zusätzliche positive Auswirkungen auf Nierenfunktion und arteriellen Blutdruck haben [184]. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass arterielle Hypertonie mit Zunahme der Dichte und Aktivität von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen bei renalen Widerstandsarterien assoziiert ist [190]. Für Mesenterial- und Femoralarterien adulter SHR konnte im Vergleich zu WKY ebenfalls eine gesteigerte Expression von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen des Subtyps $Ca_v1.2$ nachgewiesen werden [195]. Isolierte Mesenterialarterien von SHR reagierten mit signifikanter Vasokontraktion nach Stimulation mit S(-)-BayK8644, einem Aktivator von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen [195].

Der Beitrag der Membrandepolarisation für die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration afferenter und efferenter Arteriolen wurde in zahlreichen Studien untersucht [34;102;163]. Unter experimentellen Versuchsbedingungen wird die Depolarisation der Zellmembran durch Einsatz von Kaliumchlorid (KCl) erreicht. Afferente Arteriolen zeigten unter L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockade mittels Nifedipin verglichen mit Kontrollversuchen ohne Kanalblockade eine Abschwächung der KCl-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung [34]. Im Gegensatz dazu hatte die Inhibition der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle bei efferenten Arteriolen keinen Effekt auf die KCl-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung [34]. Diese Daten

unterstützen die Hypothese, dass der Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle vor allem für präglomeruläre Gefäße einen entscheidenden Beitrag zur glattmuskulären Kontraktion leistet. Der Einstrom von Ca^{2+} aus dem EZR durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle wird als „L-Typ Calcium Channel Sparklets“ bezeichnet [9].

Über die Integration der T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in intrazelluläre Signalkaskaden ist bisher wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die α_1 -Untereinheit des T-Typ- Ca^{2+} -Kanals durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II („ Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase“, CAMK) phosphoryliert wird und so zur Modulation beiträgt [255]. Weiterhin wird ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von T-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern diskutiert [101].

Studien an vaskulären glatten Muskelzellen identifizierten einen weiteren Mechanismus, welcher für den transmembranären Einstrom von Ca^{2+} -Ionen verantwortlich ist und durch Ca^{2+} -Depletion des SR aktiviert wird [37;65]. Um den anhaltenden Ca^{2+} -Verlust der internen Speicher zu kompensieren, werden im Anschluss an die Ca^{2+} -Freisetzung sogenannte Speicher-operierte Ca^{2+} -Kanäle („store-operated channel“, SOC) aktiviert [65]. Als SOC wurden sowohl TRP-Kanäle, als auch CRAC-Kanäle („Calcium release-activated channel“) identifiziert [31]. Die Existenz dieser Speicher-operierten Regulationswege wurde auch für Gefäße der renalen Mikrozirkulation bestätigt [68-70]. Die intrazellulären Signalmechanismen, welche die Ca^{2+} -Speicherentleerung mit der Aktivierung der SOC verbinden, sind bisher nur unzureichend verstanden [65;111]. Neueste Studien weisen dem in der Membran des SR lokalisierten Protein STIM1 eine große Bedeutung zu. Es übernimmt die Funktion eines Ca^{2+} -Sensors und vermittelt möglicherweise den Ca^{2+} -Status des SR an die SOC [31].

Der sekundäre Botenstoff DAG vermittelt direkt die Öffnung von TRP-C3/TRP-C6-Kanälen. Nachfolgend kommt es zum Einstrom von Ca^{2+} - bzw. Na^+ -Ionen und zur Membrandepolarisation. Beide Kanäle werden auch als DAG-sensitive TRP-C-Kanäle bezeichnet, wodurch eine Rezeptor-operierte Kanalöffnung („receptor-operated channel“, ROC) ermöglicht wird [65]. Kürzlich konnte ein weiterer Mechanismus identifiziert werden, welcher zur Aktivierung der ROC beiträgt. Wahrscheinlich sind α_1 -Adrenorezeptoren über das Protein Snapin mit intrazellulären Vesikeln verbunden, in deren Membran TRP-C6-Kanäle integriert sind. Nach NA-induzierter Rezeptoraktivierung fusionieren diese Vesikel mit der Zellmembran, wodurch die Zahl von Ca^{2+} -Eintrittswegen in glatte Muskelzellen erhöht wird [236]. Isolierte Interlobararterien zeigten, dass die Stimulation der α_1 -Adrenorezeptoren durch NA vor allem zur Aktivierung von ROC führt [65]. Der Ca^{2+} -Einstrom über SOC scheint nach Rezeptorstimulation mit NA-Konzentrationen im physiologischen Bereich keinen wesentlichen Beitrag für die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu leisten [65].

1.3 Sympathische Denervierung in der Behandlung der arteriellen Hypertonie

Auf Grund der hohen Mortalität von Patienten mit schweren Formen der arteriellen Hypertonie und dem Fehlen effektiver medikamentöser Therapiemöglichkeiten wurden schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts Operationen am SNS mit dem Ziel der Blutdrucksenkung vorgenommen [187]. Bemerkenswerte Resultate erbrachte die radikale lumbodorsale Splanchniektomie, welche 1938 von R.H. Smithwick entwickelt wurde. Die chirurgischen Eingriffe führten sowohl zur Senkung des arteriellen Blutdrucks als auch zur Senkung der Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse. Die entscheidenden Nachteile dieser Methode waren jedoch erhebliche, nicht kontrollierbare und damals nicht vorhersehbare Nebenwirkungen [230-231]. In der jüngsten Vergangenheit erfolgte mit der Entwicklung von Techniken zur renalen Denervierung (RDN) die Einführung einer neuen, innovativen Therapieoption für die Behandlung der therapieresistenten Hypertonie [63;138]. Laut Definition der European Society of Hypertension (ESH) spricht man von einer therapieresistenten oder refraktären Hypertonie, wenn ein therapeutischer Plan, der die Beachtung von Lebensstilveränderungen und Verordnung von mindestens drei Medikamenten in adäquater Dosis umfasst, nicht ausreicht, um den systolischen und diastolischen Blutdruck zufriedenstellend zu senken [1]. Durch experimentelle Untersuchungen ist gut belegt, dass die Denervierung der Nieren bei ätiologisch unterschiedlichen Hypertonieformen langfristig eine Blutdrucksenkung bewirkt. Diese Effekte wurden im Wesentlichen auf eine Reduktion des sympathischen Einflusses auf die Nieren zurückgeführt [54;92]. Auf Grund dieser Beobachtungen und der Demonstration, dass die Aktivität renaler sympathischer Nerven bei der essentiellen Hypertonie verstärkt ist, erfolgte die Einführung der RDN als neue Behandlungsstrategie [60].

Die Methode der RDN ist eine minimal-invasive, Katheter-basierte Intervention, bei der unselektiv afferente und efferente renale Nervenfasern der Tunica Adventitia der A. renalis mittels Radiofrequenzablation zerstört werden [249]. Durch lokale Applikation energiereicher elektromagnetischer Wellen wird die funktionelle Denervierung der Nieren erreicht [249]. Aus bisherigen Ergebnissen geht hervor, dass die Eingriffe in 98 % der Fälle ohne Komplikationen durchgeführt werden konnten [2;63;138]. Mehrere klinische Studien konnten in Follow-up-Untersuchungen eine Senkung des Blutdrucks nach erfolgter RDN nachweisen. In der Symplicity HTN-1-Studie wurde eine mittlere Senkung des systolischen Blutdrucks von 27 mmHg (nach 12 Monaten) registriert [138]. Die Symplicity HTN-2-Studie zeigte nach 6 Monaten einen Vorteil von 32 mmHg [63]. Im Gegensatz dazu zeigte die 2014 präsentierte Symplicity HTN-3 Studie (randomisierte Doppelblindstudie) keinen Effekt der Nierendenergieung auf den arteriellen Druck, was den zuvor publizierten positiven Ergebnissen widersprach [20].

Zeitgleich mit der Einführung der RDN entstand ein erneutes Interesse an der Forschung auf dem Gebiet des sympathischen Nervensystems. Im Vordergrund standen dabei Untersuchungen zu den Auswirkungen der perivaskulären sympathischen Denervierung auf die Gefäß- und Nierenfunktionen [53;76;166;199]. Die Auswirkungen der sympathischen Denervierung können auf Grund von regionalen und geschlechtsspezifischen Unterschieden der neuronalen Kontrolle der Gefäßfunktion zwischen verschiedenen Gefäßbetten und Geschlechtern variieren [33;50;126;129;135].

Die neonatale Sympathektomie verhindert bei SHR die Entwicklung der arteriellen Hypertonie und führt zur langfristigen Senkung des arteriellen Blutdrucks [93;148]. Es zeigte sich jedoch auch bei SHR nach neonataler Sympathektomie ein signifikant erhöhter Blutdruck im Vergleich zu gleichaltrigen WKY [148]. Studien, in denen die neonatale Sympathektomie mit der bilateralen chirurgischen Entfernung des Nebennierenmarks kombiniert wurde (nachfolgend bezeichnet als kombinierte neonatale Sympathektomie), haben eine Senkung des Blutdrucks von behandelten SHR auf das Niveau der WKY gezeigt [147]. Im Gegensatz dazu kommt es bei WKY sowohl durch die neonatale sympathische Denervation als auch bei Kombination beider Verfahren zu keinem signifikanten Abfall des arteriellen Blutdrucks [147-148]. Des Weiteren führte die kombinierte neonatale Sympathektomie sowohl bei SHR als auch bei WKY zu einer Abnahme der Katecholaminkonzentration in vielen Geweben [147]. Die Herzfrequenz unterschied sich bei WKY und SHR nicht zwischen sympathektomierten Ratten und schein-sympathektomierten Kontrolltieren [147]. Neben den oben beschriebenen funktionellen Veränderungen nach sympathischer Denervierung kommt es auch zu strukturellen Veränderungen an verschiedenen Strukturen des Herz-Kreislauf-Systems. Studien haben gezeigt, dass die Nieren, das Herz und die Nebennieren von SHR ein höheres Gewicht hatten als die der WKY. Nach kombinierter neonataler Sympathektomie reduzierte sich das Gewicht der Organe von SHR auf das Niveau von denen der WKY [147]. Darüber hinaus haben Nierentransplantationsstudien gezeigt, dass es nach kombinierter neonataler Sympathektomie zur Senkung des renalen Gefäßwiderstands kommt [223]. Im Bereich der mesenterialen Widerstandsarterien haben Untersuchungen gezeigt, dass die Entstehung der Mediahypertrophie bei SHR durch die neonatale Sympathektomie verhindert wird [148].

In Nierentransplantationsstudien konnte für verschiedene Rattenstämme registriert werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Blutdruckhöhe des Nierenspenders und der Höhe des Blutdrucks nach Nierentransplantation beim Empfänger des transplantierten Organs besteht [201-202]. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivität des SNS einen Einfluss auf die Entwicklung der Posttransplantationshypertonie hat. Nierentransplantate von SHR führten zu einer geringeren Erhöhung des Blutdrucks bei neonatal sympathektomierten Empfängern (F₁H) verglichen mit schein-sympathektomierten Empfängern [93]. Des Weiteren konnte bei

verschiedenen hypertensiven Rattenstämmen, denen Organe aus dem jeweiligen normotensiven Kontrollstamm transplantiert wurden, eine Senkung des Blutdrucks nach Nierentransplantation beobachtet werden [90;201-202].

Untersuchungen isolierter renaler Interlobar- und Mesenterialarterien hypertensiver Ratten haben gezeigt, dass nach neonataler sympathischer Denervation gehäuft eine erhöhte vaskuläre Empfindlichkeit gegenüber NA besteht [91;110;148]. Eine erhöhte Sensitivität der Gefäßkontraktion nach neonataler Sympathektomie gegenüber NA konnte auch für verschiedene Gefäßbetten normotensiver WKY beobachtet werden [148;206;229]. Die Mechanismen, welche zur NA-Supersensitivität nach neonataler Sympathektomie beitragen, sind bisher jedoch nur unzureichend untersucht. Es ist bekannt, dass es nach Sympathektomie zu einer gesteigerten Expression und Empfindlichkeit von Adrenorezeptoren kommt [4;46;258]. Auf Grund von Befunden, welche eine verstärkte Vasokontraktion nach Sympathektomie auch für Nicht-Adrenorezeptor-Agonisten zeigen, lässt sich die erhöhte NA-Sensitivität nicht allein durch Veränderungen auf Rezeptorebene erklären [206]. Es konnte gezeigt werden, dass isolierte renale Widerstandsarterien neonatal sympathektomierter SHR eine verstärkte Vasokontraktion nach L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivierung mittels S(-)-BayK8644 entwickeln [91]. Des Weiteren zeigten isolierte Gefäßpräparate der A. saphena normotensiver Ratten nach sympathischer Denervation eine erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit [197]. Zusammengefasst deuten diese Befunde darauf hin, dass es nach neonataler Sympathektomie zusätzlich zu Veränderungen in L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-abhängigen Signalwegen und/oder zur Modulation der RhoA/Rho-Kinase(ROCK)-Signalkaskade kommt.

Denkbar ist, dass die verstärkte Aktivierung der RhoA/Rho-Kinase(ROCK)-Signalkaskade die Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente glatter Gefäßmuskelzellen erhöht und so zu einer gesteigerten Gefäßkontraktion nach Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen in denervierten arteriellen Gefäßen führt [176]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die fehlende sympathische Innervation zu Veränderungen der Kanalexpression oder des glattmuskulären Membranpotentials mit der Folge eines erhöhten Ca^{2+} -Einstroms durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle führt [84;109]. Das Gewinnen neuer Erkenntnisse über die Auswirkungen der sensorischen und sympathischen Denervierung auf die Funktionen der renalen Widerstandsgefäße hat einen hohen Stellenwert. Weiterführende Grundlagenforschung auf diesem Gebiet kann einen entscheidenden Beitrag zum besseren Verständnis der langfristigen Effekte der RDN als Therapieoption zur Behandlung der arteriellen Hypertonie leisten [115].

1.4 Zielstellung und Arbeitshypothesen

Die detaillierte Untersuchung der Regulation der Gefäßkontraktilität renaler Widerstandsgefäße durch das SNS ist von großem Interesse, um dessen Beitrag zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der eH zu verstehen. Die präglomerulären Arteriolen – u.a. die Interlobararterien – sind wichtige Regulatoren des renalen Gefäßwiderstands und des glomerulären Kapillardrucks. Dadurch sind diese Gefäße in der Lage, große Auswirkungen auf den systemischen Blutdruck zu entfalten. Zurzeit sind die Beiträge einer veränderten ROCK-abhängigen Ca^{2+} -Sensitivität und eines möglicherweise veränderten Ca^{2+} -Einstroms über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle für die gesteigerte NA-Sensitivität nach neonataler Sympathektomie unbekannt. Zur Durchführung der selektiven sympathischen Denervation wurde das Modell der chemischen Sympathektomie, welches zur selektiven Entfernung von sympathischen Nervenfasern führt, mit der chirurgischen Entfernung des Nebennierenmarks kombiniert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Mechanismen, welche zur NA-Supersensitivität renaler Widerstandsarterien nach neonataler Sympathektomie beitragen.

Folgende Fragestellungen wurden mittels experimenteller Methoden untersucht:

1. Führt die sympathische Denervierung von Wistar-Ratten zu einer verstärkten Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-abhängigen Signalwegen in glatten Muskelzellen renaler Widerstandsgefäße?
2. Führt die sympathische Denervierung von Wistar-Ratten zu einer verstärkten Aktivierung der RhoA/Rho-Kinase(ROCK)-Signalkaskade in glatten Muskelzellen renaler Widerstandsgefäße?
3. Induziert die neonatale Sympathektomie eine Erhöhung des Proteingehalts von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen in glatten Gefäßmuskelzellen renaler Widerstandsgefäße?
4. Induziert die neonatale Sympathektomie eine Veränderung des Membranpotentials in Gefäßmuskelzellen renaler Widerstandsgefäße?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte und Hilfsmittel

Tab. 2-1 Laborgeräte und Hilfsmittel

Laborgeräte / Hilfsmittel	Firma
Amplifier Elektrometer Intra 767	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Breadboard (Luftfedertisch)	Newport Corporation, Irvine, CA, USA
Brutschrank Heraeus® Funktion Line B6/UB6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Chemilumineszenz-System ChemiDoc™ XRS	BioRad, München, D
Flaming/Brown Micropipette Puller P-97	Sutter Instruments, Novato, CA, USA
Feinwaagen: BP110S / MC1/LC220S	Sartorius, Göttingen, D
Mikroplatten-Leser FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, D
Fokusmotor EMS-2 für Carl Zeiss Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Kaltlichtquelle KL1500 electronic	Leica, Wetzlar, D
Magnetrührgeräte MR1000 / MR3001	Heidolph, Schwabach, D
Mikropräparierscheren (Spring Scissors)	Fine Science Tools (F-S-T), Heidelberg, D
Mikroskope: Leica MZ6 Stemi 200-CS	Leica, Wetzlar, D Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Mini-PROTEAN® Handcast Systems	BioRad, München, D
Dual Wire Myograph Model 410A Single Wire Myograph Model 310A	Danish Myo Technology A/S (DMT), Aarhus, DK
Myo-Interface Model 410A Myo-Interface Model 310A	Danish Myo Technology A/S (DMT), Aarhus, DK
Oszilloskop HAMEG HM507	HAMEG Instruments GmbH, Mainhausen, D
Perfusionspumpe Flocon 1003	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, D
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen, D
Piezo-Electronic Micromanipulator PM10	Märzhäus Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, D
Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, D
Präzisionspinzetten	Manufactures D'Outils Dumont, Montignez, CH
Schüttel- und Schwenkplattformen: The Belly Dancer PMR-30 Compact Platform Rocker	Stovall Lifescience, Peosta, IA, USA Grant Instruments, Cambridge, UK

Material und Methoden

Laborgeräte / Hilfsmittel	Firma
SDS-Page Elektrophoresekammern: Mini-PROTEAN® Tetra Cell (2*12-Taschen) Criterion™ Cell (2*18-Taschen)	BioRad, München, D
Thermomixer 5437	Eppendorf AG, Hamburg, D
Thermostate: Einhängethermostat 6A Umwälzthermostaat 6B	Julabo, Seelbach, D
Touch Down Hybrid Thermal Cycler	MWG-Biotech/Eurofins Genomics, Ebersberg, D
Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD2070	Bandelin Electronic GmbH & Co.KG, Berlin, D
Vakuumpumpe Typ 2522C-02	Welch®, Niles, IL, USA
Vortexmischer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, D
Wasserbad Julabo 6A	Julabo, Seelbach, D
Western-Blot-Kammern (Blotkammer): Mini Trans-Blot® Cell (2*12-Taschen) Criterion™ Blotter (2*18-Taschen)	BioRad, München, D
Zentrifugen: Mikrozentrifuge Pico 21 Tischkühlzentrifuge Sigma 3-18K (Rotor: 12131-H) Ultrazentrifuge Optima™ TLX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Sartorius, Göttingen, D Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 2-2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma
Fiber Foam Pads	BioRad, München, D
Gelkammern: Mini-PROTEAN® Empty Cassettes Criterion Empty Cassettes	BioRad, München, D
Glaskapillaren	Sutter Instruments, Novato, CA, USA
Mullkompressen 5x5 cm, 12-fach	Fuhrmann GmbH, Much, D
Myographiedraht \varnothing 40 μ m	Danish Myo Technology (DMT), Aarhus, DK
Nitrocellulosemembranen 0,2 μ m	BioRad, München, D
RP New Medical X-Ray Screen Blue Sensitive	CEA GmbH, Hamburg, D
Whatman® Filterpapier	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

2.1.3 Chemikalien und Substanzen

Tab. 2-3 Chemikalien und Substanzen

Chemikalie	Firma
Entwickler G153 A und G153 B Fixierer	AGFA, Mortsel, BE
Bradford-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Clarity Western ECL Substrate Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, München, D
Braunol® / Softasept® N	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
β-Mercaptoethanol DMSO EDTA Ethanol Glycerol Glycin Isopropanol (2-Propanol) Methanol Roti®-Block (TBST/ Stammlösung 10x) SDS TEMED Tris Tris-HCl Tris-Ultra	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Tween®20	Honeywell Specialty Chemicals GmbH, Seelze, D
Calciumchloriddihydrat Kaliumdihydrogenphosphat Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Proteaseinhibitor (PI)	Merck Millipore, Darmstadt, D
Diethylether	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, D
Terallin liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
Calciumchlorid, wasserfrei	SERVA, Heidelberg, D
Acrylamid APS S-(-)-BayK8644 Bromphenolblau BSA Coffein EDTA Glucose Kaliumchlorid Magnesiumsulfat-Heptahydrat Milchpulver Natriumchlorid Natriumdeoxycholat Natriumphosphat Nifedipin Noradrenalin-Bitartrat-Hydrat	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

Material und Methoden

Chemikalie	Firma
Phenylephrin-Hydrochlorid PMSF Ponceau S Triton™ X-100 Trizma®-Base Y-27632-Dihydrochlorid	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
Levcromakalim	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Guanethidin-Monosulfat	Tropitzsch e.K., Marktredwitz, D
Stripping-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Silicon-Kautschuk	Wacker Chemie AG, München, D

2.1.4 Lösungen und Puffer

Tab. 2-4 Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Konzentration
APS / 10% (w/v)	Ammoniumpersulfat A. dest.	1 g ad 10 ml 438 mmol/l
ECL	Lösung A / Lösung B H ₂ O ₂	4 ml / 0,4 ml 1,2 µl
Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer (KRB) (pH 7,4)	NaCl KCl MgSO ₄ *7H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ CaCl ₂ *2H ₂ O Glucose A. dest.	6,91 g 1,6 ml Stammlösung 10 ml Stammlösung 10 ml Stammlösung 40 ml Stammlösung 10 ml Stammlösung 1 g ad 1 l 118,5 mmol/l 4,7 mmol/l 1,2 mmol/l 1,2 mmol/l 25 mmol/l 2,5 mmol/l 5,6 mmol/l
KRB Calcium-frei (pH 7,4)	KRB ohne CaCl ₂ *2H ₂ O EGTA A. dest.	10 ml Stammlösung ad 1 l 1 mmol/l
K125 (pH 7,4)	KCl MgSO ₄ *7H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ CaCl ₂ *2H ₂ O Glucose A. dest.	21,2 ml Stammlösung 5 ml Stammlösung 5 ml Stammlösung 20 ml Stammlösung 5 ml Stammlösung 0,5 g ad 500 ml 125 mmol/l 1,2 mmol/l 1,2 mmol/l 25 mmol/l 2,5 mmol/l 5,6 mmol/l
K125 Calcium-frei (pH 7,4)	K125 ohne CaCl ₂ *2H ₂ O EGTA A. dest.	10 ml Stammlösung ad 1 l 1 mmol/l
Lämmli-Puffer 4x (SDS-Probenpuffer)	Tris SDS Glycerol Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	3,03 g 8 % (w,v) (8 g) 40 % (v/v) (40 ml) 0,05 % (w/v) (0,05 g) 2 % (v/v) (2 ml) 250 mmol/l 277 mmol/l 5,5 mmol/l 0,72 mmol/l 285 mmol/l

Material und Methoden

Lösung / Puffer	Zusammensetzung		Konzentration
	A. dest.	ad 100 ml	
Lysepuffer (10x) (pH 7,4)	Tris-HCl NaCl EDTA Tween® 20 A. dest.	78,8 g 87,7 g 29,2 g 10 ml ad 1 l	500 mmol/l 1500 mmol/l 100 mmol/l 9 mmol/l
Lysepuffer (1x) (pH 7,4)	Lysepuffer (10x) Proteaseinhibitor (PI) PMSF A. dest	500 µl 1 % (v/v) 50 µl 0,5 % (v/v) 25 µl ad 5 ml	
PMSF	PMSF (200 mM) / A. dest	200 mg / 5,74 ml	200 mmol/l
RIPA-Lysepuffer	Na ₃ PO ₄ (pH 7,2) NaCl Triton™ X-100 Natriumdeoxycholat SDS EDTA A. dest	1,64 g 8,77 g 1 % (w/v) (10 g) 1 % (w/v) (10 g) 0,1 % (w/v) (1 g) 0,58 g ad 1 l	10 mmol/l 150 mmol/l 15,5 mmol/l 25,5 mmol/l 3,5 mmol/l 2 mmol/l
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris-HCl A. dest.	14,97 g ad 250 ml	380 mmol/l
SDS-Laufpuffer (10x) (Tankpuffer)	Trizma®-Base Glycin SDS A. dest.	60,1 g 225,2 g 1 % (w/v) (10 g) ad 2 l	248 mmol/l 1,5 mol/l 17,3 mmol/l
Stammlösungen für die Herstellung der Pufferlösungen	KCl A. dest.	220 g ad 1 l	2,95 mol/l
	MgSO ₄ *7H ₂ O A. dest.	26,9 g ad 1 l	120 mmol/l
	KH ₂ PO ₄ A. dest.	16,3 g ad 1 l	120 mmol/l
	NaHCO ₃ A. dest.	52,5 g ad 1 l	625 mmol/l
	CaCl ₂ *2H ₂ O A. dest.	37,6 g ad 1 l	250 mmol/l
	EGTA A. dest	38 g ad 1 l	100 mmol/l
Towbin-Puffer (10x) (Stammlösung)	Tris Ultra Glycin A. dest.	30,3 g 144 g ad 1 l	250 mmol/l 1,92 mol/l
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris-HCl / A. dest.	14,78 g / ad 250 ml	375 mmol/l
TBS (10x) (pH 7,4)	Tris-HCl NaCl KCl A. dest.	39,1 g 81,8 g 2 g ad 1 l	248 mmol/l 1,4 mol/l 27 mmol/l
TBST (1x) (0,1% Tween)	TBS (10x) Tween® 20 A. dest.	100 ml 1 ml ad 1 l	0,9 mol/l

2.1.5 Antikörper

Tab. 2-5 primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Hersteller	Seriennummer
Anti-Aktin	Maus	Merck Millipore, Darmstadt, D	MAB1501R
Anti-Cav1.2	Kaninchen	NeuroMab, Davis, USA	P15381
Anti-GAPDH	Kaninchen	Thermo Scientific, Waltham, USA	PA1-988

Tab. 2-6 sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Spezies	Konjugat	Hersteller	Seriennummer
Anti-Kaninchen IgG	Ziege (goat)	HRP	Bio-Rad, München, D	1706515
Anti-Maus IgG	Ziege (goat)	HRP	Bio-Rad, München, D	1706516

2.1.6 Protein-Größenstandard

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinmoleküle bei der Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde ein Größenmarker verwendet, welcher die Zuordnung von Molekulargewichten in der Größenordnung von 10 kDa bis 250 kDa erlaubt (Abb. 2-1).

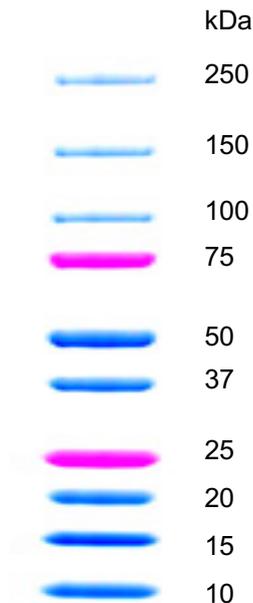


Abb. 2-1 Protein-Größenstandard für die SDS-PAGE. Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

2.1.7 Versuchstiere und Tierhaltung

Alle experimentellen Studien an den Versuchstieren wurden in Übereinstimmung mit den Regelungen und Vorschriften des in der Bundesrepublik Deutschland geltenden Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch die zuständigen Landesbehörden der Bundesländer Mecklenburg-Vorpommern und Baden-Württemberg genehmigt. Die Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten (Nachkommen der ersten Generation, F₁) durchgeführt, welche der Zucht des Instituts für Physiologie der Universität Greifswald entnommen wurden. Als Zuchtpaare dienten Wistar-Ratten (CD:CrI), welche von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Bedingungen aufgezogen. Der Hell-Dunkel-Zyklus in der Tierhaltung betrug 12 Stunden/12 Stunden mit einer Lichtphase von 06.00 bis 18.00 Uhr. Die Aufzucht bzw. Haltung der Tiere erfolgte bei konstanter Raumtemperatur von 22 °C und Luftfeuchtigkeit von 60 %. Als standardisierter Lebensraum dienten Kunststoffkäfige mit Weichholzeinstreu. Je Käfig wurden zwei Tiere gehalten, welche jederzeit freien Zugang zu Standardaufzuchtfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und frischem Leitungswasser hatten. Für die Versuche wurden Ratten im Alter von 9 bis 12 Wochen verwendet.

Für die externen Tierversuche am Centrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim (CBTM) wurde ein Tiertransport organisiert, wodurch Tiere aus eigener Aufzucht untersucht werden konnten. Die Tiere wurden zwei Wochen vor Versuchsbeginn in die Tierhaltung des CBTM integriert und hatten ausreichend Zeit, sich an die neue Umgebung zu adaptieren.

Die Durchführung der Experimente erfolgte nach einem Zwei-Gruppen-Versuchsdesign. Eine Gruppe wurde neonatal sympathektomiert (SYX), die andere erhielt eine Scheinbehandlung (CTR, scheinsympathektomiert). Die Zuordnung der Tiere zu den beiden Versuchsgruppen erfolgte randomisiert. Das mittlere Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Nierenentnahme unterschied sich nicht zwischen beiden Versuchsgruppen. Die Kontrolltiere hatten gegenüber den sympathektomierten Tieren ein signifikant höheres Körpergewicht (Tab. 2-7). Dies wurde auch in experimentellen Studien anderer Arbeitsgruppen beobachtet [124;193].

Tab. 2-7 Alter und Gewicht der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Nierenentnahme

	CTR (n = 36)	SYX (n = 39)
Alter (Wochen)	11,1 ± 0,22	10,6 ± 0,19
Körpergewicht (g)	422,6 ± 10,73	387,6 ± 9,14 *

Mittelwerte ± SEM; * p < 0,05 vs. CTR

2.2 Methoden

2.2.1 Neonatale Sympathektomie und Scheinsympathektomie

In der vorliegenden Arbeit wurde die neonatale Sympathektomie an juvenilen Wistar-Ratten durch eine Kombination aus pharmakologischer Behandlung mit Guanethidin-Monosulfat und anschließender bilateraler mikrochirurgischer Resektion des Nebennierenmarks durchgeführt. Das Modell der Sympathektomie durch Guanethidin-Injektionen wurde erstmals 1968 von J. Jensen-Holm und P. Juul beschrieben [119]. Die chronische Guanethidin-Behandlung führt zur spezifischen und anhaltenden Destruktion des peripheren SNS. Sowohl die somatoefferenten (motorischen), somato- und viszeroafferenten (sensorischen), parasymphatischen und zentralen sympathischen Nervenfasern bleiben in ihren Funktionen erhalten [17;124].

Guanethidin ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Antihypertensiva und liegt in Arzneimitteln als Guanethidin-Monosulfat vor. Chemisch handelt es sich um ein Guanidin-Derivat. Guanethidin hat eine sehr hohe Affinität zum NA-Transportsystem der präsynaptischen axonalen Plasmamembran [175]. Des Weiteren interferiert Guanethidin mit den Speichervesikeln adrenerger Neurone. Diese Eigenschaften führen dazu, dass Guanethidin in den Vesikeln der synaptischen Endigung akkumuliert und weniger NA in den Synapsen gespeichert bzw. exzitatorisch in den synaptischen Spalt freigesetzt werden kann [208]. Zudem sind immunologische Prozesse an dem durch Guanethidin-induzierten Funktionsverlust der Neurone beteiligt [120]. Guanethidin kann die Blut-Hirn-Schranke auf Grund seiner polaren Molekülstruktur nicht überwinden und somit nicht in das ZNS eindringen und akkumulieren. Die zentralen adrenergen Neurone werden dadurch nicht affektiert und die NA-Konzentration im Gewebe zentraler Strukturen bleibt unbeeinflusst [22;95]. Weiterhin wurde beschrieben, dass die Nebennieren als kompensatorische Reaktion auf die Sympathektomie vermehrt Katecholamine bilden und freisetzen [261]. Um die Plasma- und Gewebekonzentrationen der Katecholamine dauerhaft zu senken, ist daher eine Kombination aus Guanethidin-Injektion und Entfernung des Nebennierenmarks notwendig.

Die juvenilen Wistar-Ratten erhielten nach der Geburt vom fünften bis zum 28. Lebenstag täglich eine intraperitoneale Injektion Guanethidin-Monosulfat. Es wurden 50 µg/g Körpergewicht appliziert. Der Wirkstoff wurde in isotoner Kochsalzlösung gelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Im Anschluss an die Guanethidin-Injektionen erfolgte am 29. postnatalen Tag die bilaterale Resektion des Nebennierenmarks. Vor dem mikrochirurgischen Eingriff erhielten die Tiere eine tiefe Narkose. Anschließend wurde die Haut der Tiere im Bereich der Flanken rasiert und mit Softasept® N desinfiziert. Die Fixierung der Tiere auf dem Operationstisch erfolgte in Seitenlage. Die Eröffnung von Haut, Muskelfaszien und Muskulatur

erfolgte mittels Mikropräparierscheren. Mit Hilfe von Wattestäbchen wurde retroperitoneales Binde- und Fettgewebe entfernt und ein Zugang zu den Nebennieren geschaffen. Nach Darstellung der Nebennieren wurde die Nebennierenrinde mittels einer Kanüle inzidiert. Im Anschluss wurde das Nebennierenmark mit Hilfe einer Pinzette entfernt. Nach der Resektion wurden die Muskel- und Hautschichten durch Nahtmaterial verschlossen und die Operationswunde mit Braunol[®] desinfiziert. Das Nebennierenmark der kontralateralen Nebenniere wurde analog dazu entfernt. Nach dem Ende des Eingriffs wurde die Narkose ausgeschlichen und die Tiere zum Erwachen in die Käfige zurückgesetzt. Zur Validierung des Tiermodells wurden in verschiedenen Studien die Gewebekonzentrationen von NA und die Aktivität der Tyrosinhydroxylase nach neonataler Sympathektomie bestimmt [123-124]. Im Nierengewebe wird die NA-Konzentration im Vergleich zu scheinsympathektomierten Kontrollen auf ca. 10 % gesenkt, in den Nebennieren auf ca. 1 % [93;123;147]. Die Herzfrequenz der Wistar-Ratten wird durch den Eingriff nicht signifikant beeinflusst [147]. Zudem führt die neonatale Sympathektomie bei den Ratten zu einer leichten Reduktion des mittleren arteriellen Blutdrucks (110 ± 3 mmHg vs. 105 ± 2 mmHg, SYX vs. CTR, $p < 0,05$) [106].

Die Scheinsympathektomie der Kontrolltiere erfolgte analog zum Ablauf der neonatalen Sympathektomie. Anstelle von Guanethidin-Monosulfat wurden Jungtieren vom fünften bis zum 28. Lebenstag intraperitoneale Injektionen isotoner Kochsalzlösung appliziert. Am 29. Tag postnatal erfolgte der chirurgische Eingriff. Nach der Eröffnung der Flankenregion durch Inzision der Haut- und Muskelschichten erfolgte die Darstellung der Nebennieren unter Schonung des Nebennierenmarks. Die Scheinsympathektomie wurde durch Verschluss der Operationswunde mit Nahtmaterial und abschließender Wunddesinfektion beendet.

2.2.2 Gewebeentnahme

Die Entnahme der Nieren erfolgte in tiefer Narkose. Durch Anwendung des Zwischenzehenreflexes erfolgte die Überprüfung der Narkosetiefe. Im Anschluss wurden die Tiere im Bereich der Abdominalregion rasiert und in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Zur Desinfektion der rasierten Bauchhaut wurde Softasept[®] N genutzt. Durch einen Medianschnitt entlang der Linea alba wurde die Bauchhaut sowie die darunterliegenden Muskelfaszien samt Muskulatur eröffnet. Der Bauchsitus wurde durch vier Operationshacken offengehalten und fixiert. Ein Entlastungsschnitt in die laterale Bauchhaut sorgte für einen besseren Zugang zu den intraabdominell gelegenen Organen. Anschließend wurde mit Hilfe von Wattestäbchen das Darmkonvolut mobilisiert, aus dem Abdomen entfernt und auf dem Thorax gelagert. Die Nieren – jetzt gut einsehbar – im Retroperitonealraum liegend, wurden stumpf präpariert und mit Hilfe von Präzisionspinzetten und Präparierscheren vom

umliegenden Binde- und Fettgewebe getrennt. Es wurde darauf geachtet, die Capsula fibrosa der Nieren bei der Gewebeentnahme nicht zu beschädigen. Zur Entnahme der Organe mussten die linke und rechte A. und V. renalis sowie beidseitig die Ureteren durchtrennt werden.

Die Tiere starben durch Verbluten in tiefer Narkose. Unmittelbar nach der Gewebeentnahme wurde das Untersuchungsmaterial in ein Becherglas mit eisgekühlter Pufferlösung (KRB-Lösung) überführt. Die Entnahme der Nieren dauerte in der Regel 5 Minuten und erfolgte immer am Morgen zwischen 08.00 und 10.00 Uhr. Bei der Gewebeentnahme konnte an keiner der Nieren eine tumoröse Struktur identifiziert werden, welche zum Ausschluss des Gewebes aus der Versuchsreihe geführt hätte.

2.2.3 Gefäßpräparation

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Interlobararterien (Aa. interlobares), als Vertreter der proximalen renalen Widerstandsgefäße, untersucht. Dabei handelt es sich um Gefäße der dritten Aufzweigungsgeneration der A. renalis.

Die Präparation der Gefäße erfolgte bei 8 bis 40-facher Vergrößerung unter einem Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle. Zu Beginn wurde mit Hilfe einer spitzen, gebogenen Pinzette die Capsula fibrosa der Niere abgezogen und das Fettgewebe am Nierenhilus entfernt. Anschließend wurde das Organ mit einem Skalpell in zwei Hälften geteilt. Der Schnitt erfolgte vertikal durch den Nierenhilus. Beide Arbeitsschritte wurden, um das Organ vor dem Austrocknen zu schützen, auf mit eisgekühlter KRB-Pufferlösung getränkten Mullkompressen durchgeführt. Für die weitere Präparation der Gefäße wurden die Nierenhälften mit Hilfe von Kanülen (MicrolanceTM 3, BD, Heidelberg, Deutschland) auf dem Boden einer mit einem Silikonpolymer ausgegossenen Petrischale fixiert (Abb. 2-2: A). Die Petrischale wurde mit eisgekühlter KRB-Pufferlösung gefüllt, sodass die Nierenhälften komplett bedeckt waren. Ein Wechsel der KRB-Lösung erfolgte alle 5 Minuten. Mit Hilfe von Präzisionspinzetten und Mikropräparierscheren wurde die freiliegende Nierenpapille entfernt (Abb. 2-2: B). Die in den Bindegewebssepten verlaufenden Aufzweigungen der A. renalis waren jetzt gut sichtbar (Abb. 2-2: C). Für die weitere Gefäßpräparation wurde ein Gefäßabschnitt (ohne Abzweigungen) der dritten Aufzweigungsgeneration der A. renalis aufgesucht und vom umliegenden Bindegewebe und Nierenparenchym auf einer Länge von 5 mm freipräpariert (Abb. 2-2: D). Um Läsionen an der Gefäßwand zu vermeiden wurde darauf geachtet, die Gefäße nicht direkt zu berühren. Eine unbeschädigte und intakte Tunica Adventitia war Voraussetzung für die anschließende Untersuchung im Myographen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass renale Widerstandsgefäße mechanosensitive Eigenschaften besitzen. Daher wurde sorgfältig präpariert, um übermäßige Zug- und Scherkräfte auf die Gefäßwand zu vermeiden.

Anschließend wurde die Gefäßwand im proximalen Abschnitt der Arterie eingeschnitten. Durch die entstandene Öffnung wurde ein Edelstahlraht (Länge: 3 cm, \varnothing 40 μ m) eingeführt und unter Vermeidung von Gefäßwandberührungen 3 mm nach distal vorgeschoben. Bei Perforation bzw. Beschädigung der Gefäßwand wurde das Gefäß nicht weiter präpariert und von der weiteren experimentellen Untersuchung ausgeschlossen. Mit Hilfe der Okularmessplatte des Stereomikroskops wurde 2 mm distal der initialen Gefäßwunderöffnung das Gefäß und der Führungsdraht senkrecht zur Gefäßwand mit einer Mikropräparierschere durchgeschnitten. Jetzt konnte der Draht von proximal weiter vorgeschoben und das Gefäß an der proximalen Eröffnungsstelle komplett durchtrennt werden. Im nächsten Schritt wurde ein zweiter Führungsdraht durch das Gefäßsegment geschoben. Beide Drähte sind für die Platzierung des Gefäßsegments in den Myographen notwendig. Abschließend wurde das Gefäßsegment an der Basis vom Bindegewebe getrennt, aus dem umgebenden Nierengewebe entnommen und in eisgekühlter KRB-Lösung bis zur myographischen Untersuchung aufbewahrt.

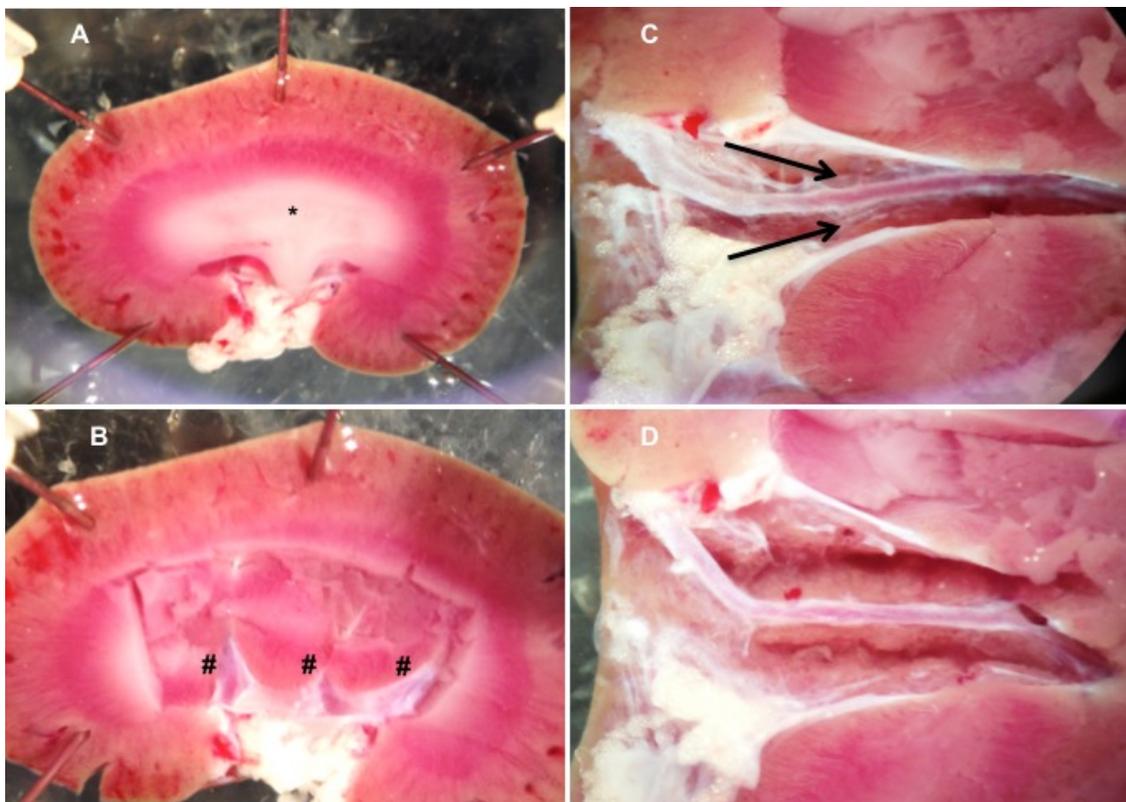


Abb. 2-2 Darstellung der Gefäßpräparation. A Nierenhälfte nach dem Vertikalschnitt durch den Nierenhilus (* Nierenpapille). **B** In den Bindegewebssepten (#) verlaufende renale Widerstandsgefäße nach Entfernung der Nierenpapille. **C** Darstellung der Interlobulararterien (→) nach Eröffnung der Bindegewebssepten, **D** Vom umliegenden Bindegewebe freipräpariertes Interlobargefäß.

Für die Western-Blot-Versuche wurden die Gefäße ohne Führungsdraht und möglichst auf ganzer Länge präpariert, um möglichst viel Ausgangsmaterial für die Proteinextraktion zu gewinnen. Die Gefäße beider Nieren (8 bis 10 Gefäße je Niere) wurden in Eppendorf-Gefäßen gesammelt und in flüssigem Stickstoff bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.4 Small-Vessel-Myographie (SVM)

Die Small-Vessel-Myographie – kurz Drahtmyographie – ist eine *ex-vivo*-Methode zur Untersuchung der Kontraktionseigenschaften von Blutgefäßen unter isometrischen Umgebungsbedingungen. Sie ermöglicht die Untersuchung funktioneller Eigenschaften isolierter Gefäßsegmente durch Applikation gefäßwirksamer Pharmaka oder Variation der Elektrolytzusammensetzung des Organbads. Darüber hinaus sind Untersuchungen zur Gefäßwandmechanik möglich. Das Ausmaß der Vasokontraktion bzw. Vasodilatation wird als Änderung der Gefäßwandspannung registriert. Im Jahr 1961 wurde von D. F. Bohr, P L Goulet und A. C Taquini erstmals eine Methode vorgestellt, welche die Änderung der Wandspannung von kleinen Widerstandsgefäßen ($\varnothing 200\text{ }\mu\text{m}$) registriert. Die eingesetzten Gefäßpräparate waren spiralförmig und entsprachen somit nicht der physiologischen Gefäßorganisation [23]. Die Messung von Wandspannungsänderungen an intakten Gefäßzylindern wurde erstmals im Jahr 1972 von J. A. Bevan und J. V. Osher beschrieben. Sie nutzten einen Kraftwandler und eine Mikrometerkontrolle zur Registrierung der Spannungsänderung [19]. Die Methode der Drahtmyographie – wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wird – wurde 1976 erstmalig von M. J. Mulvany und W. Halpern publiziert [179].

2.2.4.1 Grundlagen und Versuchsaufbau

Für die Untersuchung der kontraktiven Gefäßeigenschaften wurde ein Zwei-Kanal-Drahtmyograph (Dual-Wire-Myograph-System 410A) eingesetzt. Dieses System ermöglicht die zeitgleiche Untersuchung von zwei Gefäßsegmenten. Zentraler Bestandteil des Myographen ist die Organbadkammer mit den beiden Vorrichtungen zur Fixierung der Gefäßsegmente. Die Kammer verfügt über ein Fassungsvermögen von 15 ml und kann entsprechend den experimentellen Anforderungen über ein integriertes Thermostat beheizt werden. Die Fixierung der Gefäße erfolgt durch jeweils zwei Klemmbacken. Eine der Klemmbacken ist mit einem elektromechanischen Kraftwandler, die andere mit einem Mikrometer verbunden. Zusammen bilden sie die Messvorrichtung eines Kanals (Abb. 2-3). Mit Hilfe des Kraftwandlers erfolgt die Registrierung der Wandspannung der Gefäßsegmente. Über die Mikrometerschraube kann der Dehnungszustand der Gefäße verändert werden. Die Vordehnung der Gefäßsegmente erfolgte nach einem standardisierten Protokoll und wird im

Anschluss separat beschrieben (siehe 2.2.4.4). In der vorliegenden Arbeit wurden 10 ml KRB-Pufferlösung als Organbadvolumen und eine Organbadtemperatur von 37 °C als Standard festgelegt. Die Temperatur wurde mit Hilfe einer Sonde fortlaufend überprüft und aufgezeichnet. Die Small-Vessel-Wire-Myographie ist ein sehr sensitives Untersuchungsverfahren. Um Vibrationen am Arbeitstisch zu neutralisieren, wurde der Myograph auf einer dämpfenden Unterlage platziert.

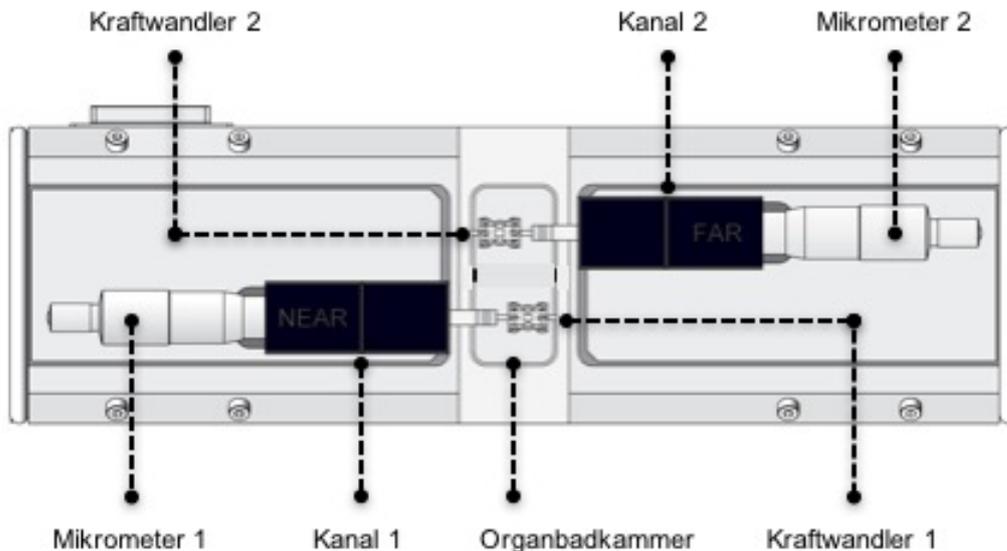


Abb. 2-3 Dual-Wire-Myograph-System 410A. (modifiziert nach: User Guide, Dual-Wire-Myograph-System 420A, Version 1.0, S. 3, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark)

Durch Spannungsentwicklung des Gefäßsegments wird die Zugkraft auf den Kraftwandler übertragen. Die Impulse des Kraftwandlers wurden über eine Schnittstelle (Myo-Interface Model 410A) an einen Laptop (Lifebook C-Series, Fujitsu-Siemens, München, Deutschland) übermittelt. Auf diesem wurden die Daten mittels der Software Myodaq 2.01 (Universität Maastricht, Maastricht, Niederlande) registriert. Die Wandspannung K wurde in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet und wie folgt berechnet:

$$K = \frac{F}{2L} \quad [K] = \frac{\text{N}}{\text{m}} \triangleq \frac{\text{mN}}{\text{mm}}$$

Formel 1 Berechnung der Wandspannung K

Die am Kraftwandler registrierte Kraft F wird durch die zweifache Länge L des Gefäßsegments dividiert. Die Wandspannung K gibt die Kraft entlang des Gefäßumfangs je Einheit Gefäßlänge wieder und trägt die Einheit mN/mm. Die Aufzeichnungsfrequenz kann im Menü der Software festgelegt werden. Die Versuchsdaten in dieser Arbeit wurden mit einer Frequenz von 1 Hz aufgezeichnet.

Während der Versuchsdurchführung wurde das Organbad des Myographen durch eine Kammerabdeckung verschlossen. In der Abdeckung sind für die Applikation von Substanzen bzw. das Nachfüllen und Wechseln der Organbadlösung zwei Öffnungen vorhanden. Des Weiteren sind für beide Kanäle jeweils eine Absaug- und eine Begasungsmöglichkeit in die Abdeckung integriert (Abb. 2-4). Über die Absaugeinrichtung, welche mit einer Vakuumpumpe verbunden ist, können das Organbad gewechselt und pharmakologisch wirksame Substanzen ausgewaschen werden. Zudem kann die Zusammensetzung der Organbadlösung innerhalb eines Versuchs verändert werden. Durch die anderen Öffnungen wurde die Organbadlösung während der Versuche mit medizinischem Carbogen (95 % O₂ / 5 % CO₂) begast.

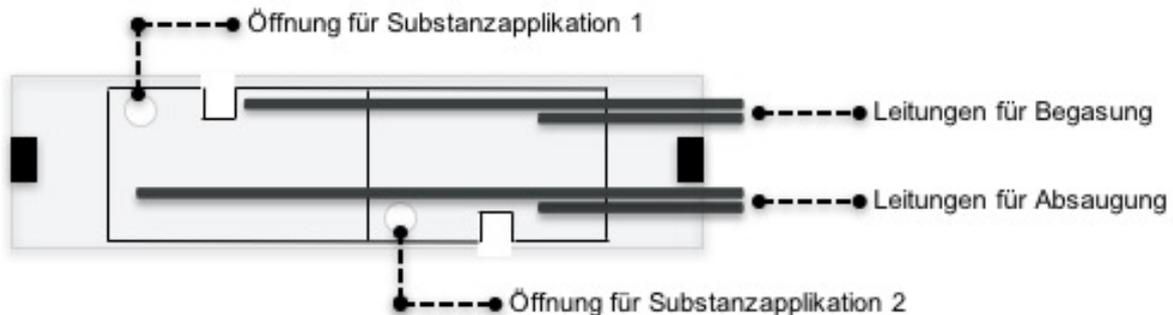


Abb. 2-4 Kammerabdeckung für das Dual-Wire-Myograph-System 410A. (modifiziert nach: User Manual, Dual-Wire-Myograph-System 420A, Version 1.0, S. 9, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark)

Die Begasung ist für die Konstanz des pH-Werts von zentraler Bedeutung. Als Puffersubstanz für die Aufrechterhaltung des pH-Werts wurde NaHCO₃ eingesetzt, welches ein Bicarbonat-Puffer-System bildet. Bicarbonat-Ionen und Protonen stehen über folgende Gleichung mit dem Kohlenstoffdioxid im Gleichgewicht:



Gleichung 1 chemisches Gleichgewicht des Bicarbonat-Puffer-Systems

Da der Kohlenstoffdioxid-Partialdruck (P_{CO₂}) in der Luft um ein vielfaches geringer ist als in der Organbadlösung, wird CO₂ an die umgebende Raumluft abgegeben. Die externe Begasung ist notwendig, um den P_{CO₂} und das Gleichgewicht des Bicarbonat-Puffer-Systems zu stabilisieren.

2.2.4.2 Vorbereitung der Myographie-Versuche

Die mechanoelektrischen Signalwandler im Dual-Wire-Myograph-System 410A sind im Inneren des Metallgehäuses verbaut. Um eine Verbindung der Kraftwandler mit den Klemmbacken herzustellen, befinden sich zwei Öffnungen in den seitlichen Wänden. Zum Schutz der Kraftwandler vor der aggressiven Pufferlösung des Organbads wurden diese mit Dichtungssilikon verschlossen. Vor jeder Benutzung wurde kontrolliert, ob die Silikon-dichtungen unversehrt und dicht sind.

Um zuverlässig reproduzierbare Daten zu erhalten, wurde der Myograph in regelmäßigen Abständen mit Hilfe einer Waage kalibriert. Dafür wurde die Organbadkammer zunächst mit A. dest befüllt und auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde an den Kraftwandlern jeweils ein Edelstahldraht ($\varnothing 40 \mu\text{m}$) gespannt. Die Waage wurde mit dem Hebelarm (HA) zwischen Draht und Klemmbacke platziert (Abb. 2-5). Die Kalibrierung des Systems erfolgte durch ein Gewicht bekannter Masse ($m_{KA} = 2 \text{ g}$), mit welchem der Kraftarm (KA) der Waage belastet wurde. Am Kraftwandler erzeugte das Gewicht eine Kraft (F_{HA}) von 9,81 mN. Nachdem die Kraft von $9,81 \text{ mN} \pm 0,01 \text{ mN}$ für eine Zeitspanne von 10 s konstant bestand, wurde die Kalibrierung beendet und die gleichen Einstellungen am zweiten Kanal vorgenommen.



Abb. 2-5 Kalibrierungswaage für das Dual-Wire-Myograph-System 410A. (modifiziert nach: User Manual, Dual-Wire-Myograph-System 420A, Version 1.0, S. 15, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark)

Die am Myo-Interface 410A angezeigte Kraft (F_{HA}) wird wie folgt nach dem Hebelgesetz berechnet:

$$F_{HA} \times l_{HA} = F_{KA} \times l_{KA} \qquad g = 9,81 \text{ m/s}^2$$

$$F_{HA} = \frac{F_{KA} \times l_{KA}}{l_{HA}} = \frac{m_{KA} \times g \times l_{KA}}{l_{HA}} \qquad l_{HA} = 4 \text{ cm}$$

$$F_{HA} = \frac{0,002 \text{ kg} \times 9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2} \times 0,02 \text{ m}}{0,04 \text{ m}} = 9,81 \times 10^{-3} \frac{\text{kg} \times \text{m}}{\text{s}^2} = 9,81 \text{ mN} \qquad l_{KA} = 2 \text{ cm}$$

Formel 2 Kalibrierung des Myographen

Die verschiedenen Pufferlösungen (KRB, KRB-Ca²⁺-frei, K125 und K125-Ca²⁺-frei) wurden täglich aus vorbereiteten Stammlösungen (KCl, MgSO₄*7 H₂O, KH₂PO₄, NaHCO₃, CaCl₂*2 H₂O) frisch angesetzt. Zur Herstellung der Lösungen wurde destilliertes Wasser aus einer Aufbereitungsanlage verwendet. Mit Hilfe eines Magnetrührgerätes wurden die Bestandteile gelöst und vermischt. Eine Übersicht über die Substanzkonzentrationen in den Pufferlösungen ist Tab. 2-4 zu entnehmen. Die Stammlösungen wurden bei 4 °C aufbewahrt. Die Natriumhydrogencarbonat-Stammlösung wurde vor dem Gebrauch für 1 h mit Carbogen (95 % O₂ / 5 % CO₂) begast. Nach Ansetzen der Pufferlösungen wurde durch Titration mit 1-molarer Salzsäure ein pH-Wert von 7,4 ± 0,01 eingestellt. Die Pufferlösungen wurden im Anschluss durch ein Wasserbad mit Einhängethermostat auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt. Dadurch sollten Temperaturschwankungen beim Wechsel der Organbadlösung verhindert werden.

2.2.4.3 Einbau der Gefäße

Vor Einbau der Gefäße wurde der Myograph auf 37 °C erwärmt und das Organbad mit 10 ml KRB-Lösung befüllt. Die präparierten Gefäße wurden unter einem Stereomikroskop eingebaut. Mit Hilfe der bei der Präparation in die Gefäße eingeführten Drähte wurden die Gefäßsegmente zwischen Kraftwandler und Mikrometerschraube eingespannt. Dazu wurden die Drähte an den Klemmbacken durch Schrauben fixiert (Abb. 2-6).

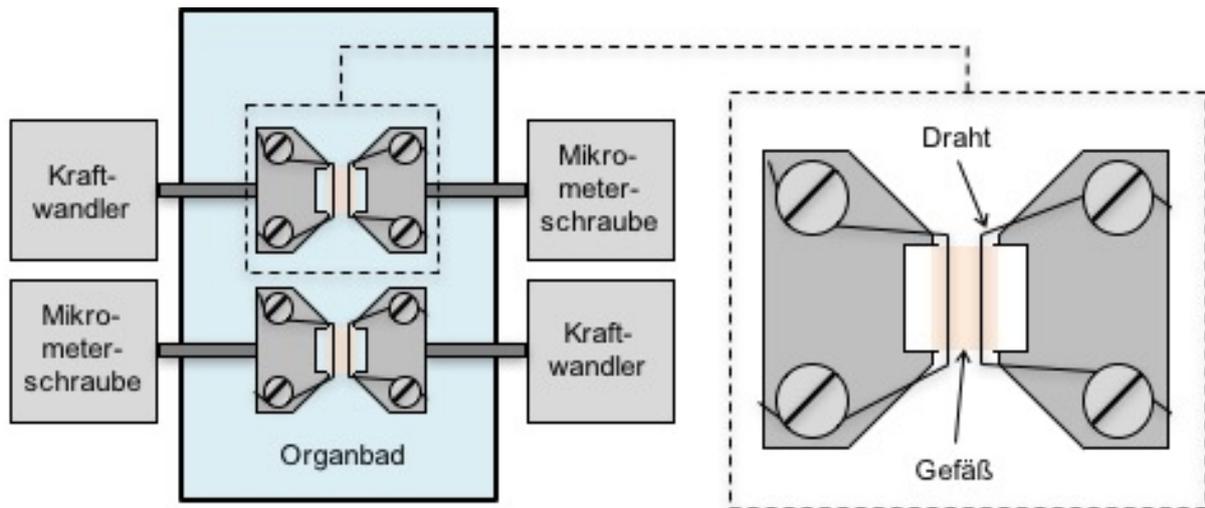


Abb. 2-6 Schematische Darstellung der Gefäßfixierung zwischen den Klemmbacken. Mit Hilfe der Schrauben wurde der Draht eingeklemmt und das Gefäß zwischen Kraftwandler und Mikrometerschraube gespannt.

Die Drähte wurden im Anschluss gespannt und parallel ausgerichtet, sodass sie in der gleichen Ebene lagen. Die Klemmbacken wurden anschließend mit Hilfe der Mikrometerschrauben so positioniert, dass die Drähte maximal dicht beieinander sind, sich jedoch nicht berühren. Nach dem Einbau begann eine 15-minütige Äquilibrationsphase, in welcher die Gefäßsegmente den Grundtonus ihrer Gefäßwandspannung aufbauen konnten.

2.2.4.4 Vordehnung und Vitalitätsprüfung

Der Durchmesser der präparierten Gefäßsegmente variierte zwischen 120 und 160 μm . Für jedes Gefäßsegment existiert ein innerer Gefäßumfang L_1 , bei dem es die größten Wandspannungen erzeugt und die Kontraktilität der glatten Gefäßmuskelzellen am größten ist. Um die Gefäßsegmente untereinander hinsichtlich der erbrachten Wandspannungen vergleichen zu können, wurden sie auf den inneren Gefäßumfang L_1 normalisiert. Der optimale Umfang L_1 wird in Relation zu L_{100} angegeben, wobei L_{100} dem inneren Gefäßumfang entspricht, welchen das Gefäß In-situ bei transmuralen Druck von 100 mmHg (13,3 kPa) annimmt [179]. Es konnte gezeigt werden, dass arterielle Widerstandsgefäße bei einem inneren Umfang, der 90 % von L_{100} entspricht, die größte Gefäßwandspannung entwickeln ($L_1 = 0,9 \times L_{100}$) [179;181]. Für die Segmente anderer Gefäßbetten oder Gefäßarten kann sich der Faktor für die Berechnung von L_1 unterscheiden.

Der optimale Gefäßumfang L_1 wurde in der vorliegenden Arbeit durch schrittweise Vordehnung der Gefäßsegmente bestimmt. Die Vordehnung begann 15 Minuten nach Einbau der Gefäße mit dem Zurücksetzen der „Force“ am Myo-Interface 410A (Abb. 2-7). In Intervallen von zwei Minuten wurde die Mikrometerschraube an beiden Kanälen um je 20 Einheiten weitergedreht, sodass sich die Klemmbacken voneinander entfernten und das Gefäß schrittweise gespannt wurde. Dieser Vorgang wurde an jedem Kanal bis zum Erreichen eines transmuralen Drucks von 13,3 kPa wiederholt. In der Regel wurde dieser Druck nach 6 bis 10 Intervallen erreicht (Abb. 2-7). Anhand der registrierten Kraft, der Länge des Gefäßsegments, dem Durchmesser des Drahts und der Stellung der Mikrometerschrauben wurde durch die Software Myodaq Version 2.01 (Universität Maastricht, Maastricht, NL) die Mikrometerstellung ermittelt, in der die Gefäßsegmente den optimalen inneren Gefäßumfang L_1 annehmen. Das Mikrometer wurde anschließend um die entsprechenden Einheiten zurückgedreht. Nach einer 10-minütigen Äquilibrationsphase wurde die KRB-Lösung gegen kaliumreiche Pufferlösung (K125-Lösung) getauscht. Dadurch kam es zur Depolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen und zur Kontraktion der isolierten Gefäßsegmente (Abb. 2-7). Die Depolarisations-induzierte Kontraktion besteht aus einer initialen phasischen und einer anhaltenden tonischen Komponente. Das Maximum der initialen phasischen Antwort wurde als Bezugswert für alle nachfolgend registrierten Gefäßwandspannungen im Verlauf des Versuchs genutzt. Darüber hinaus diente dieser Wert der Kontrolle der Gefäßvitalität. Im Anschluss wurde die K125-Lösung durch dreimaliges Waschen mit KRB-Pufferlösung ausgewechselt. Vor der Fortführung des Versuchsprotokolls wurde eine 10-minütige Äquilibrationszeit abgewartet. Die Vordehnung der Gefäßsegmente und die anschließende Depolarisations-induzierte Gefäßkontraktion waren in jedem Experiment Bestandteil des Versuchsprotokolls.

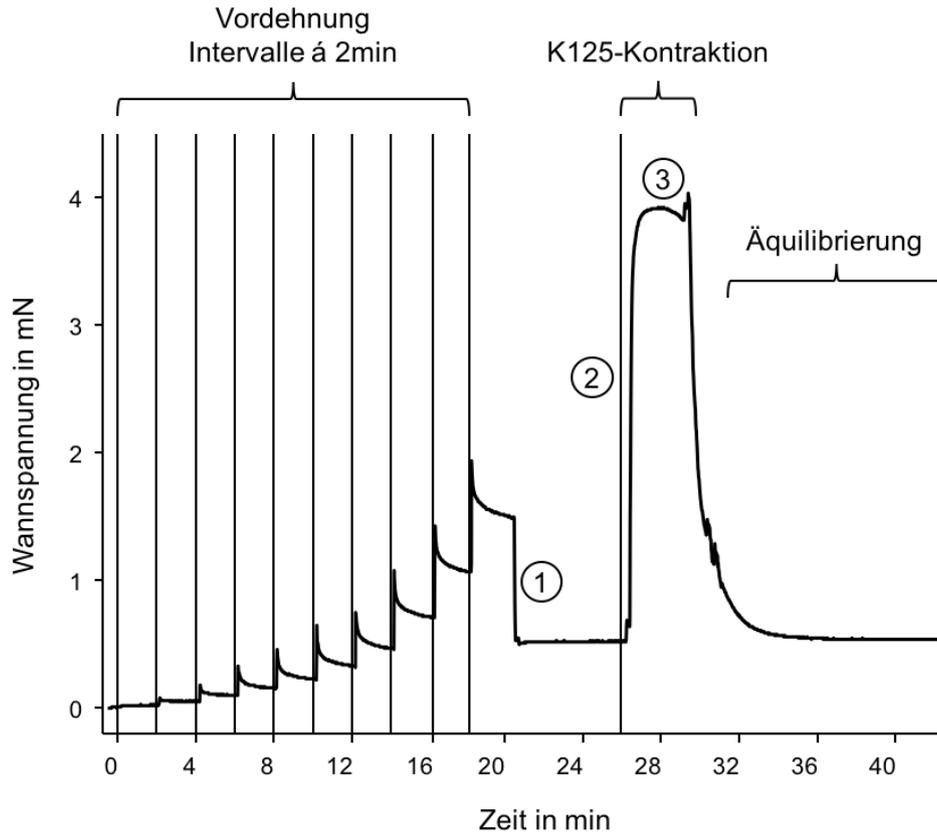


Abb. 2-7 Originalaufzeichnung von Vordehnung und Vitalitätsprüfung eines isolierten Interlobargefäßes. Dargestellt ist die schrittweise Vordehnung der Gefäße, die Rückstellung des Mikrometers auf die optimale Gefäßwandspannung (1) und die Depolarisations-induzierte Vasokontraktion. Die Depolarisations-induzierte Kontraktion (K125-Kontraktion) besteht aus einer schnellen, initialen phasischen Komponente (2) und einer nachfolgenden tonischen Kontraktionskomponente (3). (aufgezeichnet mit Myodaq 2.01)

Die absolute Zunahme der Wandspannung nach Applikation vasoaktiver Substanzen (NA, S(-)-BayK8644, Coffein) wurde auf das Maximum der K^+ -induzierten Gefäßwandspannung normalisiert.

2.2.4.5 Waschvorgang

Um pharmakologisch wirksame Substanzen aus dem Organbad zu entfernen, wurde die Organbadkammer dreimal mit 10 ml KRB-Pufferlösung gespült. Im Anschluss wurde eine 15-minütige Äquibrierungszeit abgewartet, in der die Wandspannung der Gefäße auf ihren Ruhetonus zurückgeführt werden konnte.

2.2.4.6 Versuchsprotokolle

Protokoll 1 Effekt von Nifedipin und Beitrag des Rho-Kinase(ROCK)-Signalweges zur Noradrenalin(NA)-induzierten Vasokontraktion

Im ersten Teil des Versuchs sollte die in Vorversuchen beobachtete erhöhte Sensitivität renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter Tiere gegenüber NA reproduziert werden. Dazu wurden kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Um den Beitrag spannungsgesteuerter L-Typ-Ca²⁺-Kanäle zur gesteigerten NA-induzierten Gefäßkontraktion zu untersuchen, wurde im zweiten Teil des Versuchs eine weitere NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt, jedoch unter L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade mittels Nifedipin. Zur Differenzierung zwischen einer verstärkten Abhängigkeit der NA-induzierten Kontraktion vom extrazellulärem Ca²⁺-Einstrom durch L-Typ-Ca²⁺-Kanäle und/oder einer erhöhten Ca²⁺-Sensitivität wurde getestet, welchen Einfluss die simultane Hemmung der ROCK und L-Typ-Ca²⁺-Kanäle auf die NA-induzierte Vasokonstriktion hat. Hierfür wurde eine dritte NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach Applikation von Y-27632 und Nifedipin erstellt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die in den Vorversuchen gezeigte erhöhte Sensitivität der NA-induzierten Kontraktion gegenüber ROCK-Inhibition, auch nach simultaner L-Typ-Kanalblockade, besteht.

Tab. 2-8 Übersicht Protokoll 1

	Intervention	im Anschluss
1	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquilibration
2	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquilibration
3	kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁸ mol/l – 10 ⁻⁵ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Waschen + 15 min Äquilibration
4	Einzelapplikation Nifedipin (10 ⁻⁵ mol/l)	Einwirkzeit: 15 min
5	kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁸ mol/l – 10 ⁻⁵ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Waschen + 15 min Äquilibration
6	Applikation Nifedipin (10 ⁻⁵ mol/l) + Y-27632 (3x10 ⁻⁶ mol/l)	Einwirkzeit: 15 min
7	kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁸ mol/l – 10 ⁻⁵ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Ende des Protokolls

Protokoll 2 Effekt des L-Typ-Ca²⁺-Kanalöffners S(-)-BayK8644

Für die weiterführende Untersuchung des Einflusses von extrazellulären Ca²⁺-Ionen für die Gefäßkontraktion wurden kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit dem L-Typ-Ca²⁺-Kanalöffner S(-)-BayK8644 erstellt. Der aktivierende Effekt von S(-)-BayK8644 wird durch hochspezifische Bindung an die Dihydropyridin-Bindungsstelle der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle vermittelt [183]. Es konnte kein Effekt von S(-)-BayK8644 auf die Öffnung von T-Typ-Ca²⁺-Kanälen nachgewiesen werden [250]. Um die Beteiligung Ca²⁺-sensitiverer Mechanismen zu testen, wurde der Versuch unter simultaner ROCK-Hemmung wiederholt. Für den zweiten Teil des Protokolls mussten die Gefäße ausgetauscht werden, da sich die Wirkung von S(-)-BayK8644 durch mehrmaliges Waschen nicht in hinreichend kurzer Zeit beenden lässt.

Tab. 2-9 Übersicht Protokoll 2

	Intervention	im Anschluss
1	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquibrierung
2	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquibrierung
3	kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁸ mol/l – 10 ⁻⁵ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Waschen + 15 min Äquibrierung
4	kumulative S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁹ mol/l – 10 ⁻⁶ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Wechsel der Gefäße
5	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquibrierung
6	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquibrierung
7	kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁸ mol/l – 10 ⁻⁵ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Waschen + 15 min Äquibrierung
8	Einzelapplikation Y-27632 (3x10 ⁻⁶ mol/l)	Einwirkzeit: 15 min
9	kumulative S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁹ mol/l – 10 ⁻⁶ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Ende des Protokolls

Protokolle 3 und 4 Beitrag der Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern

Der Beitrag der Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern zur NA-induzierten Vasokontraktion wurde durch pharmakologische Aktivierung der IP₃-R und RyR untersucht. Mit Hilfe dieser Versuche sollte untersucht werden, ob differentielle Antworten nach IP₃-R- bzw. RyR-Stimulation zur gesteigerten NA-induzierten Vasokontraktion nach neonataler Sympathektomie beitragen.

Die Wandspannung der renalen Widerstandsgefäße nach Stimulation mit NA wurde zunächst in KRB-Lösung (physiologische Ca^{2+} -Konzentration = 2,5 mM) und anschließend in Ca^{2+} -freier Organbadlösung bestimmt. In KRB-Lösung mit physiologischer Ca^{2+} -Konzentration wurde der Beitrag von extra- und intrazellulären Ca^{2+} für die NA-induzierte Gefäßkontraktion untersucht. Hingegen wurde in der Ca^{2+} -freien KRB-Lösung die IP_3 -abhängige Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern nach NA-vermittelter α_1 -Rezeptoraktivierung untersucht. Im Anschluss wurde unter ROCK-Inhibition überprüft, ob zwischen beiden Versuchsgruppen eine differentielle ROCK-Abhängigkeit bezüglich der IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung besteht.

Tab. 2-10 Übersicht Protokoll 3

	Intervention	im Anschluss
1	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquilibration
2	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquilibration
3	Einzelapplikation Noradrenalin (10^{-5} mol/l)	Waschen + 15 min Äquilibration
4	Organbadwechsel auf KRB- Ca^{2+} -frei	2 min warten
5	Einzelapplikation Noradrenalin (10^{-5} mol/l)	Waschen + 15 min Äquilibration
6	Einzelapplikation Y-27632 (3×10^{-6} mol/l)	Einwirkzeit: 15 min
7	Einzelapplikation Noradrenalin (10^{-5} mol/l)	Waschen + 15 min Äquilibration
8	Einzelapplikation Y-27632 (3×10^{-6} mol/l)	Einwirkzeit: 15 min
9	Organbadwechsel auf KRB- Ca^{2+} -frei und Einzelapplikation Y-27632 (3×10^{-6} mol/l)	2 min warten
10	Einzelapplikation Noradrenalin (10^{-5} mol/l)	Ende des Protokolls

Um die Aktivierbarkeit der Ryanodinrezeptoren zu überprüfen, wurde die Wandspannung der renalen Widerstandsgefäße in Coffein-haltiger KRB-Lösung (2×10^{-2} mol/l Coffein) registriert. Ab einer Konzentration vom 10 mM besitzt Coffein die Eigenschaft, Ca^{2+} -Ionen aus dem SR durch Bindung an RyR freizusetzen.

Tab. 2-11 Übersicht Protokoll 4

	Intervention	im Anschluss
1	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquilibration
2	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquilibration
3	kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10^{-8} mol/l – 10^{-5} mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Waschen + 15 min Äquilibration
4	Organbadwechsel auf KRB + 2×10^{-2} mol/l Coffein	Ende des Protokolls

Protokoll 5 *Einfluss der extrazellulären K⁺-Konzentration*

Die Aktivierbarkeit der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle ist vom Membranpotential glatter Gefäßmuskelzellen abhängig. Da der Ca²⁺-Einstrom durch L-Typ-Kanäle einen großen Beitrag zur NA-induzierten Vasokontraktion leistet wurde getestet, ob Unterschiede bezüglich der Depolarisations-induzierten Vasokontraktion zwischen beiden Versuchsgruppen bestehen. Die isolierten Gefäße wurden Organbadlösungen mit ansteigenden extrazellulären K⁺-Konzentrationen ausgesetzt und jeweils über einen Zeitraum von 4 Minuten registriert. Die K⁺-Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurde distributiv erstellt. Im Anschluss wurde der Effekt der ROCK-Inhibition untersucht.

Tab. 2-12 Übersicht der Zusammensetzung der Organbadlösung für die verschiedenen K⁺-Konzentrationen (c in mmol/l)

Nr.	c (mmol/l)	Zusammensetzung	Nr.	c (mmol/l)	Zusammensetzung
1	10	4,4 ml K125 / 95,6 ml KRB	6	60	46 ml K125 / 54 ml KRB
2	20	12,7 ml K125 / 87,3 ml KRB	7	70	54,3 ml K125 / 45,7 ml KRB
3	30	21 ml K125 / 79 ml KRB	8	80	62,6 ml K125 / 37,4 ml KRB
4	40	29,3 ml K125 / 71,7 ml KRB	9	100	79,2 ml K125 / 20,8 ml KRB
5	50	37,7 ml K125 / 62,3 ml KRB	10	120	95,8 ml K125 / 4,2 ml KRB

Tab. 2-13 Übersicht Protokoll 5

	Intervention	im Anschluss
1	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquilibration
2	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquilibration
3	distributive K ⁺ -Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Organbadwechsel auf K ⁺ -Konzentration Nr. 1)	Waschen + 15 min Äquilibration
4	distributive K ⁺ -Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Wiederholen von Schritt 3 für K ⁺ -Konzentration Nr. 2-10)	Wechsel der Gefäße
5	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquilibration
6	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquilibration
7	Einzelapplikation Y-27632 (3x10 ⁻⁶ mol/l)	Einwirkzeit: 15 min
8	distributive K ⁺ -Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Organbadwechsel auf K ⁺ -Konzentration Nr. 1)	Waschen + 15 min Äquilibration (Äquilibration unter Zusatz von Y-27632 (3x10 ⁻⁶ mol/l))
9	distributive K ⁺ -Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Wiederholen von Schritt 8 für K ⁺ -Konzentration Nr. 2-10)	Ende des Protokolls

Protokoll 6 Einfluss des Membranpotentials auf die S(-)-BayK8644 induzierte Vasokontraktion

Um den Einfluss des Membranpotentials auf die Aktivierbarkeit der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle zu bestimmen, wurde die S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurve zum einen nach Depolarisation und zum anderen nach Hyperpolarisation glatter Gefäßmuskelzellen registriert. Als Depolarisationsstimulus wurde KRB-Pufferlösung mit einer K⁺-Konzentration von 20 mM (K20) eingesetzt. Studien zeigten für Gefäße von normotensiven Ratten ein Ruhemembranpotential im Bereich von -60 mV [180].

Die Hyperpolarisation der Zellmembran erfolgte durch Behandlung der Gefäßsegmente mit Levcromakalim (10⁻⁶ mol/l), einem Aktivator ATP-sensitiver K⁺-Kanäle. Das Öffnen der K_{ATP}-Kanäle führt zum Ausstrom von K⁺-Ionen in die Zelle mit konsekutiver Hyperpolarisation der Zellmembran.

Tab. 2-14 Übersicht Protokoll 6

	Intervention	im Anschluss
1	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquilibration
2	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquilibration
3	kumulative S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁹ mol/l – 10 ⁻⁶ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Wechsel der Gefäße
4	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquilibration
5	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquilibration
6	Organbadwechsel auf K20	5 min warten
7	kumulative S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁹ mol/l – 10 ⁻⁶ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Wechsel der Gefäße
8	Vordehnung (Normalisierung)	10 min Äquilibration
9	Depolarisations-induzierte Kontraktion	Waschen + 10 min Äquilibration
10	Einzelapplikation Levcromakalim (10 ⁻⁶ mol/l)	15 min warten
11	kumulative S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (10 ⁻⁹ mol/l – 10 ⁻⁶ mol/l, halblogarithmisch, Intervall: 3 min)	Ende des Protokolls

2.2.4.7 Übersicht Pharmaka

Die benötigten Stoffmengenkonzentrationen der Pharmaka wurden täglich aus tiefgefrorenen Aliquots hergestellt. Als Lösungsvermittler für die Pharmaka wurden folgende Substanzen verwendet:

Tab. 2-15 Übersicht über Pharmaka und Lösungsmittel

Wirkstoff	Lösungsmittel
Noradrenalin-Bitartat-Hydrat	Isotone NaCl-Lösung
Y-27632-Dihydrochlorid	Isotone NaCl-Lösung
Coffein	KRB-Lösung
Levcromakalim	DMSO ¹
Nifedipin	DMSO ¹
S-(-)-BayK8644	DMSO ¹

¹ Konzentration von DMSO im Organbad nie größer 0,1%

Vor Applikation der Pharmaka in den Myographen wurden die Eppendorfcups mit einem Vortexmischer gründlich durchmischt.

Als Lösungsmittelkontrolle (LM) wurde ein äquivalentes Volumen Natriumchlorid (NaCl) mitgeführt.

2.2.5 Western-Blot

Das Western-Blot-Verfahren, auch Immunoblot bezeichnet, dient der Auftrennung von Proteingemischen und der anschließenden Analyse der einzelnen Proteinfractionen. Die Bestandteile des Proteingemischs werden nach ihrem Molekulargewicht getrennt, auf eine Trägermembran übertragen und die Zielproteine durch Antikörperreaktionen bzw. Chemielumineszenz nachgewiesen. Die Methode des Western-Blot wurde 1979 erstmals von W.N. Burnette und J. Renart beschrieben [28;200]. Der Einsatz der heute üblichen Nitrocellulosemembranen wurde im selben Jahr erstmals von H. Towbin publiziert [244].

2.2.5.1 Gewebeaufarbeitung

Die isolierten renalen Widerstandsgefäße wurden nach Präparation in Eppendorfcups bei -80 °C kryokonserviert. Für die Aufarbeitung der Probe wurde das Gewebepellet aufgetaut und $100\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer zugesetzt. Der Puffer enthielt einen Proteaseinhibitor (PI) im Verhältnis 1:100 und Phenylmethylsulfonylfourid (PMSF) im Verhältnis 1:200. Beide Substanzen dienten als Proteaseinhibitoren zur Vermeidung der Proteinedegradation. Das im Lysepuffer enthaltene Tween[®] 20 diente der Zellysation. Für die weitere Aufarbeitung wurde das Gewebe erneut in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend mit Hilfe von Mörser und Stößel zerkleinert. Um das vorzeitige Auftauen des feinen Gewebepulvers zu verhindern wurden Mörser und Stößel durch flüssigen Stickstoff gekühlt. Das Gewebepulver wurde mit Hilfe eines Spatels (N_2 -gekühlt) in ein neues Eppendorfcup überführt, mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer resuspendiert und zum kontinuierlichen Auftauen auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte das Vortexen der Probe. Das aufbereitete Gewebe stand jetzt für die Proteinextraktion zur Verfügung oder wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C konserviert.

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Methode von Bradford [25]. Das Nachweisverfahren basiert auf der chemischen Reaktion des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) mit den Aminosäuren der Proteine. In saurer Lösung bildet der Farbstoff mit den kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine Komplexe. Daraus ergeben sich zwei verschiedene Absorptionsmaxima. Für die ungebundene (protonierte) Form besteht ein Absorptionsmaximum bei 470 nm (rot) und für die gebundene (unprotonierte) Form ein Absorptionsmaximum bei 595 nm (blau). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Scanners (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland) photometrisch bestimmt

und ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Probe. Für die Messung wurden 10 µl der Proteinlysate (unverdünnt, 1:10 bzw. 1:20 verdünnt) jeweils in Doppelbestimmung in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 200 µl Bradford-Reagenz hinzugefügt und die Mikrotiterplatte zum Schutz vor elektromagnetischer Strahlung mit Aluminiumfolie abgedeckt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde parallel eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*) mit den Konzentrationen 0, 10, 20, 30, 40 und 50 mg/ml mitgeführt. Die Berechnung des Proteingehalts anhand der Eichreihe erfolgte mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse.

2.2.5.3 Proteinextraktion

Die mechanische Lyse der Proteinlysate erfolgte durch Applikation von Ultraschallwellen. Dazu wurden die aufgetauten Proben zweimal für die Dauer von 15 Sekunden mit einem Ultraschallhomogenisator behandelt. Zur Kontrolle der Temperatur wurden die Proben mit Eis gekühlt, da ein Teil der Energie in Wärme umgesetzt wird. Im Anschluss wurden die Proben für weitere 10 Minuten auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation wurde die Probe für 10 Minuten bei 4 °C und 2.000 g von den Zelltrümmern gereinigt und der Überstand (Gesamtproteinfraktion) durch Pipettieren in ein neues Eppendorfcup überführt. Von den 200 µl der Gesamtproteinfraktion wurden 60 µl bei -80 °C tiefgefroren und 140 µl in ein Zentrifugenröhrchen für den weiteren Aufschluss der Membranproteinfraktion überführt. Durch Zentrifugation für eine Stunde bei 4 °C und 100.000 g wurde die Gesamtproteinfraktion in ihre Bestandteile aufgetrennt. Der Überstand enthielt die cytosolische Fraktion und wurde zur Konservierung bei -80 °C tiefgefroren. Das Pellet enthielt die Membranproteinfraktion und wurde mit 70 µl Lysepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurden die Proteine der Proben elektrophoretisch nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Grundlagen der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wurden 1970 erstmals von U. Laemmli beschrieben [141]. Die Separierung der geladenen Proteinmoleküle wurde dabei durch das Anlegen eines elektrischen Feldes erreicht. Als Trennmedium bei dieser Art der Elektrophorese dient ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis. Im nativen Zustand wandern die Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung durch die unterschiedliche Aminosäuresequenz sowohl zur Anode als auch zur Kathode. Für die SDS-Page nutzt man die Eigenschaft des anionischen

Detergenz SDS. Durch die Bindung von SDS an die hydrophoben Bereiche der Aminosäureseitenketten und durch β -Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken reduziert, werden chemische Bindungen beeinflusst, welche die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine bilden. Dies führt zur vollständigen Denaturierung der Proteine und zum Verlust der Faltungsstruktur (Linearisierung). Zudem erhalten alle Proteine einen negativen Ladungscharakter, da die Eigenladung der Proteine durch das mehrfach negativ geladene SDS überlagert wird. Dadurch wandern die Proteine im elektrischen Feld unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz und ihrem isoelektrischen Punkt zur Anode. Dies erlaubt eine Auftrennung der Proteine nach Kettenlänge, proportional zum Molekulargewicht, da längere Proteine im Trennmedium (Gelmatrix) stärker zurückgehalten werden als kürzere Proteine. Der Hauptbestandteil des Trennmediums ist ein Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Die Konzentration beider Stoffe bestimmt die Transporteigenschaften (Porengröße, Dichte, Elastizität) des Gels. Acrylamid ist ein Gelbildner und für die Länge der Polyacrylamidketten verantwortlich. Bisacrylamid dient als Quervernetzer und nimmt über den Vernetzungsgrad der Polyacrylamidketten Einfluss auf die Porengröße. Die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid wird durch Zugabe des Radikalstarters APS (radikalische Polymerisation) gestartet. Das aliphatische Amin TEMED dient als Polymerisationskatalysator. Durch die diskontinuierliche Gelstruktur wird eine hohe Trennleistung und Bandenschärfe erreicht. Die Proteine werden zunächst im Sammelgel konzentriert. Somit haben alle Moleküle den gleichen Ausgangspunkt für die darauffolgende Auftrennung durch den Siebeffekt des Trenngels. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Proteinbestimmung der α 1C-Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals Sammelgele mit 5 % Acrylamid und Trenngele mit 7,5 % Acrylamid gewählt (Tab. 2-16).

Tab. 2-16 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Komponente	Trenngel (7,5 %)		Sammelgel (5 %)	
	klein	groß	klein	groß
A. dest.	3,6 ml	7,2 ml	3 ml	6 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	1,9 ml	3,8 ml	650 μ l	1,3 ml
Tris pH 6,8 (Sammelgel-Puffer)	-----	-----	1,23 ml	2,46 ml
Tris pH 8,8 (Trenngel-Puffer)	1,9 ml	3,8 ml	-----	-----
10 % SDS	75 μ l	150 μ l	50 μ l	100 μ l
10 % APS	75 μ l	150 μ l	50 μ l	100 μ l
TEMED	7,5 μ l	15 μ l	5 μ l	10 μ l

Vor dem Ansetzen von Trenn- und Sammelgel wurden die Gelkammern zusammengesetzt. Um die bestmögliche Auftrennung der Proteine zu erreichen, wurde das Migrationsverhalten der Proteine in kleinen und großen Gelen untersucht. Die kleinen Gelkammern wurden mit Hilfe eines Gelkammerbausatzes (Mini-PROTEAN® Handcast Systems 12 Taschen, BioRad, München, Deutschland) zusammengesetzt. Dazu wurden zwei Glasplatten – mit Abstandshaltern zwischen den Glasplatten – in einen Ständer eingespannt, welcher die sonst offene Unterseite der Glasplatten vorübergehend abdichtet. Die großen Gelkammern (Criterion Empty Cassettes 18 Taschen, BioRad, München, Deutschland) wurden gebrauchsfertig direkt vom Hersteller bezogen.

Zunächst wurde das Trenngel angesetzt, der Kunststoffkamm aus der Gelkammer entfernt und $\frac{3}{4}$ des Gesamtvolumens der Kammer luftblasenfrei mit dem Trenngel gefüllt. Das Trenngel wurde anschließend mit Isopropanol überschichtet, um einen luftblasenfreien Abschluss zu erhalten. Nach der Polymerisation des Gels (ca. 30 Minuten) wurde das Isopropanol abgegossen, das Restvolumen der Gelkammer mit dem Sammelgel aufgefüllt und der Kunststoffkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt, die Taschen des Gels auf Defekte überprüft und die Gelkammer vertikal und luftblasenfrei in die mit Tank-Puffer (1x) befüllte SDS-Page Elektrophoresekammer eingebaut. Im Anschluss wurden die Proben in einem Thermocycler für fünf Minuten bei 95 °C und der Protein-Größenstandard für fünf Minuten bei 37 °C denaturiert. Der Protein-Größenstandard diente zur späteren Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine. Mit Hilfe einer Hamilton-Spritze wurden jeweils 30 µl der Probe pro Geltasche aufgetragen. Das Probenvolumen von 30 µl setzte sich zusammen aus 22,5 µl des aufbereiteten Proteins und 7,5 µl Laemmli-Puffer (4 x). Pro Geltasche wurden 40 µg Protein aufgetragen. In jeweils zwei Taschen des Gels wurden 7,5 µl Proteinmarker aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von 90 V angelegt. Nach ca. 45 Minuten erreichten die Proben das Trenngel und die Elektrophorese wurde für ca. 2,5 Stunden bei konstanter Spannung von 130 V fortgesetzt bis die untersten drei Banden des Proteinmarkers aus dem Gel herausgelaufen waren.

2.2.5.5 Proteintransfer auf die Nitrozellulose-Membran (Tank-Blot-Verfahren)

Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese durch ein senkrecht zur Gelmatrix angelegtes elektrisches Feld (Elektroblotting) bei konstant 120 mA über Nacht auf Eis aus dem Trenngel immobilisiert und auf eine Nitrozellulose-Membran (NZ-Membran) transferiert. Auf Grund von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen binden die Proteine an die NZ-Membran, welche eine hohe Proteinbindungskapazität besitzt. Der Proteintransfer erfolgte im Tank-Blot-Verfahren nach der Methode von Towbin *et. al* [244]. Im Anschluss an die

SDS-Gelelektrophorese wurde das Sammelgel mit einem Skalpell vom Trenngel entfernt und verworfen. Das Trenngel wurde in eisgekühlten Transferpuffer (Towbinpuffer mit 20 % Methanol) überführt. Das Methanol in der Pufferlösung unterstützt dabei die Proteinbindung an die NZ-Membran. Für den Sandwich-Blot nach Towbin wurden je Gel vier Whatman-Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in Größe des Trenngels zugeschnitten und zusammen mit den Schwämmen (Fiber-Pads) für 15 Minuten in eiskaltem Transferpuffer äquilibriert. Der Blot wurde nach folgendem Schema luftblasenfrei zusammengebaut und in die Blotkammer eingesetzt (Abb. 2-8).

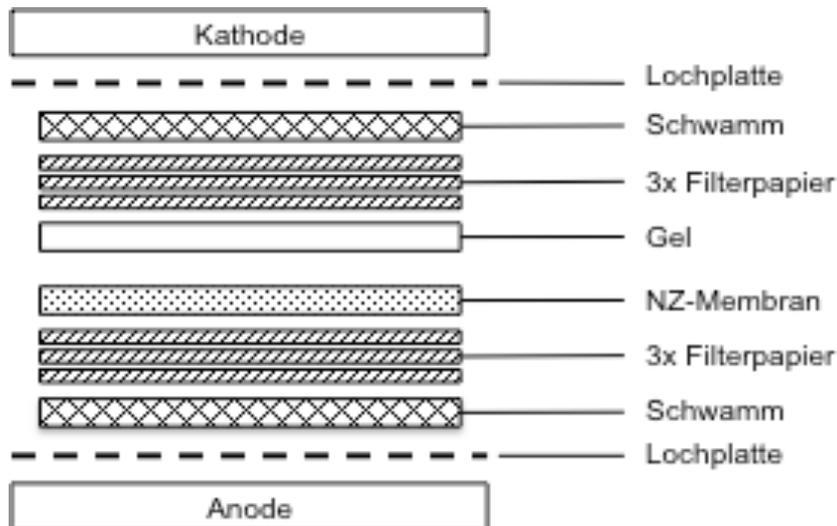


Abb. 2-8 Schematischer Aufbau eines Western-Blot Sandwiches nach Towbin. (modifiziert nach: Protein Blotting Guide - A Guide to Transfer and Detection, Edition 3, S. 48, BioRad, München)

Im Anschluss wurden die Proteine auf der NZ-Membran zur Kontrolle des Proteintransfers mit einer Ponceau S-Lösung angefärbt. Die Färbung ist unspezifisch und reversibel. Nach dem Entfärben mit A. dest. wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der NZ-Membran durch Inkubation mit 50 ml Rothi[®]-Block bzw. Milcheiweißlösung auf einem Schüttler für eine Stunde bei RT gesättigt. Für die Detektion der α 1C-Untereinheit der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle erfolgte die Sättigung der NZ-Membran mit Rothi[®]-Block und für den Nachweis von β -Aktin mit Milchpulver. Im Anschluss konnten die Proteine auf der NZ-Membran mit Hilfe der indirekten Immundetektion sichtbar gemacht werden. Das Verfahren beruht darauf, dass zunächst ein antigenspezifischer Antikörper verwendet wird, welcher dann mit einem Enzym-konjugierten Sekundär-Antikörper detektiert werden kann.

2.2.5.6 Immundetektion der $\alpha 1$ -Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals

Nach Inkubation mit Rothi[®]-Blockierlösung wurde diese abgeschüttet, der primäre antigenspezifische $\text{Ca}_v1.2$ -Antikörper verdünnt (siehe Tab. 2-17) und die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Antikörper unter ständiger Bewegung auf einer Schwenkplattform inkubiert. Danach wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimal 10-minütiges Waschen mit TBST (1x) entfernt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Enzym-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG, Meerrettichperoxidase-konjugiert („horseradish peroxidase“, HRP)). Der sekundäre Antikörper wurde in Rothi[®]-Block verdünnt (siehe Tab. 2-17) und die Membran für zwei Stunden bei RT durch Schwenken inkubiert. Danach wurde dreimal mit TBST (1x) und einmal mit TBS gewaschen, bevor die Detektion über eine verstärkte Chemilumineszenz-Reaktion (ECL, *enhanced chemiluminescence*) erfolgte.

Tab. 2-17 Verdünnung der Antikörper zur Immundetektion der porenbildenden $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit ($\text{Ca}_v1.2$)

Primärer Antikörper	Gelgröße	Konzentration	Verdünnungsmittel	Volumen
Anti- $\text{Ca}_v1.2$ (mouse)	klein 12 Taschen	1:10	Rothi [®] -Block (1x)	25 ml
	groß 18 Taschen	1:10	Rothi [®] -Block (1x)	50 ml
Sekundärer Antikörper	Gelgröße	Konzentration	Verdünnungsmittel	Volumen
Anti-Maus IgG (goat)	klein 12 Taschen	1:2.000	Rothi [®] -Block (1x)	25 ml
	groß 18 Taschen	1:2.000	Rothi [®] -Block (1x)	50 ml

Der eingesetzte Antikörper detektiert die $\alpha 1$ -Untereinheit des Typs C, welche durch das Gen CACNA1C kodiert wird. Das Epitop des Antikörpers besteht aus 227 Aminosäuren und bindet an die Aminosäurepositionen 1507 bis 1733 des intrazellulären C-Terminus der Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ.

2.2.5.7 Immundetektion des Strukturproteins β -Aktin

Zunächst wurde die NZ-Membran für 20 Minuten bei 37 °C mit einem Stripping-Puffer inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank auf einer Schüttelplattform. Durch den Stripping-Puffer wurden die hoch-affinen Anti- $\text{Ca}_v1.2$ -Antikörper und die Sekundärantikörper sowie die Chemolumineszenz-Färbung entfernt und die Proteine auf der NZ-Membran für eine erneute Antikörperreaktion zugänglich gemacht. Der Stripping-Puffer wurde im Anschluss unter ständigem Schwenken für dreimal 8 Minuten mit TBST (1x) ausgewaschen. Zur Bestimmung des β -Aktin-Protein-Gehalts wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit einem Aktin-Antikörper inkubiert. Dieser wurde in TBST (1x) verdünnt (siehe Tab. 2-18) und

im Anschluss durch dreimaliges Waschen für 8 Minuten mit TBST (1x) entfernt. Der Enzym-konjugierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in TBST (1x) verdünnt (siehe Tab. 2-18) und für eine Stunde bei RT durch Schwenken inkubiert. Nach weiteren drei 8-minütigen Waschvorgängen mit TBST (1x) und einem abschließenden Waschvorgang mit TBS erfolgte die Detektion über eine Chemilumineszenz-Reaktion.

Tab. 2-18 Verdünnung der Antikörper zur Immundetektion von β -Aktin

Primärer Antikörper	Gelgröße	Konzentration	Verdünnungsmittel	Volumen
Anti- β -Aktin (rabbit)	klein 12 Taschen	1:25.000	TBST	25 ml
	groß 18 Taschen	1:25.000	TBST	50 ml
Sekundärer Antikörper	Gelgröße	Konzentration	Verdünnungsmittel	Volumen
Anti-Kaninchen IgG (goat)	klein 12 Taschen	1:40.000	TBST	25 ml
	groß 18 Taschen	1:40.000	TBST	50 ml

2.2.5.8 Messung der Chemilumineszenz

In allen Western-Blots wurden die immunreaktiven Banden durch Verwendung eines Chemilumineszenz-Kit (ECL Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) nachgewiesen und durch Densitometrie (GelScan Standard V5.02; BioSciTec, Frankfurt am Main, D) quantifiziert. Zur Messung der Chemilumineszenz wurde die Membran für drei Minuten bei Dunkelheit mit dem ECL-Substrat inkubiert. Das ECL-Substrat setzt sich zu gleichen Teilen aus Lösung A (Luminol) und Lösung B (H_2O_2 , Wasserstoffperoxid) zusammen. Wasserstoffperoxid dient als Substrat des an den Sekundärantikörper konjugierten Enzyms. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich um die Meerrettichperoxidase (HRP, *horse radish peroxidase*). Wasserstoffperoxid wird durch die HRP oxidiert, wobei Luminol durch den entstehenden Sauerstoff oxidiert wird. Diese Reaktion führt zur Emission von Photonen.

2.2.6 Membranpotentialmessung

Die Membranpotentialmessung ist eine Methode zur Bestimmung der Spannungsdifferenz zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Milieu einer Zelle. Der Ladungsunterschied zwischen Innen- und Außenseite der Zelle wird mit Hilfe einer Referenzelektrode und einer Messelektrode bestimmt. Im Jahr 1791 erbrachte Luigi Galvani in seiner Schrift „De viribus electricitatis in motu musculari commentarius“ (übersetzt: „Abhandlung über die Kräfte der Elektrizität bei der Muskelbewegung“) einen ersten Hinweis darauf, dass auch in Organen von tierischen Lebewesen ein elektrischer Strom fließt [79]. Im Jahr 1939 gelang K. S. Cole und H. J. Curtis die erste Messung von Transmembranpotentialen im Riesenaxon des Tintenfisches [45]. Zeitgleich und Unabhängig registrierten auch A. L. Hodgkin und A. F. Huxley die Membranpotentiale am Riesenaxon mit Hilfe einer Glaselektrode [108]. Die ersten Membranpotentiale an der quergestreiften Muskulatur wurden 1949 von Ling und Gerard abgeleitet [156-157]. E. Bülbering und I. N. Hooton gelang im Jahr 1954 die Messung von Membranpotentialen an Zellen der glatten Muskulatur [26-27].

2.2.6.1 Grundlagen und Versuchsaufbau

Die präparierten Interlobararterien wurden in einen Myographen (Single Wire Myograph System 310A) eingebaut. Dieser wurde über eine Schnittstelle (Myo Interface 310A) mit der Datenerfassungshardware PowerLab 4136 (ADInstruments Ltd, Oxford, UK) verbunden. Das PowerLab-Modul wurde mit einem Computer verbunden, auf welchem mit Hilfe der Software LabChart® 7 (ADInstruments Ltd, Oxford, UK) die Wandspannung der Gefäße aufgezeichnet wurde (Kanal 1). Die Potentialdifferenz zwischen Referenz- und Messelektrode wurde mit einem Verstärker (Elektrometer Intra 767) registriert. Der Verstärker war ebenfalls mit dem PowerLab-Modul verbunden. Das Membranpotential wurde über Kanal 2 des PowerLab-Moduls registriert und in LabChart® 7 aufgezeichnet. Diese Versuchsanordnung ermöglichte eine simultane Erfassung von Gefäßwandspannung und Membranpotential (Abb. 2-9). Die Messelektrode wurde in ein Stativ mit Halterung eingespannt und konnte mit Hilfe eines Piezomanipulators in allen drei Ebenen frei bewegt werden. Die Referenzelektrode wurde im Organbad platziert. Ein Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle diente als Sichtkontrolle zur groben Platzierung der Elektrode am Gefäß. Des Weiteren wurde zur Visualisierung der elektrischen Spannung ein Oszilloskop in die Versuchsanordnung integriert. Da die Potenzialdifferenzen durch das Oszilloskop nahezu in Echtzeit dargestellt wurden, diente es als wichtige Orientierung bei der Elektrodenplatzierung. Der gesamte Versuchsaufbau wurde von einem Faraday-Käfig gegenüber der Umgebung elektromagnetisch abgeschirmt. Des

Weiteren standen alle Geräte auf einem Luftfedertisch, welcher Vibrationen am Arbeitsplatz abdämpfte.

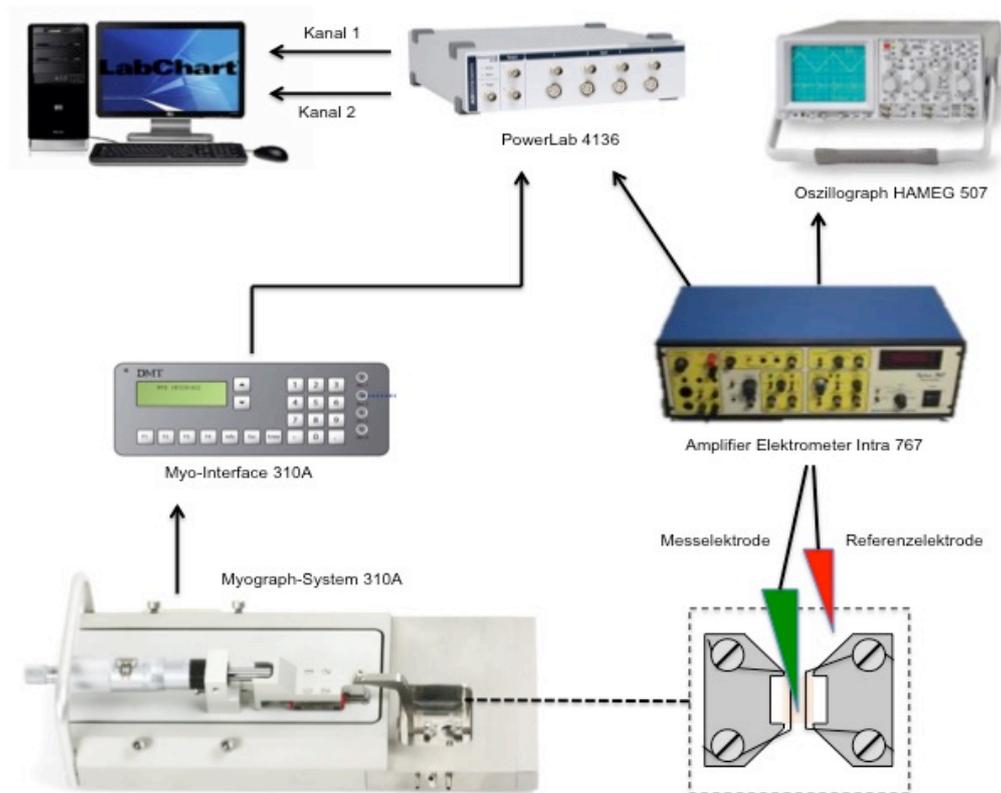


Abb. 2-9 Versuchsaufbau zur Registrierung von Membranpotential und Gefäßwandspannung. Die Gefäßwandspannung der Interlobararterien wurde mit einem Einkanal-Myographie-System registriert. Das Membranpotential wurde mit Hilfe eines Verstärkers aufgezeichnet und durch einen Oszilloskop visualisiert.

2.2.6.2 Vorbereitung der Versuche

Vor Beginn der Versuche wurden die registrierten Kräfte am Myo-Interface 310A mit denen der Datenerfassungssoftware LabChart® 7 abgeglichen. Die Mikropipetten wurden 24 Stunden vor dem geplanten Versuch mit Hilfe eines Mikropipetten-Puller hergestellt. Die verwendeten Glaskapillaren hatten folgende Eigenschaften:

1	Hersteller:	Sutter Instruments, Novato, CA, USA
2	Material:	Aluminiumsilicat Glas
3	Außendurchmesser:	1 mm
4	Innendurchmesser:	0,64 mm
5	Länge:	10 cm
6	Filament:	Trough Filaments

Die Mikropipetten wurden mit den Programmen 6 und 7 hergestellt (Tab. 2-19). Folgende Parameter waren für die Programme hinterlegt. Die Zahlen repräsentieren relative Einheiten.

Tab. 2-19 Übersicht Programmparameter für Programm 6 und 7

Parameter	Beschreibung	Programm 6	Programm 7
Heat	steuert den Pegel des elektrischen Stroms, welcher den Filamenten zugeführt wird	520	530
Pull	steuert die Kraft des Zuges; je stärker der Zug, desto kleiner der Durchmesser und desto länger die Verjüngung der Spitze	150	125
Velocity	Geschwindigkeit des Systems	110	75
Time	regelt die Zeit der Abkühlung	110	200
Heating Time	regelt die Zeit des Erhitzens	6,9 - 7,2	6,9 - 7,2
Ramp Test		516	516

Nach der Herstellung der Mikropipetten wurden diese in einer Box (Storage-Box - Bx20, Sutter Instruments) aufbewahrt. Das Gefäß wurde mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und die Mikropipetten mit der Spitze nach oben in die Lösung gehangen. Durch die wirkenden Kapillarkräfte wurden die Spitzen der ausgezogenen Glaskapillaren mit der KCl-Lösung luftblasenfrei gefüllt. Da dieser Prozess Zeit beansprucht, wurde die Mikropipetten mindestens einen Tag vor der Benutzung hergestellt.

2.2.6.3 Einbau der Gefäße

Der Einbau der Gefäße in den Myographen erfolgte analog zur Vorgehensweise in den zuvor beschriebenen Myographie-Versuchen (siehe 2.2.4.3).

2.2.6.4 Durchführung

Um die Gefäßsegmente miteinander vergleichen zu können, wurde mit Hilfe des Normalisierungsmoduls der Datenerfassungssoftware LabChart® 7 der optimale innere Gefäßumfang L_1 (siehe 2.2.4.4) ermittelt. Die standardisierte Vordehnung ist für die Reproduzierbarkeit der nachfolgenden Membranpotentialmessung von großer Bedeutung, da sich das Membranpotential mit steigender Vordehnung der Gefäßsegmente ändert. Zur Vitalitätsprüfung wurde der α_1 -Rezeptoragonist Methoxamin appliziert ($c = 10^{-5}$ mol/l). Der Wirkstoff wurde nach zwei bis drei Minuten durch Einschalten der Perfusionspumpe ausgewaschen.

Der Myograph wurde zu Beginn mit 5 ml KRB-Pufferlösung gefüllt. Eine Perfusionspumpe förderte die Lösung mit einer Geschwindigkeit von 2,8 ml/min und sorgte so für einen kontinuierlichen Wechsel. Die Begasung mit medizinischem Carbogen erfolgte direkt über das Vorratsgefäß der Pufferlösung. Die Temperatur der Pufferlösung im Vorratsgefäß wurde durch ein Umwälzthermostat auf konstant 37 °C eingestellt.

Eine halbe Stunde vor Beginn der Messung wurden Oszilloskop und Amplifier eingeschaltet. Unmittelbar vor der ersten Messung wurde die Referenzelektrode in die Badlösung des Myographen eingetaucht. Im Anschluss wurden der Elektrodenhalter und eine ausgezogene Glaskapillare luftblasenfrei mit gesättigter KCl-Lösung ($c = 3 \text{ M}$) befüllt. Luftblasen in den Glaskapillaren bzw. im Elektrodenhalter lassen den Widerstand der Elektrode extrem ansteigen, womit die Elektrode für die Messung unbrauchbar ist. Die ausgezogene Glaskapillare wurde im Anschluss in den Elektrodenhalter gesteckt. Anschließend wurde der Elektrodenhalter über den Proben-Amplifier (Verbindung von Elektrodenhalter und Amplifier) mit dem Amplifier verbunden. Darauf wurde der Proben-Amplifier in die Halterung eines Stativs eingespannt und die Messelektrode (Glaskapillare) über die Stellschrauben des Stativs im Organbad platziert.

Zum Start der Messung wurden am Amplifier der Schalter „Breakaway“ auf Position „Normal“ gestellt und die Aufzeichnung in LabChart® 7 gestartet. Am Oszilloskop waren zwei Linien sichtbar. Die obere Linie zeigte das Signal der Messelektrode und die untere ein Stimulationssignal. Das rechteckförmige repetitive Stimulationssignal in Höhe von 20 mV wurde über die PowerLab-Schnittstelle an den Amplifier geleitet, welcher für die gleiche Zeit ein Stromimpuls von 1 nA generierte und an das Oszilloskop weiterreichte. Im nächsten Schritt wurden mit dem Regler „Position“ am Amplifier der Spannungsabfall der Messelektrode – Produkt aus Stromimpuls und Widerstand der Elektrode – abgeglichen und die Position des oberen Signals auf 0 mV korrigiert. Das Signal der Messelektrode war keine durchgehende Linie, sondern bildete ein rechteckiges Signal, welches den Widerstand der Elektrode repräsentierte. Durch den Regler „Bridge“ am Amplifier wurde der Widerstand der Messelektrode kompensiert, sodass eine durchgehende Linie auf dem Oszilloskop sichtbar war. Durch den Abgleich des Ausgangswiderstands der Messelektrode konnten weitere Änderungen des Widerstands z.B. beim Durchdringen von Gewebe mit sehr hoher Sensitivität detektiert werden. Es wurden nur Elektroden mit einem Widerstand zwischen 40 und 120 M Ω benutzt. Die Messelektrode wurde zunächst unter Sichtkontrolle mit Hilfe des Stereomikroskops sehr dicht am Gefäßsegment platziert, ohne jedoch das Gefäß zu berühren. Mit Hilfe des Piezomanipulators erfolgte in 5 bis 7 μm Schritten die schrittweise Annäherung an das Gefäßsegment. Sobald sich das Signal der Messelektrode am Oszilloskop und der Widerstand der Elektrode veränderte, wurden die Intervalle des Piezomanipulators („Step-

Size“) auf 2 bis 3 μm verringert. Im Anschluss wurde die Elektrode weiter in Richtung Gefäß bewegt bis die Elektrodenspitze die glatten Muskelzellen penetrierte. Dies wurde durch einen schlagartigen Abfall des Ruhesignals der Messelektrode sichtbar. Nachdem das Signal 2 Minuten stabil registriert wurde, konnte die Elektrode in großen Intervallen und mit schneller Geschwindigkeit aus dem Gewebe entfernt werden. Das Signal der Messelektrode kehrte bei erfolgreicher Messung auf das Ruhesignal zurück.

Die Penetration der Tunica Adventitia der glatten Gefäßmuskelzellen mit der Messelektrode erwies sich in einigen Gefäßen als sehr kompliziert. Bei etwas dickeren Bindegewebschichten kam es zum Abknicken der Messelektroden. Dies wurde durch verschiedene Einstellung am Piezomanipulator und Amplifier versucht zu verhindern.

„Capacity“	Die Erhöhung der Kapazität führt zu einer größeren Eigenschwingung der Elektrode. Bei Problemen mit der Durchdringung des Bindegewebes konnte durch eine starke Eigenschwingung der Elektrode die Penetration der Zellmembran erleichtert werden.
„Step-Size“	Das Intervall des Piezomanipulators konnte zwischen 0,5 und 10 μm gewählt werden.
„Motor-Speed“	Eine erhöhte Geschwindigkeit der Elektrode beim Vordringen bzw. eine erhöhte Aktivität des Piezoelements erleichterte in einigen Fällen das Vordringen der Elektrode, wenn es zur Abbiegung der Elektrode kam.

2.2.6.5 Auswertungskriterien

Es wurden drei Kriterien für die Charakterisierung eines stabilen Membranpotentials festgelegt:

1. eine abrupte Änderung des Membranpotentials nach Penetration der Zellmembran
2. eine stabile Ableitung des Membranpotentials für mindestens eine Minute
3. keine Veränderung der Basislinie wenn die Elektrode aus dem Gewebe gezogen wird

2.3 Statistik und Datenanalyse

Die Messdaten der Myographieveruche wurden mit der Software Myodaq 2.01 (Universität Maastricht, Maastricht, Niederlande) erfasst. Für die Auswertung wurde die Analysesoftware Myodata 2.02 (Universität Maastricht, Maastricht, Niederlande) verwendet.

Die Kurvenanpassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven und die Erstellung der Diagramme erfolgte mit dem Programm SigmaPlot Version 9.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Den kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden 4-parametrische Hill-Kurven nach der Methode der kleinsten Quadrate (Levenberg-Marquardt-Algorithmus) angepasst. Diese sigmoidalen Kurven werden durch folgende Funktionsgleichung beschrieben:

$$Y = B + \frac{T - B}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - X) \times H}}$$

Formel 3: Funktionsgleichung der 4-parametrischen Hill-Kurve

X	Konzentration des verwendeten Pharmakons
Y	Änderung der Wandspannung
EC50	Konzentration des Pharmakons, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen
H	Hill Slope
T	maximale Wandspannung
B	minimale Wandspannung

Zur Bestimmung der Sensitivität der Gefäßsegmente gegenüber den verwendeten Agonisten diente der Vergleich der $\log EC_{50}$ -Werte der verschiedenen kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Zudem wurde anhand des Parameters T der Hill-Kurve die maximale relative Wandspannung E_{\max} ermittelt.

Wenn der kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurve keine sigmoidale Kurve angepasst werden konnte, wurden die Daten durch eine Zwei-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen analysiert.

Der Vergleich von zwei Gruppenmittelwerten wurde mittels t-Test durchgeführt. Für Experimente mit einem 2x2-faktoriellen Versuchsdesign wurden die Daten durch eine Zwei-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) oder eine Zwei-Weg-Varianzanalyse für wiederholte Messungen analysiert. Bei Vorliegen von signifikanten Wechselwirkungen wurden die Untergruppen mit dem post-hoc Test nach Student-Newman-Keuls verglichen.

Material und Methoden

Alle Parameter sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (Mean \pm SEM) angegeben. Die Anzahl der getesteten Tiere wird durch „n“ beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die statistische Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ akzeptiert.

Die deskriptive und analytische Statistik wurden mit der Software SigmaStat (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Small-Vessel-Myographie (SVM)

3.1.1 Effekt der neonatalen Sympathektomie auf die Noradrenalin-Sensitivität

In beiden Gruppen zeigten die isolierten renalen Gefäßsegmente als Reaktion auf die kumulativ applizierte NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve eine konzentrationsabhängige Zunahme der Wandspannung (Abb. 3-1). Die neonatale Sympathektomie führte zu einer statistisch signifikanten Linksverschiebung der NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 3-1, Tab. 3-1). Die renalen Widerstandsgefäße neonatal sympathektomierter Ratten (SYX) zeigten eine statistisch signifikante Erhöhung der maximalen NA-induzierten Wandspannung (E_{max}) und der NA-Sensitivität ($\log EC_{50}$) im Vergleich zu scheinsympathektomierten Kontrolltieren (CTR).

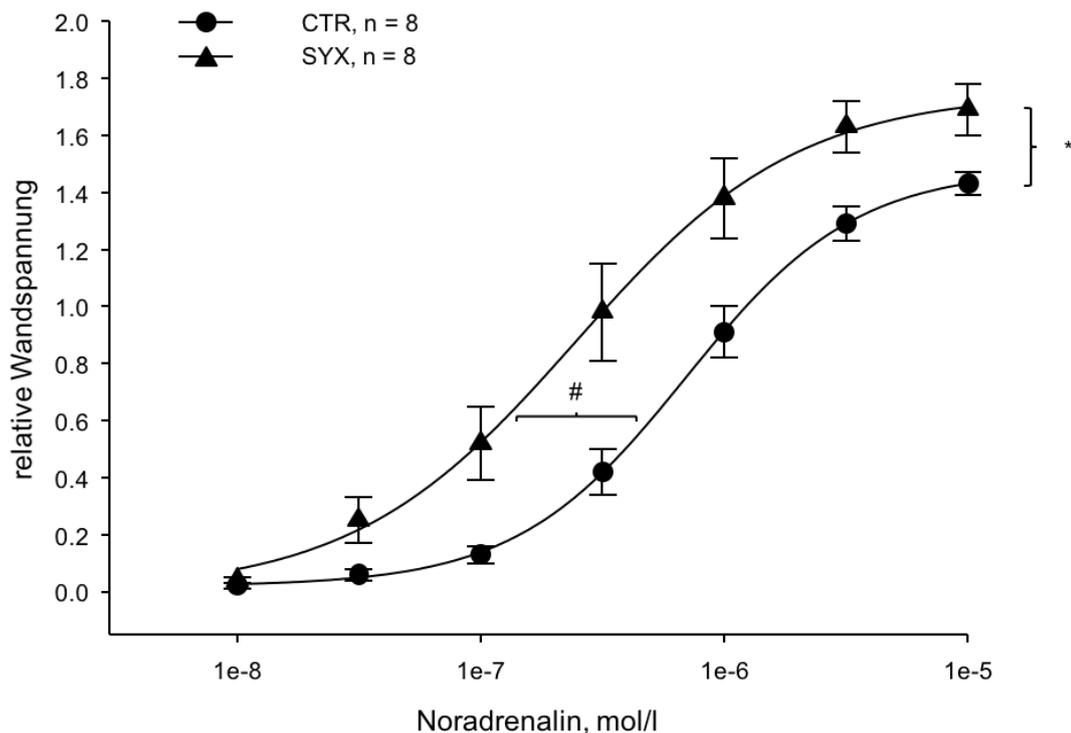


Abb. 3-1 Kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve renaler Widerstandsgefäße der dritten Aufzweigungsgeneration. Gefäßsegmente wurden aus Nieren von scheinsympathektomierten Tieren (CTR) und neonatal sympathektomierten Tieren (SYX) präpariert. Die neonatale Sympathektomie führte zum Anstieg des E_{max} -Werts und zur Senkung des $\log EC_{50}$ -Werts. (Mittelwerte \pm SE; * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied der maximalen relativen Wandspannung (E_{max}): SYX vs. CTR; # $p < 0,05$ signifikanter Unterschied der $\log EC_{50}$ -Werte: SYX vs. CTR)

Ergebnisse

Tab. 3-1 LogEC₅₀ und E_{max} der NA-induzierten Vasokontraktion, Ruhewandspannung, K⁺-induzierte Wandspannung und Gefäßdurchmesser renaler Widerstandsgefäße

	CTR (n = 8)	SYX (n = 8)
Ruhewandspannung (mN/mm)	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,02
K ⁺ -induzierte Wandspannung (mN/mm)	2,16 ± 0,35	1,69 ± 0,35
Gefäßdurchmesser (µm)	149 ± 4	146 ± 3
E _{max} (relative Wandspannung)	1,47 ± 0,05	1,73 ± 0,08 *
LogEC ₅₀ (mol/l)	-6,12 ± 0,08	-6,61 ± 0,16 #

Mittelwerte ± SEM; * p < 0,05 vs. CTR, # p < 0,05 vs. CTR

Für die Ruhewandspannung der Gefäße, die maximale K⁺-induzierte Wandspannung (125mmol/l K⁺) und den Gefäßdurchmesser zeigten sich keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede (Tab. 3-1).

3.1.2 Effekt der L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion

Der konzentrationsabhängige Anstieg der Gefäßwandspannung nach Stimulation mit NA konnte auch unter L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade beobachtet werden (Abb. 3-2 A/B). Nifedipin verursachte bei Gefäßsegmenten beider Gruppen eine statistisch signifikante Reduktion der maximalen NA-induzierten Gefäßwandspannung (E_{\max}) und führte zur Rechtsverschiebung der jeweiligen NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Tab. 3-2, A/B).

Tab. 3-2 Effekt von Nifedipin auf $\log EC_{50}$ und E_{\max} der NA-induzierten Vasokontraktion

	CTR (n = 8) LM	CTR (n = 8) + Nifedipin	SYX (n = 8) LM	SYX (n = 8) + Nifedipin
E_{\max} (relative Spannung)	1,47 ± 0,05	1,19 ± 0,05 ***	1,73 ± 0,08	1,36 ± 0,07 **
$\log EC_{50}$ (mol/l)	-6,12 ± 0,08	-5,76 ± 0,07 #	-6,61 ± 0,16	-5,90 ± 0,09 #

Mittelwerte ± SEM

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. E_{\max} unter Kontrollbedingung (LM (Lösungsmittel), keine Blockade)

$p < 0,05$ vs. $\log EC_{50}$ unter Kontrollbedingung (LM, keine Blockade)

Der Effekt der L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade auf die Rechtsverschiebung der kumulativ applizierten NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve unterschied sich statistisch signifikant zwischen beiden Gruppen und war deutlich stärker bei Gefäßen der sympathektomierten Tiere (Tab. 3-2). Die neonatale Sympathektomie führte somit zu einer gesteigerten Sensitivität renaler Widerstandsgefäße gegenüber der Nifedipin-vermittelten L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade ($\Delta \log EC_{50} = 0,35 \pm 0,05$ mol/l vs. $0,69 \pm 0,10$ mol/l, CTR vs. SYX, $p < 0,05$). Die Reduktion von E_{\max} war in beiden Gruppen ähnlich (Tab. 3-2). Es konnte keine Interaktion zwischen Sympathektomie und Nifedipin-Behandlung bezüglich der Reduktion von E_{\max} nach L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade nachgewiesen werden. Die differentielle NA-Sensitivität der renalen Widerstandsgefäße, welche vor der Behandlung mit Nifedipin beobachtet wurde, konnte nach Blockade der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle nicht mehr beobachtet werden. Die $\log EC_{50}$ -Werte für die kumulativen NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterschieden sich nach L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade nicht mehr statistisch signifikant zwischen den Gefäßen beider Gruppen. Des Weiteren verschwand nach L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade der statistisch signifikante Unterschied zwischen beiden Gruppen für E_{\max} (Tab. 3-2).

Das Verschwinden der differentiellen NA-Sensitivität nach L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Blockade bzw. die erhöhte Sensitivität der renalen Widerstandsgefäße sympathektomierter Tiere gegenüber der L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Blockade deuten darauf hin, dass der Einstrom von Ca²⁺-Ionen durch L-Typ-Ca²⁺-Kanäle einen großen Beitrag zur NA-Supersensitivität nach neonataler Sympathektomie leistet.

Ergebnisse

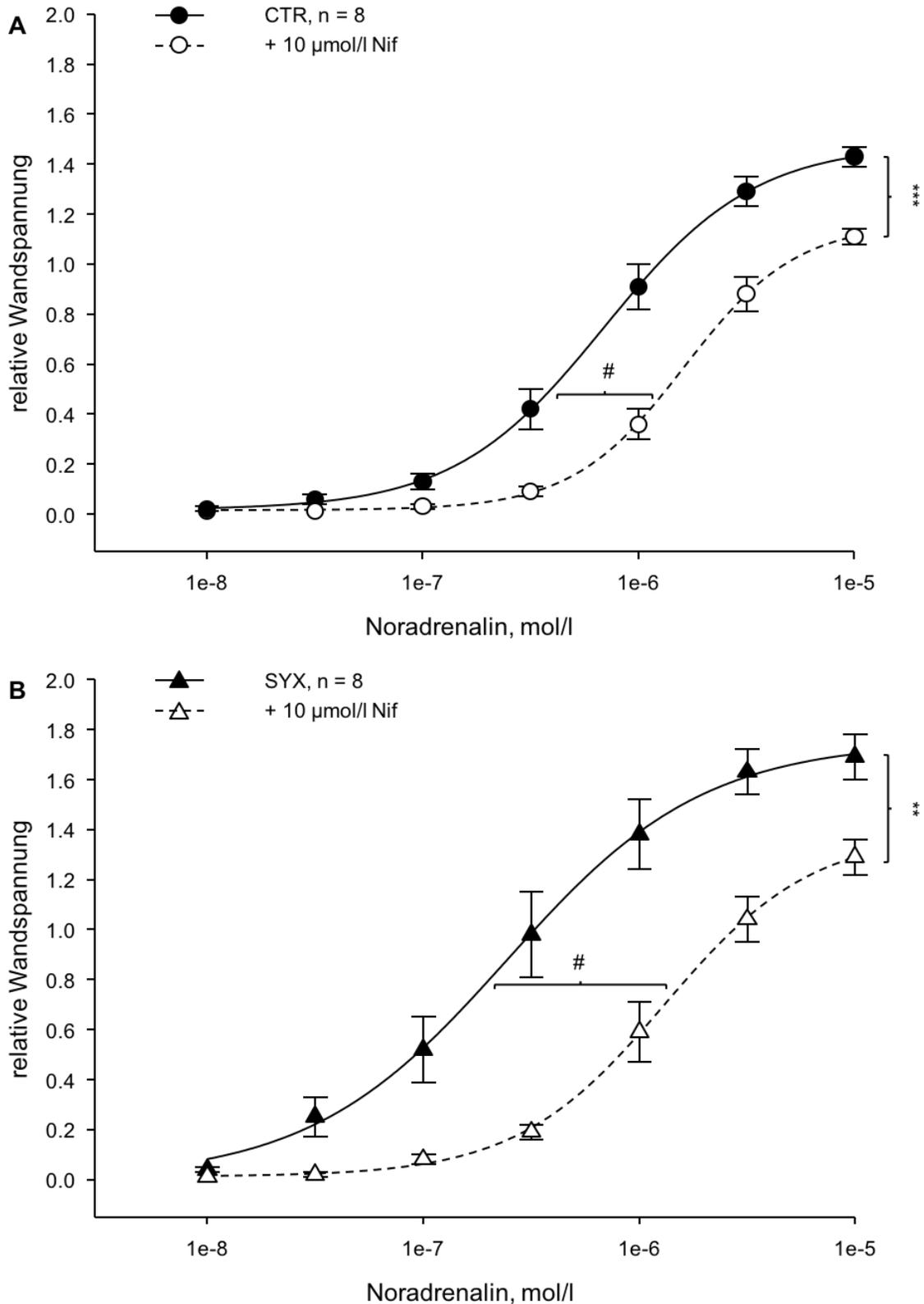


Abb. 3-2 Kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven vor und nach Nifedipin-vermittelter L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade von renalen Widerstandsgefäßen. A: Kontrolltiere (CTR) **B:** Sympathektomierte Tiere (SYX). NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit und ohne Nifedipin wurden in den selben Gefäßen registriert. Nifedipin führte in beiden Gruppen zu einer statistisch signifikanten Reduktion des E_{max}-Werts und zu einer Erhöhung des logEC₅₀-Werts. (Mittelwerte ± SE; ** p < 0,01, *** p < 0,001 signifikanter Unterschied der maximalen relativen Wandspannung (E_{max}): Nifedipin-Behandlung vs. Kontrollbedingung (LM); ## p < 0,05 signifikanter Unterschied der logEC₅₀-Werte für NA: Nifedipin-Behandlung vs. Kontrollbedingung (LM))

3.1.3 Effekt der simultanen L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade auf die Y-27632 vermittelte Rechtsverschiebung der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve

Es wurde untersucht, ob während L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade eine differentielle Sensitivität der isolierten Interlobararterien in Bezug auf ROCK-Inhibition besteht. Hierzu wurde dem Organbad im Anschluss an die NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve unter L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade (siehe 3.1.2) erneut Nifedipin und zusätzlich der ROCK-Inhibitor Y-27632 zugesetzt und nach einer 15-minütigen Einwirkzeit eine weitere NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt.

Der konzentrationsabhängige Anstieg der Wandspannung nach Gefäßstimulation mit NA konnte auch während simultaner Blockade der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle und ROCK-Hemmung in beiden Gruppen beobachtet werden (Abb. 3-3 A/B). In Gegenwart des L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockers führte die zusätzliche Hemmung der ROCK nicht zu einer weiteren Rechtsverschiebung der NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Es konnte jedoch in beiden Gruppen im Vergleich zur alleinigen L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade eine statistisch signifikante zusätzliche Abnahme der maximalen relativen Wandspannung (E_{max}) beobachtet werden (Tab. 3-3, Abb. 3-3 A/B). Für das Maximum der relativen Wandspannung (E_{max}) konnte auch nach L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade und ROCK-Inhibition ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gefäßen sympathektomierter und scheinsympathektomierter Tiere beobachtet werden ([#] $p < 0,05$).

Tab. 3-3 Effekt von Y-27632 auf $\log EC_{50}$ und E_{max} der NA-induzierten Vasokontraktion unter simultaner L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade

	CTR (n = 8)	CTR (n = 8) + Y-27632	SYX (n = 8)	SYX (n = 8) + Y-27632
LogEC ₅₀ (mol/l)	-5,76 ± 0,07	-5,74 ± 0,06	-5,90 ± 0,09	-5,83 ± 0,08
E_{max} (relative Spannung)	1,19 ± 0,05	0,79 ± 0,05 ***	1,36 ± 0,07	0,95 ± 0,05 *** / #

Mittelwerte ± SEM

*** $p < 0,001$ vs. E_{max} unter Kontrollbedingung (nur Nifedipin)

$p < 0,05$ vs. CTR + Y-27632

Der Effekt der zusätzlichen ROCK-Inhibition auf die NA-Sensitivität und E_{max} renaler Interlobararterien unterschied sich nicht zwischen Gefäßen beider Gruppen ($\Delta E_{max} = 0,40 \pm 0,05$ vs. $0,40 \pm 0,05$; CTR vs. SYX, n.s. / $\Delta \log EC_{50} = 0,03 \pm 0,06$ vs. $0,06 \pm 0,03$; CTR vs. SYX, n.s).

Ergebnisse

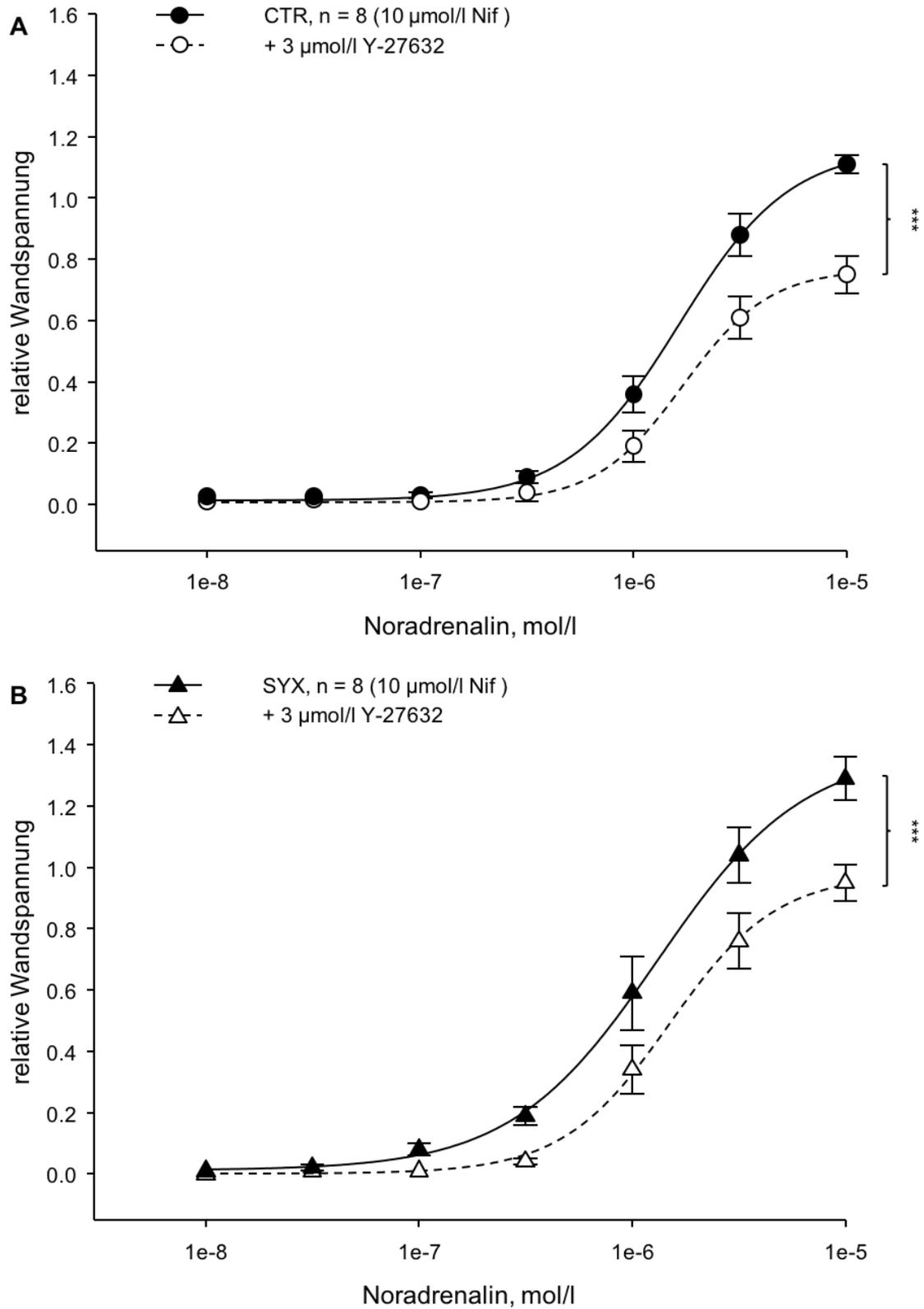


Abb. 3-3 Kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven von mit Nifedipin vorbehandelten renalen Widerstandsgefäßen. A Kontrolltiere (CTR) **B** Sympathektomierte Tiere (SYX). NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit und ohne Y-27632 wurden in den selben Gefäßen registriert. Nach zusätzlicher ROCK-Inhibition wurde in beiden Gruppen eine statistische signifikante Reduktion von E_{max} beobachtet. (Mittelwerte \pm SE; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied der relativen Wandspannung: simultane Blockade vs. Kontrollbedingung (nur Nifedipin))

Ergebnisse

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass keine stärkere ROCK-Abhängigkeit der Kontraktionsantwort nach L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blockade bei Gefäßen sympathektomierter Tiere besteht. Des Weiteren suggerieren die Daten, dass die in Vorversuchen beobachtete erhöhte Sensitivität der neonatal sympathektomierten Tiere gegenüber ROCK-Inhibition vermutlich nicht primär durch eine erhöhte ROCK-Aktivität zustande kommt, sondern möglicherweise durch Effekte L-Type- Ca^{2+} -Kanal-abhängiger Signalwege auf die Aktivierung der ROCK.

3.1.4 S(-)-BayK8644-induzierte L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Aktivierung

Nach pharmakologischer Aktivierung der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle durch Applikation von S(-)-BayK8644 konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Wandspannung beobachtet werden (Abb. 3-4). Die Gefäße sympathektomierter Tiere (SYX) zeigten im Vergleich zu den Kontrollen (CTR) eine signifikant stärkere Kontraktion und einen kleineren logEC₅₀-Wert hinsichtlich der S(-)-BayK8644-induzierten Vasokontraktion. ROCK-Inhibition verhinderte die Gefäßkontraktion in beiden Gruppen vollständig (Tab. 3-4, Abb. 3-4). Die Daten deuten darauf hin, dass die Vasokonstriktion durch Aktivierung von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen ROCK-abhängig ist. Zudem geben die Daten einen Hinweis darauf, dass eine verstärkte Aktivierung L-Type-Ca²⁺-Kanal-abhängiger Signalwege zur NA-Supersensitivität nach neonataler Sympathektomie beiträgt.

Tab. 3-4 LogEC₅₀ und E_{max} der S(-)-BayK8644-induzierten Vasokontraktion

	CTR (n = 7)	SYX (n = 7)	Mittelwerte ± SEM * p < 0,05 vs. CTR # p < 0,05 vs. CTR
E _{max} (relative Spannung)	0,12 ± 0,04	0,35 ± 0,08 *	
LogEC ₅₀ (mol/l)	-7,06 ± 0,15	-7,57 ± 0,09 #	

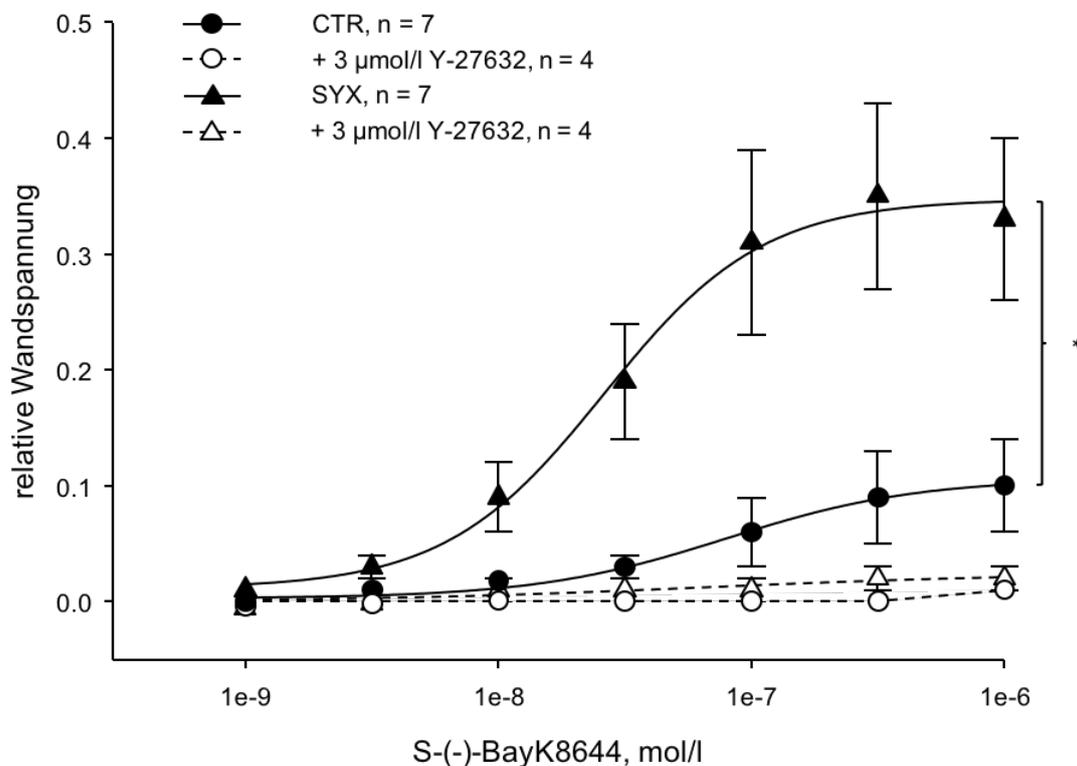


Abb. 3-4 Kumulative S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurven für renale Widerstandsgefäße von sympathektomierten Tieren (SYX) und Kontrollen (CTR). Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit und ohne Y-27632 wurden in den selben Gefäßsegmenten registriert. (Mittelwerte ± SE; * p < 0,05 signifikanter Unterschied der maximalen relativen Wandspannung (E_{max}): SYX vs. CTR)

3.1.5 Beitrag der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum

Um den Beitrag Ca^{2+} -abhängiger Signalmechanismen für die NA-Supersensitivität genauer zu untersuchen, wurde in weiteren Versuchen sowohl der Beitrag der IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung als auch der Beitrag der Ryanodin-Rezeptor(RyR)-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR für die NA-induzierte Vasokontraktion ermittelt.

Für die Untersuchung der IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR wurden die Gefäßkontraktionen nach Applikation von NA in Organbadlösung mit physiologischer Ca^{2+} -Konzentration und zusätzlich in Ca^{2+} -freier Badlösung registriert. Durch den Einsatz von Ca^{2+} -freier Badlösung wurde der Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Medium nach NA-Stimulation verhindert. Das Maximum der relativen Gefäßwandspannung (E_{max}) war für beide Gruppen in Ca^{2+} -freier Lösung im Vergleich zur Kontraktion in Lösung mit physiologischer Ca^{2+} -Konzentration statistisch signifikant geringer. Die relative Abnahme der Wandspannung unterschied sich nicht zwischen beiden Gruppen (Tab. 3-5, Abb. 3-5).

Tab. 3-5 E_{max} der NA-induzierten Vasokontraktion in Ca^{2+} -haltiger und Ca^{2+} -freier Organbadlösung

	CTR (n = 8) Ca^{2+} -haltig	CTR (n = 8) Ca^{2+} -frei	SYX (n = 8) Ca^{2+} -haltig	SYX (n = 8) Ca^{2+} -frei
relative Wandspannung	1,29 ± 0,04	0,67 ± 0,05 ***	1,77 ± 0,17	0,92 ± 0,13 ***

Mittelwerte ± SEM (relative Wandspannung normalisiert auf Wandspannung nach Stimulation mit kaliumreicher Lösung (K125)), *** $p < 0,001$ vs. E_{max} unter Kontrollbedingungen (Ca^{2+} -haltige Badlösung)

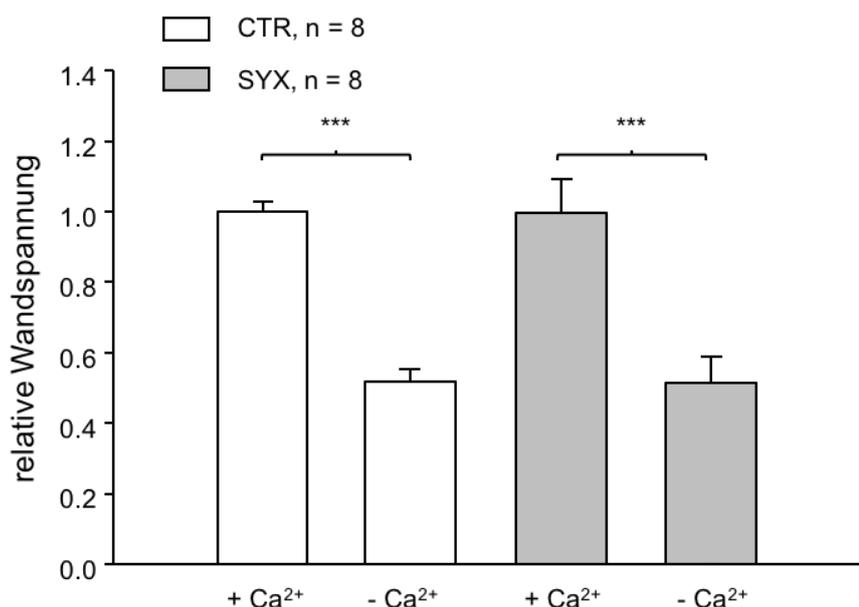


Abb. 3-5 Kontraktionsantwort renaler Widerstandsgefäße nach Stimulation mit NA in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} . Die maximalen NA-induzierten Wandspannungen in Ca^{2+} -haltiger Lösung wurden jeweils als 100 % gesetzt. Die Kontraktionsantworten in Ca^{2+} -freier Lösung sind in Relation zu den NA-induzierten Gefäßkontraktionen in Organbadlösung mit physiologischer Ca^{2+} -Konzentration angegeben. (Mittelwerte ± SE; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied der relativen Wandspannung: $-\text{Ca}^{2+}$ vs. $+\text{Ca}^{2+}$)

Ergebnisse

Der Beitrag der RyR-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) wurde mit dem RyR-Agonisten Coffein (20mM) untersucht. Die Kontraktionskraft nach Stimulation mit Coffein wurde auf die Gefäßwandspannung nach Stimulation mit kaliumreicher Organbadlösung (K125) normalisiert. Die relative Zunahme der Wandspannung nach Applikation von Coffein unterschied sich nicht zwischen beiden Gruppen. Die Gefäße der Kontrolltiere (CTR) entwickelten eine relative Gefäßwandspannung von $0,34 \pm 0,03$ nach Stimulation mit Coffein. In den Gefäßsegmenten der sympathektomierten Tiere (SYX) wurde eine Wandspannung von $0,38 \pm 0,03$ registriert (Abb. 3-6).

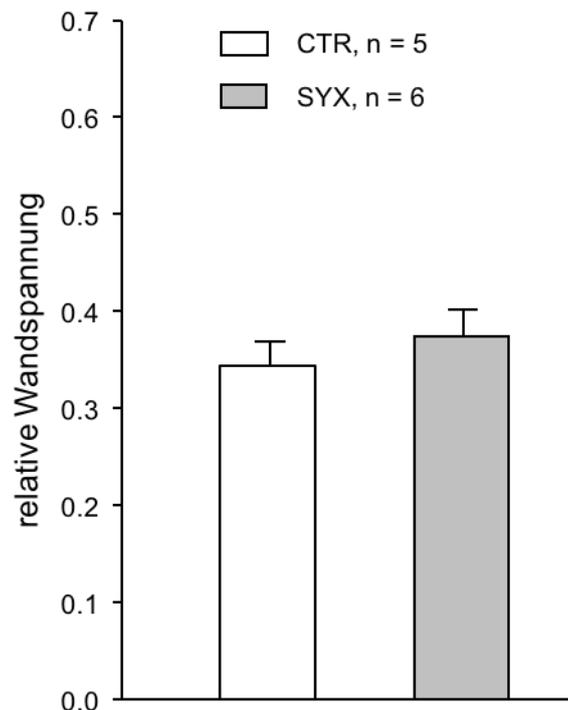


Abb. 3-6 Gefäßkontraktion renaler Widerstandsgefäße nach RyR-Stimulation mit 20mM Coffein. Die registrierte Wandspannung nach Stimulation mit Coffein wurde auf die maximale Gefäßkontraktion in Anwesenheit kaliumreicher Organbadlösung normalisiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und sympathektomierten Tieren. (Mittelwerte \pm SE)

Diese Daten deuten darauf hin, dass zwischen Gefäßen sympathektomierter und schein sympathektomierter Tiere keine Unterschiede hinsichtlich der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern nach NA-induzierter Gefäßkontraktion bestehen. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der IP_3 -Rezeptor-Aktivierung nach NA-stimulation bzw. der RyR-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung nach Coffein-Stimulation zwischen isolierten Gefäßsegmenten beider Gruppen.

3.1.6 Effekt der neonatalen Sympathektomie auf die Depolarisations-induzierte Vasokontraktion

Zur weiteren Untersuchung von Mechanismen, welche die Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen in intrarenalen Gefäßen nach neonataler Sympathektomie beeinflussen, wurden beide Gruppen auf differentielle Gefäßantworten bezüglich der Depolarisations-induzierten Vasokontraktion getestet. Die Depolarisation der Gefäße erfolgte durch eine ansteigende K^+ -Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die Gefäßantwort auf den Depolarisationsstimulus bestand aus einer schnellen, phasischen Komponente und einer lang anhaltenden, tonischen Komponente. Die absoluten Gefäßantworten wurden auf die maximale Gefäßkontraktion nach Stimulation mit kaliumreicher Pufferlösung (125 mmol/l K^+) normalisiert.

Die Gefäße der sympathektomierten Tiere (SYX) zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTR) sowohl für die phasische als auch für die tonische Komponente der Depolarisations-induzierten Vasokontraktion eine statistisch signifikant höhere Sensitivität (Tab. 3-6, Abb. 3-7, nur phasische Komponente graphisch dargestellt). Die maximal nach Depolarisation entwickelte Wandspannung (E_{\max}) zeigte für beide Phasen der Gefäßkontraktion keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen sympathektomierten Tieren und Kontrollgruppe (Tab. 3-6, Abb. 3-7, nur phasische Komponente graphisch dargestellt).

Diese Daten deuten darauf hin, dass zwischen den Gefäßen beider Gruppen Unterschiede bezüglich der Quantität und/oder der spannungsabhängigen Aktivierbarkeit von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen bestehen.

Tab. 3-6 LogEC₅₀ und E_{\max} der Depolarisations-induzierten Vasokontraktion ohne / mit ROCK-Inhibition

	CTR (n = 4)	CTR (n = 4)	SYX (n = 4)	SYX (n = 4)
ohne ROCK-Inhibition				
Kontraktion	phasisch	tonisch	phasisch	tonisch
E_{\max} (relative Spannung)	1,30 ± 0,08	0,86 ± 0,10	1,20 ± 0,06	0,94 ± 0,03
LogEC ₅₀ (mol/l)	1,61 ± 0,01	1,58 ± 0,02	1,51 ± 0,00 ###	1,48 ± 0,01 ##
mit ROCK-Inhibition				
E_{\max} (relative Spannung)	1,16 ± 0,04	0,45 ± 0,04 *	0,92 ± 0,02 **	0,30 ± 0,02 ***
LogEC ₅₀ (mol/l)	1,68 ± 0,00 **	1,74 ± 0,03 +	1,63 ± 0,01 ***	1,63 ± 0,01 ***

Mittelwerte ± SEM

p < 0,01 vs. CTR (tonisch)

p < 0,001 vs. CTR (phasisch)

+ p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs. LogEC₅₀ unter Kontrollbedingung (ohne ROCK-Inhibition)

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs. E_{\max} unter Kontrollbedingung (ohne ROCK-Inhibition)

Ergebnisse

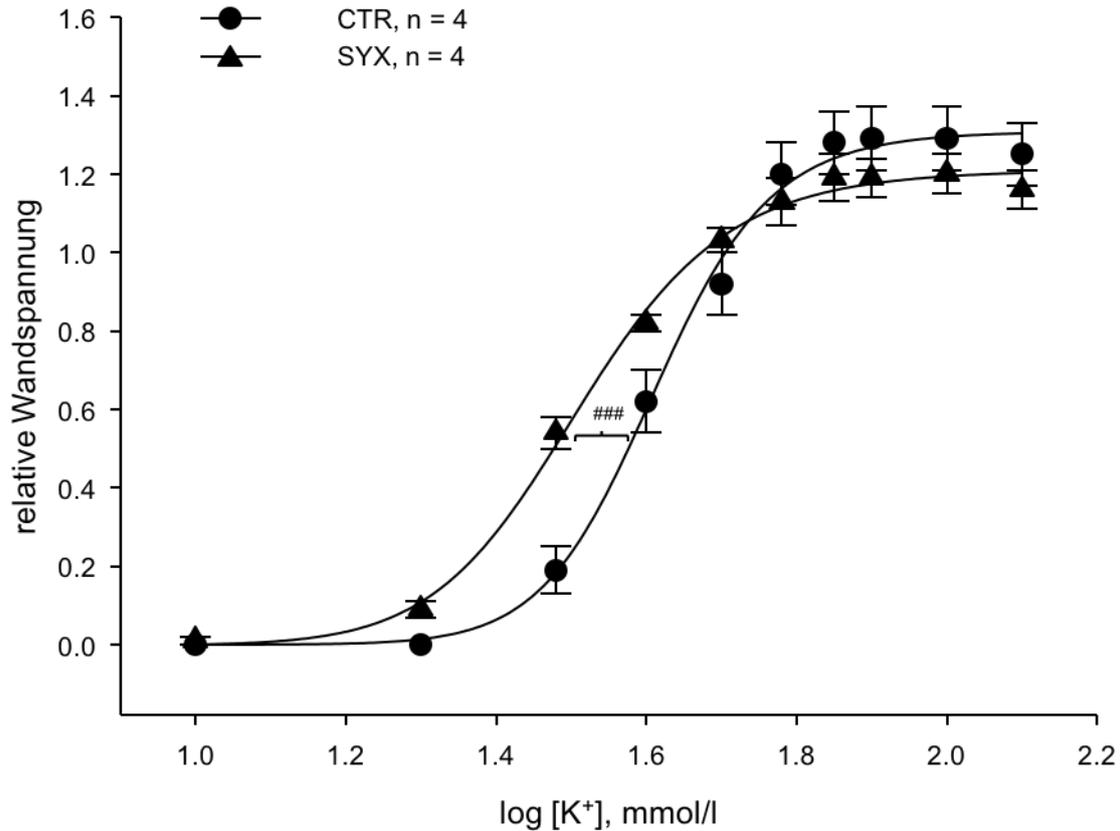


Abb. 3-7 K⁺-induzierte Gefäßkontraktion der renalen Widerstandsgefäße von sympathektomierten Tieren (SYX) und Kontrollen (CTR). Dargestellt ist das Maximum der phasischen Komponente der Depolarisations-induzierten Kontraktion. SYX zeigten eine Linksverschiebung der kumulativen K⁺-Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit einem statistisch signifikant geringeren logEC₅₀-Wert, im Vergleich zu den Kontrollen. (Mittelwerte ± SE; ### p < 0,001: signifikanter Unterschied der logEC₅₀-Werte: SYX vs. CTR)

Um den Beitrag der Rho-Kinase (ROCK) zur Depolarisations-induzierten Kontraktion zu bestimmen, wurden zusätzlich K⁺-Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit des ROCK-Hemmer Y-27632 registriert. ROCK-Inhibition führte sowohl in Gefäßen scheinsympathektomierter Kontrolltiere (Tab. 3-6, Abb. 3-8) als auch in Gefäßsegmenten neonatal sympathektomierter Tiere (Tab. 3-6, Abb. 3-9) zu einer statistisch signifikanten Rechtsverschiebung der K⁺-Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die statistisch signifikante Erhöhung des logEC₅₀-Werts konnte sowohl für die phasische Komponente als auch für die tonische Komponente (nicht graphisch dargestellt) der Kontraktion beobachtet werden (Tab. 3-6). Der Effekt der zusätzlichen ROCK-Inhibition auf die Sensitivität der renalen Interlobararterien für die Depolarisations-induzierte Kontraktion unterschied sich statistisch signifikant zwischen den Gefäßen beider Gruppen ($\Delta\log\text{EC}_{50} = 0,06 \pm 0,01$ vs. $0,11 \pm 0,01$; CTR vs. SYX, p < 0,05) (Abb. 3-8Abb. 3-9).

Ergebnisse

Für die phasische Komponente der Kontraktion isolierter Gefäße sympathektomierter Tiere verringerte sich das Maximum der relativen Wandspannung (E_{\max}) statistisch signifikant durch Inhibition der ROCK (Tab. 3-6, Abb. 3-9). Im Gegensatz dazu änderte sich E_{\max} der phasischen Kontraktionskomponente scheinbehandelter Kontrollen durch die ROCK-Inhibition nicht statistisch signifikant (Tab. 3-6, Abb. 3-8).

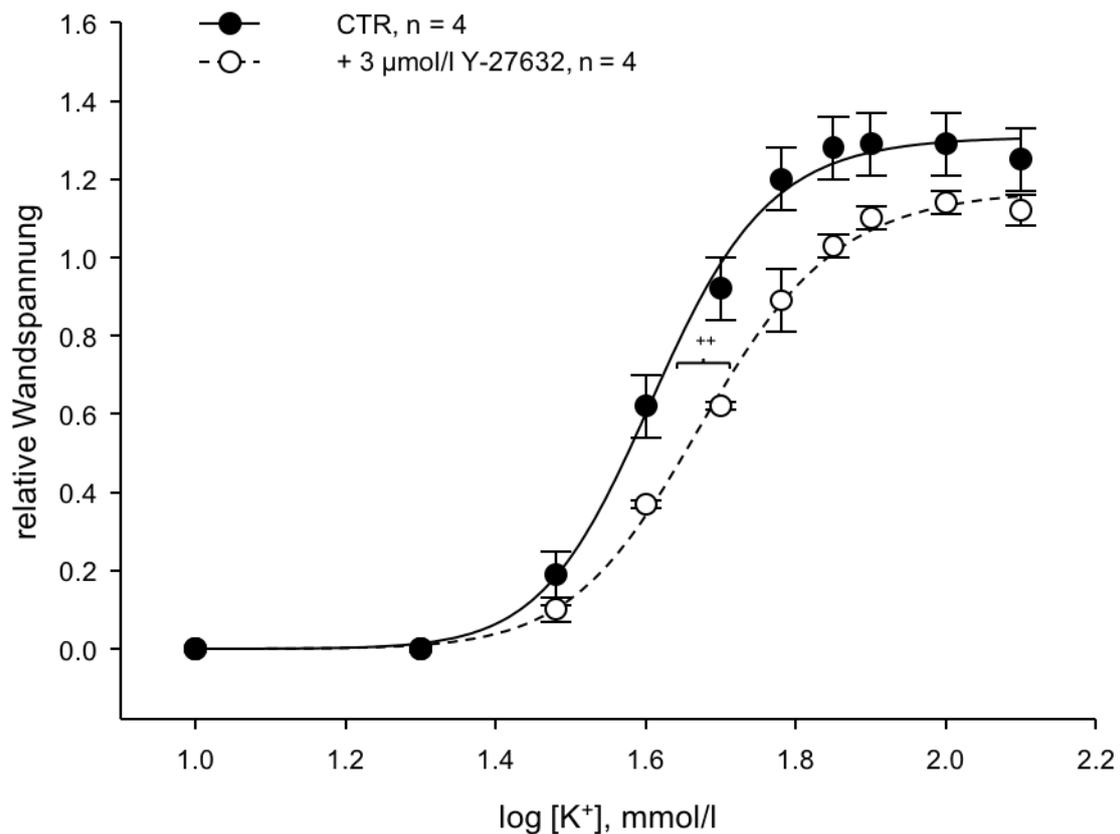


Abb. 3-8 K⁺-Konzentrations-Wirkungs-Kurve renaler Widerstandsgefäße schein sympathektomierter Kontrolltiere in An- und Abwesenheit von Y-27632. Kurven mit und ohne Y-27632 wurden in verschiedenen Gefäßen registriert. ROCK-Inhibition führte zur Rechtsverschiebung der K⁺-Konzentrations-Wirkungs-Kurve. (Mittelwerte \pm SE; ** $p < 0,01$ signifikanter Unterschied der $\log EC_{50}$ -Werte für K⁺: Y-27632-Behandlung vs. Kontrollbedingung)

Ergebnisse

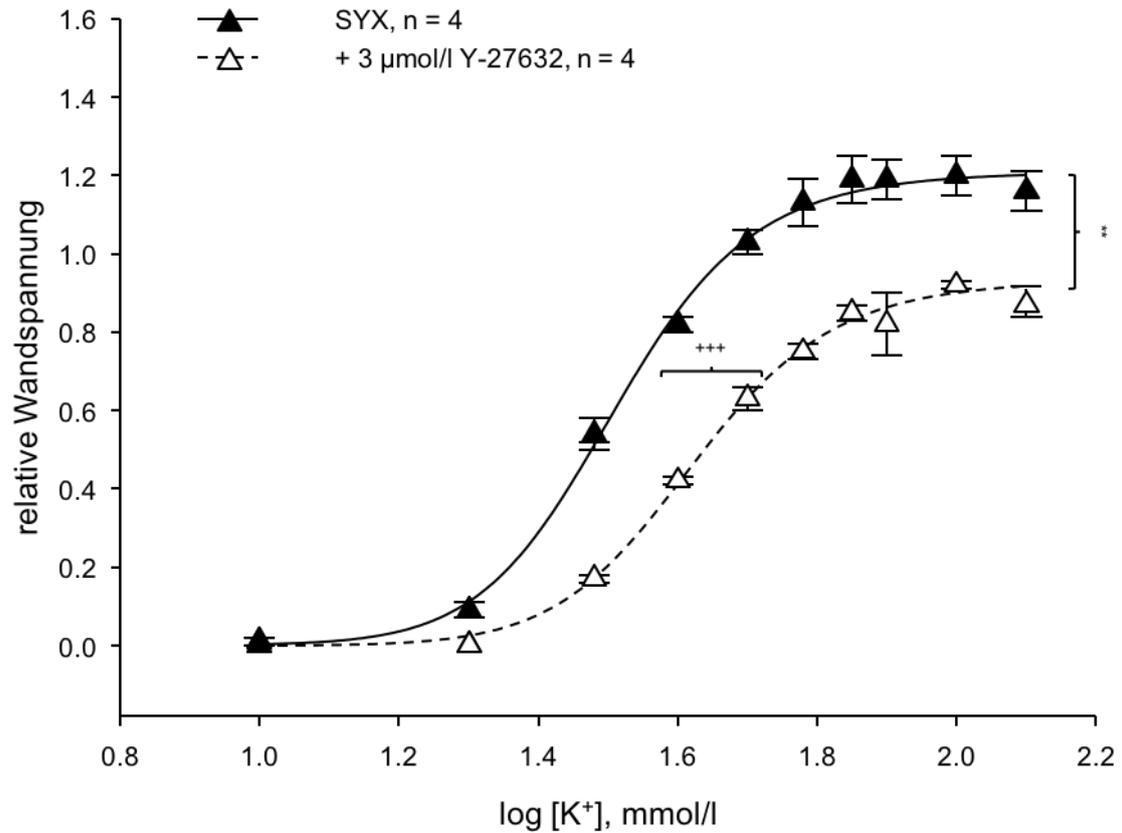


Abb. 3-9 K⁺-Konzentrations-Wirkungs-Kurve renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter Tiere in An- und Abwesenheit von Y-27632. Kurven mit und ohne Y-27632 wurden in verschiedenen Gefäßen registriert. ROCK-Inhibition führte zur Rechtsverschiebung der K⁺-Konzentrations-Wirkungs-Kurve. (Mittelwerte ± SE; +++ p < 0,001 signifikanter Unterschied der logEC50-Werte für K⁺: Y-27632-Behandlung vs. Kontrollbedingung)

3.1.7 Effekt des Membranpotentials auf die Aktivierbarkeit der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle

Zur Überprüfung, ob die differentielle Sensitivität renaler Gefäße gegenüber S(-)-BayK8644-induzierter L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Aktivierung vom Membranpotential der glatten Muskelzellen abhängig ist, wurde der Effekt der Membrandepolarisation bzw. Membranhyperpolarisation auf die S(-)-BayK8644-induzierte Kontraktion untersucht. Die absoluten Gefäßantworten auf die Applikation von S(-)-BayK8644 wurden auf die maximale Gefäßkontraktion nach Stimulation mit kaliumreicher Pufferlösung (125 mmol/l K⁺) normalisiert.

Die Applikation des Depolarisationsstimulus (20 mmol/l K⁺) führte bei Gefäßen sympathektomierter Tiere zu einer verstärkten S(-)-BayK8644-induzierten Vasokontraktion. Es zeigte sich ein statistisch signifikant erhöhter Wert für die maximal entwickelte Gefäßwandspannung (E_{max}) und eine signifikante Reduktion des logEC₅₀-Werts der kumulativen S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Tab. 3-7;). Nach Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle mittels Levromakalim verschwand die S(-)-BayK8644-induzierte Vasokontraktion in den Gefäßen der sympathektomierten Tiere. Die Applikation von Levromakalim hatte keinen Effekt auf den basalen Gefäßtonus (Tab. 3-7; Abb. 3-10, B).

Die Gefäße scheinsympathektomierter Tiere reagierten unter Kontrollbedingungen nicht mit einer Gefäßkontraktion nach Applikation von S(-)-BayK8644. Nach Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration auf 20 mmol/l zeigten auch die Gefäße der Kontrolltiere eine konzentrationsabhängige Kontraktion als Antwort auf die L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Aktivierung mittels S(-)-BayK8644. Levromakalim hatte keinen Effekt auf die S(-)-BayK8644-induzierte Kontraktion der Gefäße scheinsympathektomierter Kontrolltiere (Tab. 3-7; Abb. 3-10, A).

Tab. 3-7 LogEC₅₀ und E_{max} der S(-)-BayK8644-induzierten Vasokontraktion vor und nach Membrandepolarisation

	Kontrollbedingung	Depolarisation	Hyperpolarisation
	CTR (n = 4)	CTR (n = 4)	CTR (n = 4)
E _{max} (relative Spannung)	0,01 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,01 ± 0,01
LogEC ₅₀ (mol/l)	nicht bestimmbar	-7,80 ± 0,04	nicht bestimmbar
	SYX (n = 4)	SYX (n = 4)	SYX (n = 4)
E _{max} (relative Spannung)	0,22 ± 0,03	0,35 ± 0,04 *	0,01 ± 0,01
LogEC ₅₀ (mol/l)	-7,25 ± 0,08	-7,96 ± 0,06 ###	nicht bestimmbar

Mittelwerte ± SEM

* p < 0,05 vs. E_{max} unter Kontrollbedingung

p < 0,001 vs. logEC₅₀ unter Kontrollbedingung

Ergebnisse

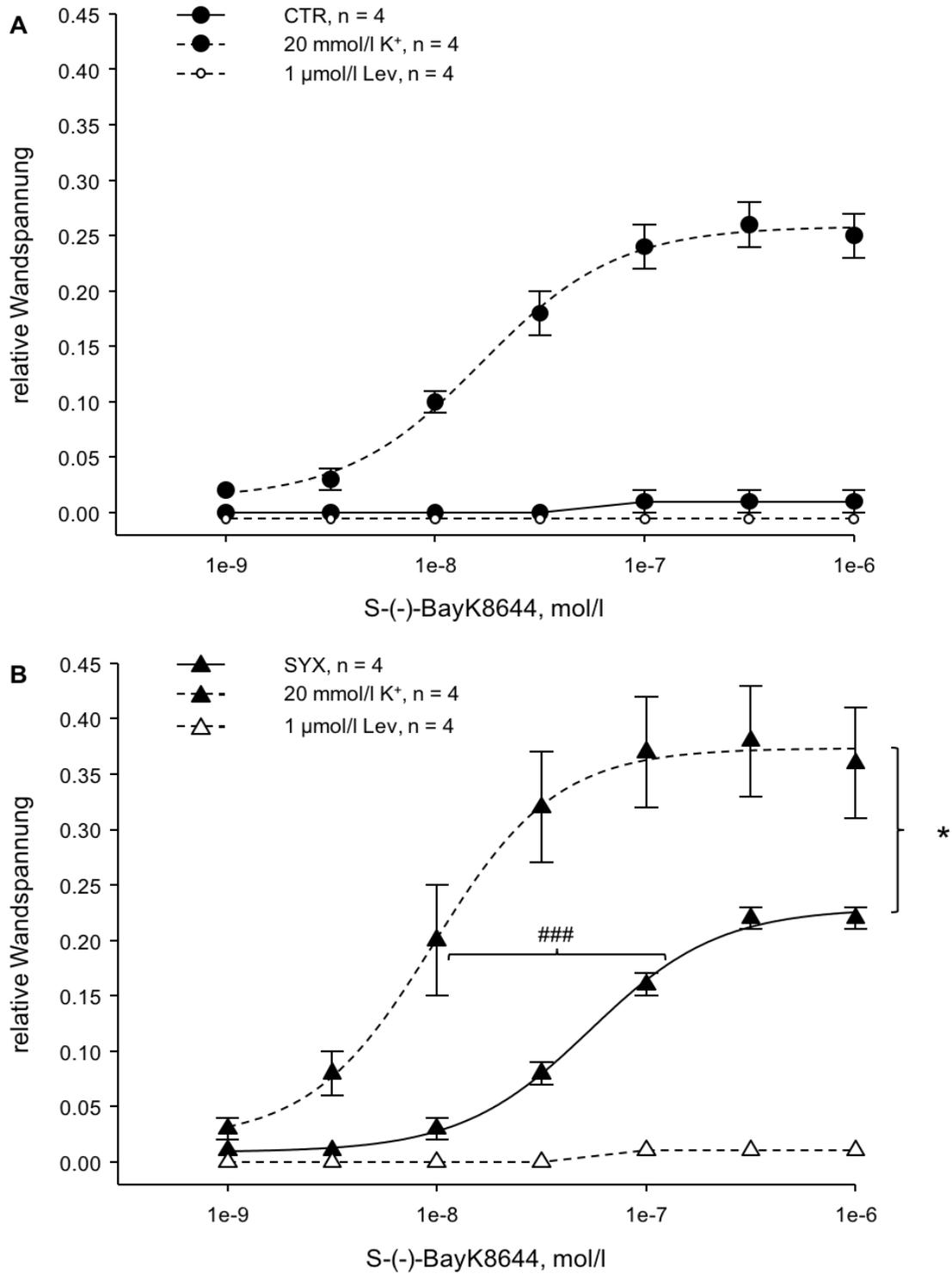


Abb. 3-10 Kumulative S-(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurve für renale Widerstandsgefäße unter Kontrollbedingungen (KRB-Lösung), Membrandepolarisation (20 mmol/l K⁺) und Membranhyperpolarisation (Lev, 1 μmol/l). A Kontrolltiere (CTR) B sympathektomierte Tiere (SYX). In Anwesenheit von 20 mmol/l K⁺ zeigte sich für die sympathektomierten Tiere ein signifikant geringerer logEC₅₀-Wert für S-(-)-BayK8644 und eine signifikante Erhöhung der relativen Wandspannung (E_{max}) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Gefäße der Kontrolltiere zeigten eine ausgeprägte Kontraktion in Anwesenheit von 20 mmol/l K⁺. (Mittelwerte ± SE; * p < 0,05 signifikanter Unterschied der relativen Wandspannung: 20 mmol/l K⁺ vs. Kontrollbedingung; ### p < 0,001 signifikanter Unterschied der logEC₅₀-Werte für S-(-)-BayK8644: 20 mmol/l K⁺ vs. Kontrollbedingung)

3.2 Western-Blot

Zur Bestimmung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Proteingehalts glatter Gefäßmuskelzellen renaler Widerstandsgefäße wurde die Fraktion der Membranproteine aus dem Probenmaterial aufgearbeitet und schließlich mittels Western-Blot-Techniken untersucht.

Mit Hilfe des Anti- $\text{Ca}_v1.2$ -Antikörpers wurde der Proteingehalt der $\alpha 1$ -Untereinheit des Typ C detektiert (porenbildende Untereinheit, Gen: CACNA1C). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der Menge an L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Protein in den renalen Widerstandsgefäßen (Abb. 3-11).

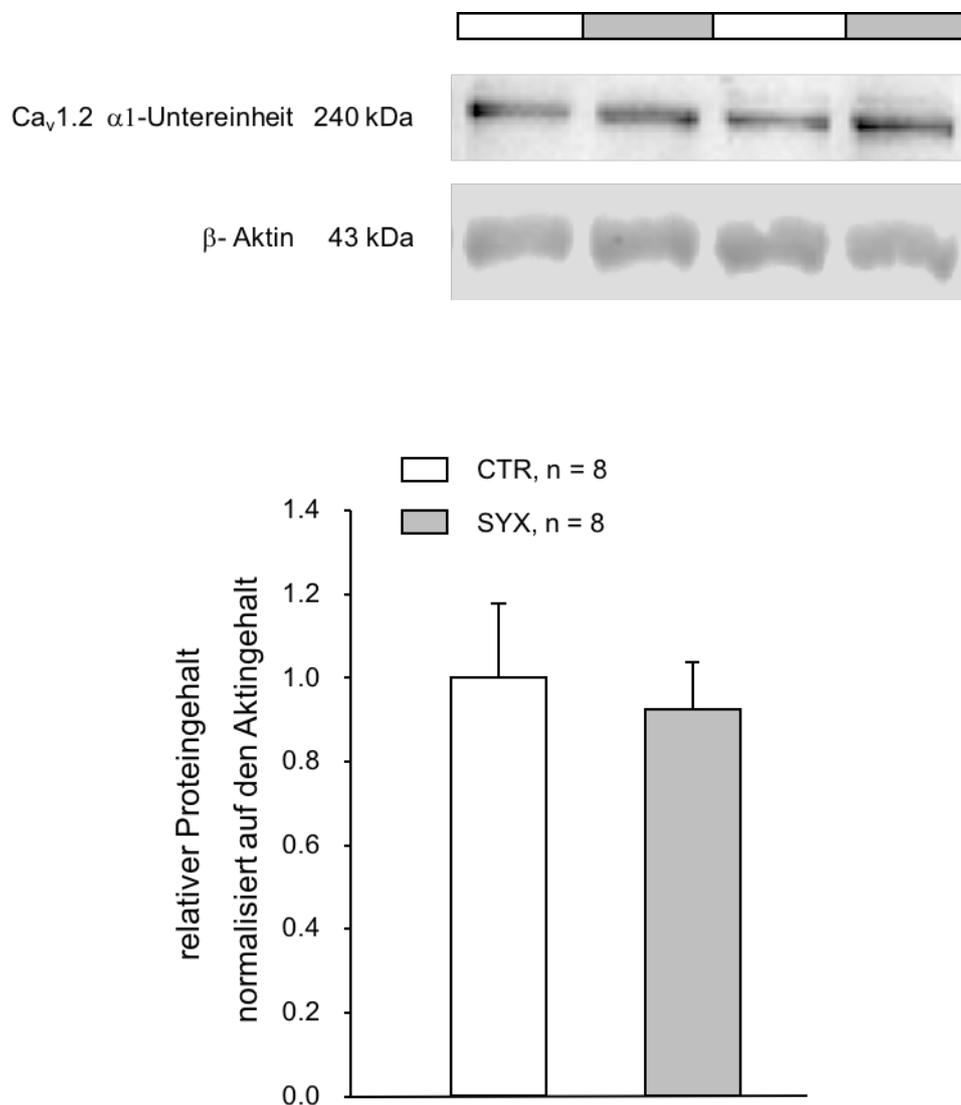


Abb. 3-11 Relativer Proteingehalt der $\alpha 1$ -Untereinheit (Typ C) des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals ($\text{Ca}_v1.2$). Untersucht wurden renale Widerstandsgefäßen, welche aus Kontrolltieren und neonatal sympathektomierten Tieren isoliert wurden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Proteingehalts der porenbildenden Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals in den Gefäßen beider Gruppen. (Mittelwerte \pm SE)

3.3 Membranpotentialmessung

Für die Messung des Membranpotentials der Gefäßmuskelzellen wurden renale Widerstandsgefäße sympathektomierter und scheinsympathektomierter männlicher Wistar-Ratten isoliert und vom umliegenden Bindegewebe (Tunica Adventitia) befreit. Nach Prüfung der Gefäßvitalität erfolgte die Registrierung der Membranpotentiale mittels Mikroelektroden.

Die glatten Gefäßmuskelzellen sympathektomierter Tiere zeigten ein statistisch signifikant depolarisiertes Ruhemembranpotential im Vergleich zu denen scheinsympathektomierter Kontrollen ($-64,31 \pm 0,32$ mV vs. $-57,52 \pm 2,02$ mV, CTR vs. SYX, * $p < 0,01$, $n = 5-6$) (Abb. 3-12). Die durchschnittliche Zeit bis zur Registrierung eines stabilen Membranpotentials unterschied sich dabei nicht zwischen den Gefäßen beider Gruppen, sodass Ermüdungseffekte der Muskulatur, welche für den Unterschied bezüglich des Ruhemembranpotentials verantwortlich sein könnten, zu vernachlässigen sind.

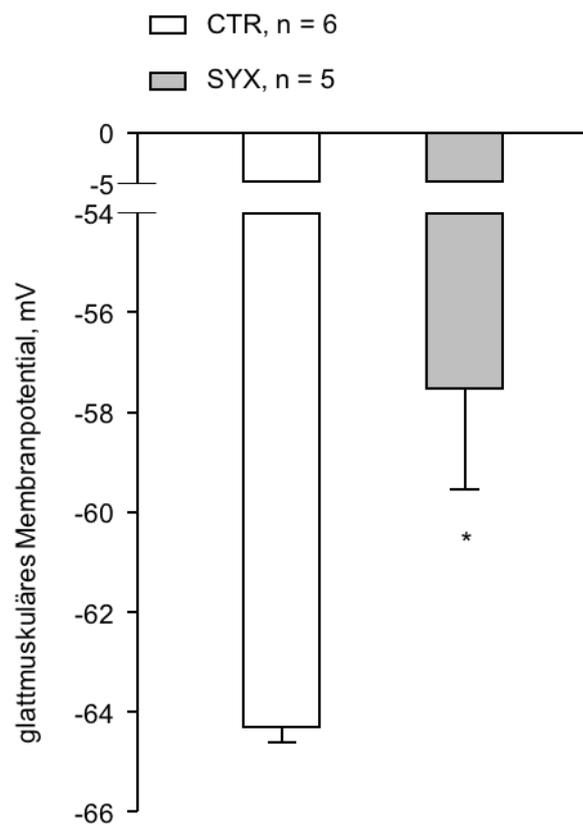


Abb. 3-12 Membranpotential der glatten Gefäßmuskelzellen von isolierten renalen Widerstandsgefäßen neonatal sympathektomierter und scheinsympathektomierter Tiere. Für die glatten Gefäßmuskelzellen der sympathektomierten Tiere zeigte sich ein signifikant geringeres Ruhemembranpotential. (Mittelwerte \pm SE; * $p < 0,01$ signifikanter Unterschied des Ruhemembranpotentials: SYX vs. CTR)

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es nach neonataler Sympathektomie zu einer erhöhten Sensitivität proximaler renaler Widerstandsgefäße gegenüber NA-induzierter Vasokontraktion kommt. Des Weiteren konnte für Gefäße sympathektomierter Tiere eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade und ROCK-Inhibition beobachtet werden. Dies zeigte sich, im Vergleich zu scheinsympathektomierten Kontrollen, an einer stärkeren Rechtsverschiebung der NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven nach pharmakologischer Inhibition der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle bzw. der ROCK. Nach renaler Sympathektomie zeigte sich eine erhöhte Sensitivität bezüglich der L-Typ-Ca²⁺-Kanalaktivierbarkeit und ein depolarisiertes Membranpotential glatter Gefäßmuskelzellen renaler Widerstandsgefäße.

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bzgl. der NA-Sensitivität renaler Widerstandsgefäße bestehen. Das Geschlecht der Tiere hatte keinen statistisch signifikanten Effekt auf das Ausmaß der durch die neonatale Sympathektomie verursachten Linksverschiebung der NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve [106;226]. Diese Befunde konnten auch in experimentellen Studien anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden [153;162]. Zudem zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Wirkungen der Sympathektomie auf die L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockade bzw. ROCK-Inhibition der renalen Gefäße [106]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass sich die langfristigen Wirkungen der sympathischen Innervation auf renale Blutgefäße von männlichen und weiblichen Ratten ähneln. Daher haben wir uns dazu entschieden, in den Experimenten dieser Arbeit ausschließlich männliche Wistar-Ratten zu betrachten.

Das gesteigerte Kontraktionsverhalten arterieller Gefäße nach pharmakologisch-induzierter Degeneration des sympathischen Nervensystems (SNS) ist ein bekanntes Phänomen und wurde von diversen Autoren für verschiedene Gefäßgebiete und Tiermodelle beschrieben. Slovut *et al.* zeigten für Schwanzarterien von WKY eine erhöhte Sensitivität gegenüber NA nach kurzfristiger Sympathektomie mittels Reserpin [229]. In Studien von Rizzoni *et al.* wurden die Gefäßantworten auf eine Vielzahl vasoaktiver Substanzen nach kurzfristiger Sympathektomie durch 6-Hydroxydopamin untersucht [206]. Sie konnten in *in-vitro*-Versuchen zeigen, dass isolierte arterielle Mesenterialgefäße sympathektomierter WKY im Vergleich zu Kontrollen mit einer verstärkten Vasokontraktion nach Applikation von NA, Vasopressin und Phenylephrin reagierten. Für isolierte zerebrale Gefäßsegmente konnte dies hingegen nicht bestätigt werden [206]. Lee *et al.* konnten für Mesenterialarterien und für Schwanzarterien von chronisch sympathektomierten WKY und SHR im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ebenfalls eine erhöhte NA-Sensitivität nachweisen [148]. Die Ratten wurden in diesen Studien durch Guanethidin-Injektionen und Antikörper gegen den Nervenwachstumsfaktor

sympathektomiert [148]. Neben arteriellen Gefäßen konnte die verstärkte NA-Sensitivität nach sympathischer Denervierung auch im venösen Gefäßsystem nachgewiesen werden [12]. Weitere Studien zeigten auch bei isolierten renalen Widerstandsgefäßen eine erhöhte Sensitivität gegenüber NA nach neonataler Sympathektomie [91;110]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte auch in der vorliegenden Studie eine verstärkte NA-Sensitivität renaler Widerstandsgefäße nach neonataler Sympathektomie beobachtet werden (siehe 3.1.1).

Im Gegensatz dazu stehen die Befunde einer Studie von Ralevic und Burnstock [198]. Hier zeigte sich eine verstärkte Sensitivität mesenterialer Gefäße gegenüber NA lediglich nach akuter Sympathektomie mittels 6-Hydroxydopamin. Nach chronischer, Guanethidin-induzierter Sympathektomie konnte keine Linksverschiebung der NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve beobachtet werden [198]. Die unterschiedlichen Befunde lassen sich möglicherweise durch unterschiedliche Verfahren der Sympathektomie erklären. Bei der von Ralevic und Burnstock durchgeführten Sympathektomie erfolgte keine Entfernung des Nebennierenmarks [198].

Die renale sympathische Innervation der Ratte entwickelt sich im Verlauf der ersten drei Wochen nach der Geburt. Die Kombination aus chemischer Sympathektomie mittels Guanethidin-Injektionen und anschließender chirurgischer Entfernung des Nebennierenmarks in den ersten vier Lebenswochen führt nachweislich zur Zerstörung der peripheren sympathischen Nerven und zur Absenkung der Katecholaminkonzentrationen im Blut und in verschiedenen Geweben [93;147;193]. Die beteiligten zellulären Mechanismen, welche zur verstärkten NA-Sensitivität nach neonataler Sympathektomie beitragen, sind aktuell noch unzureichend erforscht.

Eine mögliche Ursache für den beobachteten Anstieg der Sensitivität gegenüber NA nach sympathischer Denervierung sind Veränderungen auf Ebene der α -Adrenorezeptoren. Vorstellbar wäre eine gesteigerte Affinität der Rezeptoren für ihre Agonisten oder eine Heraufregulierung der Rezeptordichte. Nach In-vivo-Applikation von α -Adrenorezeptor-Agonisten konnte bei sympathektomierten Ratten im Vergleich zu scheinsympathektomierten Kontrollen ein erhöhter Anstieg des Blutdrucks registriert werden [206]. Stassen *et al.* zeigten in den Ergebnissen ihrer Studie eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein von adrenergen Nerven und α_{1A} -Adrenorezeptoren in Mesenterialarterien der Ratte. Nach akuter Sympathektomie mittels 6-Hydroxydopamin zeigte sich eine verminderte Dichte von α_{1A} -Adrenorezeptoren [235]. Colucci *et al.* konnten für isolierte Mesenterialgefäße von Sprague-Dawley Ratten eine Heraufregulierung von α_1 -Adrenorezeptoren beobachten, nachdem sie mittels Reserpin eine Verarmung des Neurotransmitters NA im postganglionären

Teil des SNS herbeigeführt hatten [46]. Die unilaterale chirurgische Denervierung von Nieren führte in tierexperimentellen Studien zu erhöhter Konzentration von α_1 -Adrenorezeptoren im Nierengewebe, verglichen mit dem Gewebe der intakten kontralateralen Niere [258].

Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich am besten durch unterschiedliche Verfahren der Sympathektomie erklären. Aktuell existieren keine Rezeptorbindungsstudien bzw. quantitative Erfassungen der α_1 -Adrenorezeptoren in Nierengefäßen von Ratten, welche durch Injektion von Guanethidin und Entfernung des Nebennierenmarks neonatal sympathektomiert wurden. Ob eine verstärkte Affinität und/oder erhöhte Dichte der α_1 -Adrenorezeptoren für Katecholamine – insbesondere NA – die Ursache für die „Supersensitivität“ der Nierengefäße nach neonataler Sympathektomie darstellt, gilt es in nachfolgenden Untersuchungen zu klären.

Die erhöhte Sensitivität besteht nicht nur gegenüber Adrenorezeptoragonisten, sondern auch gegenüber Vasokonstriktoren, welche keine Adrenorezeptoragonisten sind [91;110;197]. Diese Befunde zeigen, dass neben Veränderungen auf Ebene der Adrenorezeptoren auch Modifikationen in Ca^{2+} -abhängigen und Ca^{2+} -unabhängigen Signalwegen einen Beitrag zur gesteigerten NA-Sensitivität nach neonataler sympathischer Denervierung leisten. Eine mögliche Ursache wäre ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle durch z.B. erhöhte Anzahl von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen in der Membran der glatten Gefäßmuskelzellen oder durch verstärkte Aktivierbarkeit dieser Kanäle. Denkbar wäre auch eine erhöhte Aktivität der ROCK bzw. verstärkte Aktivierbarkeit der ROCK nach Stimulation mit NA in den renalen Widerstandsgefäßen sympathektomierter Tiere.

In den vorliegenden Experimenten zeigten die renalen Widerstandsarterien der schein-sympathektomierten Kontrolltiere nur eine geringfügige Kontraktion nach Stimulation mit S(-)-BayK8644. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen aus einer Studie von Hansen *et al.* [99]. Im Gegensatz zur ausbleibenden Wirkung bei renalen Widerstandsarterien schein-sympathektomierter Tiere verursachte die L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivierung mittels S(-)-BayK8644 bei Nierenarterien sympathektomierter Tiere eine deutliche Vasokontraktion. In Übereinstimmung mit der unterschiedlichen Wirkung der pharmakologischen L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivierung auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße sympathektomierter und schein-sympathektomierter Tiere zeigten die renalen Widerstandsgefäße sympathektomierter Tiere im Vergleich zu den Gefäßen schein-sympathektomierter Kontrollen eine stärkere Rechtsverschiebung der NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach Nifedipin-vermittelter L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockade. Das unterschiedliche Kontraktionsverhalten renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter und schein-sympathektomierter Versuchstiere nach spezifischer Öffnung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen mittels S(-)-BayK8644 bzw. die differentielle

Empfindlichkeit der NA-induzierten Kontraktion gegenüber L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockade mittels Nifedipin stützen die Vermutung, dass Veränderungen in Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen für die NA-Supersensitivität nach neonataler Sympathektomie von Bedeutung sind.

Um diese aktuellen Forschungsergebnisse auf molekularer Ebene zu erklären, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der neonatalen Sympathektomie auf die Proteinexpression der porenbildenden $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ($\text{Ca}_v1.2$, Gen: *CACNA1C*) getestet. Die $\alpha 1$ -Untereinheit des Typ C ist dominierender Subtyp bei glatten Gefäßmuskelzellen und trägt die Bindungsstelle für Dihydropyridine [109]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zwischen glatten Muskelzellen renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter und schein sympathektomierter Ratten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Proteingehalts der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit bestehen. Dies deutet darauf hin, dass die gesteigerte Reaktion renaler Widerstandsarterien sympathektomierter Ratten auf Nifedipin bzw. S-(-)-BayK8644 nicht allein durch unterschiedliche Expressionsniveaus der Dihydropyridin-Bindungsstellen zu erklären ist.

Auf Grund fehlender Unterschiede hinsichtlich des Proteingehalts der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals zwischen Gefäßen beider Gruppen wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, um weitere Ca^{2+} -freisetzende Mechanismen zu untersuchen. Möglicherweise führt die verstärkte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zu gesteigerten Gefäßantworten bei Gefäßen sympathektomierter Tiere. Die Ergebnisse der pharmakologischen Experimente in Ca^{2+} -freier Organbadlösung und nach Aktivierung der Ryanodin-Rezeptoren zeigen, dass die neonatale Sympathektomie keinen Einfluss auf die Abhängigkeit der NA-induzierten Gefäßkontraktion von der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern hat. Weiterführend gilt es in nachfolgenden Studien zu untersuchen, welchen Beitrag spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle anderer Subgruppen (L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, P/Q-Typ- Ca^{2+} -Kanal) und unselektive Kationenkanäle (TRP-Kanäle) für das gesteigerte Kontraktionsverhalten renaler Widerstandsgefäße nach neonataler Sympathektomie leisten.

In den letzten Jahren erbrachten experimentelle Studien zunehmend Hinweise, wonach die posttranskriptionelle Kontrolle von Genen eine wichtige Rolle für die Funktion der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle spielt. Die spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sind heterooligomere Proteinkomplexe, welche aus einer porenbildenden $\alpha 1$ -Untereinheit und den regulatorischen $\alpha 2\delta$ -, β -, und γ -Untereinheiten bestehen [13;38]. Das Gen der porenbildenden $\alpha 1$ -Untereinheit Typ C ($\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle, Gen: *CACNA1C*) unterliegt dem Vorgang des alternativen Spleißens. Dadurch besteht die Möglichkeit, aus einer DNA-Sequenz mehrere verschiedene reife mRNA-Moleküle und durch deren Translation mehrere unterschiedliche Proteine zu bilden [5]. Im menschlichen Gen der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit unterliegen 19 der 55 Exons

dem Prozess des alternativen Spleißens. Durch die Variationen in der Aminosäuresequenz der kanalbildenden Untereinheit ergeben sich Modifikationen hinsichtlich der elektrophysiologischen Eigenschaften der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle [128;232;239]. Cheng *et al.* konnten zeigen, dass es durch alternatives Spleißen zu einer Verschiebung der Spannungsempfindlichkeit von $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen kommt [43]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Spleißvarianten des N-Terminus der $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle die Oberflächenexpression der Kanäle auf der glattmuskulären Zellmembran modulieren [15]. Da L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle vom Subtyp $\text{Ca}_v1.2$ einen wichtigen Regulator der Kontraktilität arterieller Gefäßen darstellen und diesen Kanälen eine Bedeutung für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zugeschrieben wird, ist es von Bedeutung, die physiologischen Funktionen von Spleißvarianten zu untersuchen. Ob der Vorgang des alternativen Spleißens einen entscheidenden Beitrag für das veränderte Kontraktionsverhalten renaler Widerstandsarterien sympathektomierter Ratten nach pharmakologischer L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockade bzw.-aktivierung leistet, gilt es in nachfolgenden Studien noch herauszufinden.

In Vorversuchen im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die neonatale Sympathektomie zu einer erhöhten ROCK-Abhängigkeit der NA-induzierten Kontraktionen bei renalen Widerstandsarterien führt. Analysen auf molekularer Ebene ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des mRNA-Gehalts der ROCK-Isoformen (ROCK I und II) und dem basalen Phosphorylierungsstatus von ROCK-Substraten zwischen Gefäßen sympathektomierter Tiere und schein sympathektomierter Kontrollen [106;226]. Weiterhin zeigte sich in diesen Versuchen kein NA-induzierter Anstieg des Phosphorylierungsstatus von ROCK-Substraten (pMYPT1/MYPT1, pERM/ERM) [106]. Die erhöhte ROCK-Abhängigkeit der NA-induzierten Vasokontraktion renaler Widerstandsarterien sympathektomierter Tiere könnte demnach ein Resultat sekundärer Effekte sein. Denkbar wäre eine verstärkte Adrenorezeptor-abhängige bzw. L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-abhängige Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges [72;256]. In dieser Arbeit wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob Veränderungen in ROCK-abhängigen Signalkaskaden eine Bedeutung für die NA-Supersensitivität nach neonataler Sympathektomie haben. Die Ergebnisse der Myographie-Versuche in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Nifedipin einen größeren Anstieg des $\log\text{EC}_{50}$ der NA-induzierten Gefäßkontraktion bei Gefäßen sympathektomierter Tiere im Vergleich zu schein sympathektomierten Kontrollen verursacht. In Gegenwart des L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockers führte die zusätzliche Inhibition der ROCK mittels Y-27632 zu keiner weiteren Rechtsverschiebung der NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die maximal entwickelte relative Gefäßwandspannung (E_{\max}) verringerte sich bei Gefäßen sympathektomierter Tiere und schein sympathektomierter Kontrollen in ähnlichem Ausmaß. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges unter anderem durch

L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-abhängige Signalwege beeinflusst wird. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass eine verstärkte ROCK-Aktivität nicht für die erhöhte NA-Sensitivität bei Nierenarterien sympathektomierter Ratten verantwortlich ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit korrespondieren mit den Befunden aus Studien anderer Arbeitsgruppen. Für glatte Gefäßmuskelzellen mesenterialer Gefäße und der A. saphena von Ratten konnten nach neonataler Sympathektomie keine Veränderungen hinsichtlich des mRNA-Gehalts der ROCK oder des ROCK-Proteingehalts nachgewiesen werden [197;199].

Die gesteigerte ROCK-Abhängigkeit der NA-induzierten Gefäßkontraktion renaler Widerstandsgefäße neonatal sympathektomierter Ratten ist möglicherweise durch Veränderungen in Funktionen von ROCK-abhängigen Bestandteilen des kontraktiven Apparats bedingt. Der RhoA/ROCK-Signalweg ist nicht nur ein wichtiger Regulator der glattmuskulären Zellkontraktion, sondern auch an der Migration, Proliferation und Differenzierung glatter Muskelzellen beteiligt [256]. Es sind zahlreiche ROCK-Substrate bekannt, welche Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts und der Intermediärfilamente nehmen [256]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die ROCK durch Phosphorylierung des MLCP-inhibierenden Protein CPI-17 direkten Einfluss auf die Kontraktibilität der glatten Gefäßmuskelzellen nimmt [134]. Die Phosphorylierung von CPI-17 durch die ROCK induziert eine Konformationsänderung, wodurch sich die inhibitorische Wirkung von CPI-17 auf die Aktivität der MLCP erhöht [137]. Der relative Beitrag der ROCK-abhängigen Phosphorylierung von CPI-17 für die Kontraktion der glatten Muskulatur ist bisher nicht im Detail untersucht. Ein weiteres ROCK-Substrat, welches für die Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung des kontraktiven Apparats eine Rolle spielt, ist die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK). Studien von Puzdrova et al. zeigten bei sympathektomierten Tieren im Vergleich zum normotensiven Kontrollen eine verstärkte Expression der MAPK in den glatten Muskelzellen arterieller Gefäße [197]. Eine weitere Erklärung für die gesteigerte ROCK-Abhängigkeit der NA-induzierten Gefäßkontraktion renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter Tiere wäre eine konstitutive Aktivität der ROCK. Kontraktionsstimuli, welche zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen könnten demnach einen variablen Anteil der konstitutiven ROCK-Aktivität rekrutieren, um den arteriellen Gefäßtonus aufrechtzuerhalten [8]. Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass die verstärkte Sensitivität gegenüber ROCK-Inhibition bei Nierenarterien sympathektomierter Ratten möglicherweise die Konsequenz einer verstärkten Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-abhängigen Signalwegen ist, wodurch die konstitutiv aktive ROCK verstärkt in die Aufrechterhaltung der Gefäßmuskelkontraktion involviert wird.

Die Aktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle erfordert eine starke Depolarisation der glattmuskulären Zellmembran [109]. Daher muss in Betracht gezogen werden, dass die verstärkte Reaktion isolierter Nierenarterien sympathektomierter Ratten auf S(-)-BayK8644-

induzierte L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivierung die Folge eines depolarisierten Ruhemembranpotential darstellt. In der vorliegenden Studie zeigten isolierte Nierenarterien sympathektomierter Ratten im Vergleich zu isolierten Gefäßen schein sympathektomierter Tieren eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der K^+ -induzierten Gefäßkontraktion. Diese Befunde deuten darauf hin, dass das Ruhemembranpotential glatter Gefäßmuskelzellen renaler Widerstandsarterien sympathektomierter Ratten in Bezug auf das Membranpotential glatte Muskelzellen schein sympathektomierter Tieren in Richtung Depolarisation verschoben ist. Durch direkte Messungen des Membranpotentials mittels Mikroelektroden konnte gezeigt werden, dass das Ruhemembranpotential glatter Gefäßmuskelzellen sympathektomierter Ratten im Vergleich zu schein sympathektomierten Kontrolltieren statistisch signifikant in Richtung Depolarisation verschoben ist. Die Datenlage über die Auswirkungen der sympathischen Denervierung auf das Ruhemembranpotential glatter Muskelzellen ist spärlich. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten haben Messungen am Vas deferens von Meerschweinchen gezeigt, dass es nach sympathischer Denervierung zur Depolarisation des Ruhemembranpotentials glatter Gefäßmuskelzellen kommt [74]. Für afferente Arteriolen der renalen Mikrozirkulation konnte in Studien ein Ruhemembranpotential im Bereich von -55 bis -40 mV und in efferenten Arteriolen ein Potential von -40 mV registriert werden. Im Vergleich dazu sind die in dieser Studie an Widerstandsarterien der dritten Aufzweigungsgeneration gemessenen Membranpotentiale im Bereich um -60 mV. Dies deutet darauf hin, dass das Ruhemembranpotential glatter Gefäßmuskelzellen innerhalb des renalen Gefäßbetts von den Widerstandsarterien (proximal) hin zu den Arteriolen (distal) abnimmt.

Die durch transmembranäre Ionenströme ausgelösten Änderungen des Membranpotentials werden über Gap Junctions (interzellulärer Ionenkanal), welche die Zellmembranen zweier benachbarter Zellen durchqueren, von einer Muskelzelle auf die folgenden Muskelzellen übertragen. Gap Junctions bestehen aus zwei Halbkanälen (Connexone), welche wiederum aus sechs Connexinen bestehen. Je nach Aufbau der Connexone kann die Permeabilität des Kanals für bestimmte Ionen und somit dessen elektrische Leitfähigkeit variieren [140]. In Studien konnte gezeigt werden, dass es bei Ratten nach sympathischer Denervierung zu einer Zunahme der Expression von Connexin43 und zu einer gesteigerten NA-induzierten Gefäßkontraktilität kommt [229]. Änderungen der Leitfähigkeit zwischen glatten Muskelzellen durch Modifikation der Zusammensetzung von Gap Junctions könnten demnach eine weitere Ursache für die gesteigerte NA-Sensitivität nach sympathischer Denervierung darstellen.

Um zu testen, ob die erhöhte Kontraktionsbereitschaft renaler Widerstandsarterien sympathektomierter Ratten nach S(-)-BayK8644-induzierter L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivierung auf ein depolarisiertes Membranpotential glatter Gefäßmuskelzellen zurückzuführen ist, wurde die S(-)-BayK8644-induzierte Gefäßkontraktion in Anwesenheit depolarisierender und hyper-

polarisierender Reize untersucht. Die Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration auf 20 mmol/l depolarisiert das Membranpotential glatter Muskelzellen, ohne dabei einen signifikanten Einfluss auf den Tonus arterieller Gefäße zu nehmen [180]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in Gegenwart dieses depolarisierenden Stimulus eine deutlich erhöhte S(-)-BayK8644 induzierte Kontraktion isolierter Nierengefäße sympathektomierter Tiere. Als Reiz zur Hyperpolarisation der Zellmembran haben wir Levchromakalim eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen Aktivator von ATP-sensitiven K^+ -Kanälen (K_{ATP} -Kanal) [145]. In Anwesenheit des Hyperpolarisationsstimulus kam es zum vollständigen Verschwinden der S(-)-BayK8644 induzierten Kontraktion bei Nierenarterien sympathektomierter Ratten. Isolierte Nierenarterien scheinsympathektomierter Ratten zeigten in Organbadlösung mit physiologischer extrazellulärer K^+ -Konzentration von 4,7 mmol/l kaum eine Reaktion auf die pharmakologische Aktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle mittels S(-)-BayK8644. Nach Applikation des depolarisierenden Stimulus entwickelten auch Gefäße scheinsympathektomierter Tiere eine klare Gefäßkontraktion als Reaktion auf die pharmakologische Aktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein depolarisiertes Membranpotential in glatten Gefäßmuskelzellen sympathektomierter Tiere die pharmakologische Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen erleichtert. Dies scheint wiederum die Grundlage für die verstärkte Sensitivität renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter Ratten gegenüber der NA-induzierten Gefäßkontraktion zu sein.

Zur Höhe des Membranpotentials glatter Gefäßmuskelzellen trägt die Aktivität multipler Membrantransportsysteme und Ionenkanäle bei. Einen entscheidenden Beitrag leisten Ionenkanäle aus der Familie der Kaliumkanäle. Die Zellmembran glatter Muskelzellen ist in Ruhe vor allem für K^+ -Ionen permeabel. Die genaue Funktion und Bedeutung der einzelnen K^+ -Kanäle ist derzeit nicht genau geklärt und variiert möglicherweise zwischen den verschiedenen Segmenten des renalen Gefäßsystems [233]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass K_{ATP} -Kanäle zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials glatter Gefäßmuskelzellen renaler Widerstandsarterien beitragen. ATP-abhängige K^+ -Kanäle zeigen eine tetradimere Stöchiometrie. Die Pore der K_{ATP} -Kanäle wird aus vier einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanal-Untereinheiten ($K_{ir6.1}$ oder $K_{ir6.2}$) gebildet. Jede dieser porenbildenden α -Untereinheiten ist an einen als regulatorische β -Untereinheit wirkenden Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1 oder SUR2) gekoppelt, sodass sich ein aus vier Dimeren bestehender Komplex bildet [7]. Bei glatten Gefäßmuskelzellen renaler Widerstandsarterien der Ratte konnte die Expression der α -Untereinheit $K_{ir6.1}$ und der β -Untereinheit SUR2B nachgewiesen werden [152]. In In-vivo-Studien zeigte sich eine Zunahme des renalen Blutflusses nach pharmakologischer Aktivierung der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle [234]. Des Weiteren ist bekannt, dass ATP-abhängige K^+ -Kanäle in α_2 - und β -Rezeptor-abhängige Signaltransduktionsmechanismen integriert sind [58;84;238]. In nachfolgenden Arbeiten gilt es

zu überprüfen, ob das SNS langfristig an der Aufrechterhaltung von hyperpolarisierenden Membranströmen in den Zellen glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt ist.

Aus den erhobenen Daten schließen wir, dass renale Widerstandsarterien nach neonataler Sympathektomie eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber NA-induzierter Gefäßkontraktion entwickeln. Durch Entfernung der sympathischen Innervation kommt es zur Depolarisation des Ruhemembranpotentials glatter Gefäßmuskelzellen. Das depolarisierte Membranpotential erleichtert die Aktivierung spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen nach NA-induzierter Gefäßkontraktion (möglicherweise über rezeptorgesteuerte Ionenkanäle, welche die Membran weiter depolarisieren) und die L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivierung mittels S(-)-BayK8644. Der anschließende Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert die MLCK und führt zu einer Steigerung der Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins mit konsekutiver Erhöhung des arteriellen Gefäßtonus. Gleichzeitig wird durch die Aktivität der ROCK ein basaler Phosphorylierungsstatus der regulatorischen leichten Kette des Myosins aufrechterhalten. Die Hemmung der ROCK führt demzufolge zu einer reduzierten basalen Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten. In Abhängigkeit der aktivierten Signalmechanismen kommt es zu einer Blockade bzw. Reduzierung der Gefäßantwort nach S(-)-BayK8644 vermittelter L-Typ- Ca^{2+} -Kanalöffnung bzw. der NA-induzierten Gefäßkontraktion. In zukünftigen Studien muss die Frage geklärt werden, ob die regionale Denervierung renaler Gefäße zu ähnlichen Veränderungen in der Funktion renaler Widerstandsarterien führt wie die systemische Sympathektomie.

5 Literaturverzeichnis

- [1] 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. J Hypertens. 21 (6), S. 1011-1053 (2003).
- [2] Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: durability of blood pressure reduction out to 24 months. Hypertension. 57 (5), S. 911-917 (2011).
- [3] **Aalkjaer C, Heagerty AM, Petersen KK, et al.** Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation--contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. Circ Res. 61 (2), S. 181-186 (1987).
- [4] **Abdulla MH, Sattar MA, Salman IM, et al.** Effect of acute unilateral renal denervation on renal hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. Auton Autacoid Pharmacol. 28 (2-3), S. 87-94 (2008).
- [5] **Abernethy DR and Soldatov NM.** Structure-functional diversity of human L-type Ca²⁺ channel: perspectives for new pharmacological targets. J Pharmacol Exp Ther. 300 (3), S. 724-728 (2002).
- [6] **Adelstein RS and Klee CB.** Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. J Biol Chem. 256 (14), S. 7501-7509 (1981).
- [7] **Aguilar-Bryan L and Bryan J.** Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. Endocr Rev. 20 (2), S. 101-135 (1999).
- [8] **Alvarez SM, Miner AS, Browne BM, et al.** Failure of Bay K 8644 to induce RhoA kinase-dependent calcium sensitization in rabbit blood vessels. Br J Pharmacol. 160 (6), S. 1326-1337 (2010).
- [9] **Amberg GC and Navedo MF.** Calcium dynamics in vascular smooth muscle. Microcirculation. 20 (4), S. 281-289 (2013).
- [10] **Anderson EA, Sinkey CA, Lawton WJ, et al.** Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. Hypertension. 14 (2), S. 177-183 (1989).
- [11] **Andreasen D, Friis UG, Uhrenholt TR, et al.** Coexpression of voltage-dependent calcium channels Cav1.2, 2.1a, and 2.1b in vascular myocytes. Hypertension. 47 (4), S. 735-741 (2006).
- [12] **Aprigliano O and Hermsmeyer K.** Trophic influence of the sympathetic nervous system on the rat portal vein. Circ Res. 41 (2), S. 198-206 (1977).
- [13] **Arikkath J and Campbell KP.** Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. Curr Opin Neurobiol. 13 (3), S. 298-307 (2003).
- [14] **Atanur SS, Birol I, Guryev V, et al.** The genome sequence of the spontaneously hypertensive rat: Analysis and functional significance. Genome Res. 20 (6), S. 791-803 (2010).
- [15] **Bannister JP, Thomas-Gatewood CM, Neeb ZP, et al.** Ca(V)_{1.2} channel N-terminal splice variants modulate functional surface expression in resistance size artery smooth muscle cells. J Biol Chem. 286 (17), S. 15058-15066 (2011).
- [16] **Barrett CJ, Ramchandra R, Guild SJ, et al.** What sets the long-term level of renal sympathetic nerve activity: a role for angiotensin II and baroreflexes? Circ Res. 92 (12), S. 1330-1336 (2003).

- [17] **Bennett T, Gardiner SM and Kemp PA.** An assessment of the effectiveness of neonatal treatment with guanethidine as a means of producing sympathectomy. British journal of pharmacology. 76 (4), S. 557-564 (1982).
- [18] **Berridge MJ and Irvine RF.** Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature. 312 (5992), S. 315-321 (1984).
- [19] **Bevan J, A. and Osher JV.** A Direct Method for Recording Tension Changes in the Wall of Small Blood Vessels in vitro. Agents and Actions. 2 (5), S. 257-260 (1972).
- [20] **Bhat A, Kuang YM, Gan GC, et al.** An update on renal artery denervation and its clinical impact on hypertensive disease. Biomed Res Int. 2015 S. 607079 (2015).
- [21] **Blue DR, Jr., Vimont RL and Clarke DE.** Evidence for a noradrenergic innervation to alpha 1A-adrenoceptors in rat kidney. Br J Pharmacol. 107 (2), S. 414-417 (1992).
- [22] **Blythe TH, Hall RC and Hughes IE.** An assessment of the cardiovascular sympathectomy induced by guanethidine. J Pharm Pharmacol. 28 (1), S. 53-57 (1976).
- [23] **Bohr DF, Goulet PL and Taquini AC, Jr.** Direct tension recording from smooth muscle of resistance vessels from various organs. Angiology. 12 (10), S. 478-485 (1961).
- [24] **Bolivar JJ.** Essential hypertension: an approach to its etiology and neurogenic pathophysiology. Int J Hypertens. 2013 S. 547809 (2013).
- [25] **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72 S. 248-254 (1976).
- [26] **Bulbring E.** Membrane potentials of smooth muscle fibres of the taenia coli of the guinea-pig. J Physiol. 125 (2), S. 302-315 (1954).
- [27] **Bulbring E and Hooton IN.** Membrane potentials of smooth muscle fibres in the rabbit's sphincter pupillae. J Physiol. 125 (2), S. 292-301 (1954).
- [28] **Burnette WN.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 112 (2), S. 195-203 (1981).
- [29] **Bylund DB, Regan JW, Faber JE, et al.** Vascular alpha-adrenoceptors: from the gene to the human. Can J Physiol Pharmacol. 73 (5), S. 533-543 (1995).
- [30] **Cabassi A, Vinci S, Cantoni AM, et al.** Sympathetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats. Hypertension. 39 (2 Pt 2), S. 656-661 (2002).
- [31] **Cahalan MD.** STIMulating store-operated Ca(2+) entry. Nat Cell Biol. 11 (6), S. 669-677 (2009).
- [32] **Campese VM and Kogosov E.** Renal afferent denervation prevents hypertension in rats with chronic renal failure. Hypertension. 25 (4 Pt 2), S. 878-882 (1995).
- [33] **Caplea A, Seachrist D, Daneshvar H, et al.** Noradrenergic content and turnover rate in kidney and heart shows gender and strain differences. J Appl Physiol (1985). 92 (2), S. 567-571 (2002).
- [34] **Carmines PK, Fowler BC and Bell PD.** Segmentally distinct effects of depolarization on intracellular [Ca²⁺] in renal arterioles. Am J Physiol. 265 (5 Pt 2), S. F677-685 (1993).
- [35] **Carthy ER.** Autonomic dysfunction in essential hypertension: A systematic review. Ann Med Surg (Lond). 3 (1), S. 2-7 (2014).

- [36] **Casey DB, Badejo AM, Dhaliwal JS, et al.** Analysis of responses to the Rho-kinase inhibitor Y-27632 in the pulmonary and systemic vascular bed of the rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 299 (1), S. H184-192 (2010).
- [37] **Casteels R and Droogmans G.** Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. J Physiol. 317 S. 263-279 (1981).
- [38] **Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, et al.** International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacol Rev. 57 (4), S. 411-425 (2005).
- [39] **Cauvin C, Lukeman S, Cameron J, et al.** Differences in norepinephrine activation and diltiazem inhibition of calcium channels in isolated rabbit aorta and mesenteric resistance vessels. Circ Res. 56 (6), S. 822-828 (1985).
- [40] **Cavarape A, Endlich N, Assaloni R, et al.** Rho-kinase inhibition blunts renal vasoconstriction induced by distinct signaling pathways in vivo. J Am Soc Nephrol. 14 (1), S. 37-45 (2003).
- [41] **Chen H, Bischoff A, Schafers RF, et al.** Vasoconstriction of rat renal interlobar arteries by noradrenaline and neuropeptide Y. J Auton Pharmacol. 17 (3), S. 137-146 (1997).
- [42] **Chen S.** Essential hypertension: perspectives and future directions. J Hypertens. 30 (1), S. 42-45 (2012).
- [43] **Cheng X, Pachuau J, Blaskova E, et al.** Alternative splicing of Cav1.2 channel exons in smooth muscle cells of resistance-size arteries generates currents with unique electrophysiological properties. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 297 (2), S. H680-688 (2009).
- [44] **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al.** Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 42 (6), S. 1206-1252 (2003).
- [45] **Cole KS and Curtis HJ.** MEMBRANE POTENTIAL OF THE SQUID GIANT AXON DURING CURRENT FLOW. J Gen Physiol. 24 (4), S. 551-563 (1941).
- [46] **Colucci WS, Gimbrone MA, Jr. and Alexander RW.** Regulation of the postsynaptic alpha-adrenergic receptor in rat mesenteric artery. Effects of chemical sympathectomy and epinephrine treatment. Circ Res. 48 (1), S. 104-111 (1981).
- [47] **Cooper CL and Malik KU.** Prostaglandin synthesis and renal vasoconstriction elicited by adrenergic stimuli are linked to activation of alpha-1 adrenergic receptors in the isolated rat kidney. J Pharmacol Exp Ther. 233 (1), S. 24-31 (1985).
- [48] **Coote JH and Sato Y.** Reflex regulation of sympathetic activity in the spontaneously hypertensive rat. Circ Res. 40 (6), S. 571-577 (1977).
- [49] **Dabrowska R, Aromatorio D, Sherry JM, et al.** Composition of the myosin light chain kinase from chicken gizzard. Biochem Biophys Res Commun. 78 (4), S. 1263-1272 (1977).
- [50] **Daemen MJ and De Mey JG.** Regional heterogeneity of arterial structural changes. Hypertension. 25 (4 Pt 1), S. 464-473 (1995).
- [51] **Deng LY and Schiffrin EL.** Effects of endothelin-1 and vasopressin on resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. Am J Hypertens. 5 (11), S. 817-822 (1992).
- [52] **Dhaliwal JS, Casey DB, Greco AJ, et al.** Rho kinase and Ca²⁺ entry mediate increased pulmonary and systemic vascular resistance in L-NAME-treated rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 293 (5), S. L1306-1313 (2007).
- [53] **DiBona GF.** Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens. 11 (2), S. 197-200 (2002).

- [54] **DiBona GF and Kopp UC.** Neural control of renal function. Physiol Rev. 77 (1), S. 75-197 (1997).
- [55] **DiBona GF and Sawin LL.** Role of renal alpha 2-adrenergic receptors in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 9 (1), S. 41-48 (1987).
- [56] **Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD, et al.** Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. Curr Opin Nephrol Hypertens. 6 (1), S. 88-105 (1997).
- [57] **Edwards RM.** Segmental effects of norepinephrine and angiotensin II on isolated renal microvessels. Am J Physiol. 244 (5), S. F526-534 (1983).
- [58] **EI-Mas MM, EI-Gowilly SM, Gohar EY, et al.** Pharmacological characterization of cellular mechanisms of the renal vasodilatory effect of nicotine in rats. Eur J Pharmacol. 588 (2-3), S. 294-300 (2008).
- [59] **Esler M, Jennings G, Korner P, et al.** Measurement of total and organ-specific norepinephrine kinetics in humans. Am J Physiol. 247 (1 Pt 1), S. E21-28 (1984).
- [60] **Esler M, Jennings G, Korner P, et al.** Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover. Hypertension. 11 (1), S. 3-20 (1988).
- [61] **Esler M, Jennings G, Lambert G, et al.** Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. Physiol Rev. 70 (4), S. 963-985 (1990).
- [62] **Esler M, Lambert G and Jennings G.** Regional norepinephrine turnover in human hypertension. Clin Exp Hypertens A. 11 Suppl 1 S. 75-89 (1989).
- [63] **Esler MD, Krum H, Sobotka PA, et al.** Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. Lancet. 376 (9756), S. 1903-1909 (2010).
- [64] **Exton JH.** Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. Am J Physiol. 248 (6 Pt 1), S. E633-647 (1985).
- [65] **Facemire CS and Arendshorst WJ.** Calmodulin mediates norepinephrine-induced receptor-operated calcium entry in preglomerular resistance arteries. Am J Physiol Renal Physiol. 289 (1), S. F127-136 (2005).
- [66] **Falloon BJ and Heagerty AM.** In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. Hypertension. 24 (1), S. 16-23 (1994).
- [67] **Feihl F, Liaudet L, Levy BI, et al.** Hypertension and microvascular remodelling. Cardiovasc Res. 78 (2), S. 274-285 (2008).
- [68] **Fellner SK and Arendshorst WJ.** Capacitative calcium entry in smooth muscle cells from preglomerular vessels. Am J Physiol. 277 (4 Pt 2), S. F533-542 (1999).
- [69] **Fellner SK and Arendshorst WJ.** Ryanodine receptor and capacitative Ca²⁺ entry in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells. Kidney Int. 58 (4), S. 1686-1694 (2000).
- [70] **Fellner SK and Arendshorst WJ.** Store-operated Ca²⁺ entry is exaggerated in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells of SHR. Kidney Int. 61 (6), S. 2132-2141 (2002).
- [71] **Fellner SK and Arendshorst WJ.** Voltage-gated Ca²⁺ entry and ryanodine receptor Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in preglomerular arterioles. Am J Physiol Renal Physiol. 292 (5), S. F1568-1572 (2007).

- [72] **Fernandez-Tenorio M, Porras-Gonzalez C, Castellano A, et al.** Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated kinase by L-type Ca²⁺ channels: new mechanism for depolarization-evoked mammalian arterial contraction. *Circ Res.* 108 (11), S. 1348-1357 (2011).
- [73] **Fisher SA.** Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiol Genomics.* 42a (3), S. 169-187 (2010).
- [74] **Fleming WW and Westfall DP.** Altered resting membrane potential in the supersensitive vas deferens of the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther.* 192 (2), S. 381-389 (1975).
- [75] **Floras JS and Hara K.** Sympathoneural and haemodynamic characteristics of young subjects with mild essential hypertension. *J Hypertens.* 11 (6), S. 647-655 (1993).
- [76] **Foss JD, Wainford RD, Engeland WC, et al.** A novel method of selective ablation of afferent renal nerves by periaxonal application of capsaicin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 308 (2), S. R112-122 (2015).
- [77] **Francisco LL, Sawin LL and DiBona GF.** Renal sympathetic nerve activity and the exaggerated natriuresis of the spontaneous hypertensive rat. *Hypertension.* 3 (1), S. 134-138 (1981).
- [78] **Frearson N, Focant BW and Perry SV.** Phosphorylation of a light chain component of myosin from smooth muscle. *FEBS Lett.* 63 (1), S. 27-32 (1976).
- [79] **Galvani L and Green RM.** De viribus electricitatis in motu musculari commentarius. S. (1953).
- [80] **Garovic VD and Textor SC.** Renovascular hypertension and ischemic nephropathy. *Circulation.* 112 (9), S. 1362-1374 (2005).
- [81] **Ghisdal P, Vandenberg G and Morel N.** Rho-dependent kinase is involved in agonist-activated calcium entry in rat arteries. *J Physiol.* 551 (Pt 3), S. 855-867 (2003).
- [82] **Goldstein DS.** Plasma catecholamines and essential hypertension. An analytical review. *Hypertension.* 5 (1), S. 86-99 (1983).
- [83] **Goodfriend TL and Calhoun DA.** Resistant hypertension, obesity, sleep apnea, and aldosterone: theory and therapy. *Hypertension.* 43 (3), S. 518-524 (2004).
- [84] **Goto K, Fujii K, Abe I, et al.** Sympathetic control of arterial membrane potential by ATP-sensitive K(+) channels. *Hypertension.* 35 (1 Pt 2), S. 379-384 (2000).
- [85] **Grassi G.** Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *J Hypertens.* 16 (12 Pt 2), S. 1979-1987 (1998).
- [86] **Grassi G.** Assessment of sympathetic cardiovascular drive in human hypertension: achievements and perspectives. *Hypertension.* 54 (4), S. 690-697 (2009).
- [87] **Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, et al.** Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension.* 31 (1), S. 68-72 (1998).
- [88] **Grassi G, Mark A and Esler M.** The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. *Circ Res.* 116 (6), S. 976-990 (2015).
- [89] **Greenwood JP, Stoker JB and Mary DA.** Single-unit sympathetic discharge : quantitative assessment in human hypertensive disease. *Circulation.* 100 (12), S. 1305-1310 (1999).
- [90] **Grisk O, Kloting I, Exner J, et al.** Long-term arterial pressure in spontaneously hypertensive rats is set by the kidney. *J Hypertens.* 20 (1), S. 131-138 (2002).
- [91] **Grisk O, Lothar U, Gabriels G, et al.** Influence of neonatal sympathectomy on proximal renal resistance artery function in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch.* 449 (4), S. 364-371 (2005).

- [92] **Grisk O and Rettig R.** Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. Cardiovasc Res. 61 (2), S. 238-246 (2004).
- [93] **Grisk O, Rose H-J, Lorenz G, et al.** Sympathetic-renal interaction in chronic arterial pressure control. American Journal Physiology. 283 (2), S. 441-450 (2002).
- [94] **Grisk O, Schluter T, Reimer N, et al.** The Rho kinase inhibitor SAR407899 potently inhibits endothelin-1-induced constriction of renal resistance arteries. J Hypertens. 30 (5), S. 980-989 (2012).
- [95] **Grobecker H, Roizen MF and Kopin IJ.** Effect of tyramine and guanethidine on dopamine-beta-hydroxylase activity and norepinephrine concentrations in vesicular fraction of the heart and plasma of rats. Life Sci. 20 (6), S. 1009-1015 (1977).
- [96] **Guyton AC.** Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. Am J Physiol. 259 (5 Pt 2), S. R865-877 (1990).
- [97] **Han C, Li J and Minneman KP.** Subtypes of alpha 1-adrenoceptors in rat blood vessels. Eur J Pharmacol. 190 (1-2), S. 97-104 (1990).
- [98] **Hansen PB, Jensen BL, Andreasen D, et al.** Vascular smooth muscle cells express the alpha(1A) subunit of a P-/Q-type voltage-dependent Ca(2+)Channel, and It is functionally important in renal afferent arterioles. Circ Res. 87 (10), S. 896-902 (2000).
- [99] **Hansen PB, Jensen BL, Andreasen D, et al.** Differential expression of T- and L-type voltage-dependent calcium channels in renal resistance vessels. Circ Res. 89 (7), S. 630-638 (2001).
- [100] **Hayashi K, Nagahama T, Oka K, et al.** Disparate effects of calcium antagonists on renal microcirculation. Hypertens Res. 19 (1), S. 31-36 (1996).
- [101] **Hayashi K, Wakino S, Homma K, et al.** Pathophysiological significance of T-type Ca²⁺ channels: role of T-type Ca²⁺ channels in renal microcirculation. J Pharmacol Sci. 99 (3), S. 221-227 (2005).
- [102] **Hayashi K, Wakino S, Sugano N, et al.** Ca²⁺ channel subtypes and pharmacology in the kidney. Circ Res. 100 (3), S. 342-353 (2007).
- [103] **Head RJ.** Hypernoradrenergic innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. Blood Vessels. 26 (1), S. 1-20 (1989).
- [104] **Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, et al.** Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. Hypertension. 21 (4), S. 391-397 (1993).
- [105] **Heagerty AM and Izzard AS.** Small-artery changes in hypertension. J Hypertens. 13 (12 Pt 2), S. 1560-1565 (1995).
- [106] **Heumann P, Koenen A, Zavaritskaya O, et al.** Sympathetic denervation facilitates L-type Ca²⁺ channel activation in renal but not in mesenteric resistance arteries. J Hypertens. 34 (4), S. 692-703 (2016).
- [107] **Hill CE, Phillips JK and Sandow SL.** Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. Med Res Rev. 21 (1), S. 1-60 (2001).
- [108] **Hodgkin AL and Huxley AF.** Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. Nature. 144 S. (1939).
- [109] **Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, et al.** L-type Ca_v1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. Physiol Rev. 94 (1), S. 303-326 (2014).

- [110] **Hogestatt ED, Johansson O, Andersson KE, et al.** Influence of renal denervation on vascular responsiveness of isolated rat intrarenal arteries. Acta Physiol Scand. 132 (1), S. 59-66 (1988).
- [111] **Holda JR, Klishin A, Sedova M, et al.** Capacitative Calcium Entry. News Physiol Sci. 13 S. 157-163 (1998).
- [112] **Homma K, Hayashi K, Yamaguchi S, et al.** Renal microcirculation and calcium channel subtypes. Curr Hypertens Rev. 9 (3), S. 182-186 (2013).
- [113] **Honda M, Hayashi K, Matsuda H, et al.** Divergent renal vasodilator action of L- and T-type calcium antagonists in vivo. J Hypertens. 19 (11), S. 2031-2037 (2001).
- [114] **Hye Khan MA, Sattar MA, Abdullah NA, et al.** Influence of combined hypertension and renal failure on functional alpha(1)-adrenoceptor subtypes in the rat kidney. Br J Pharmacol. 153 (6), S. 1232-1241 (2008).
- [115] **Iliescu R, Lohmeier TE, Tudorancea I, et al.** Renal denervation for the treatment of resistant hypertension: review and clinical perspective. Am J Physiol Renal Physiol. 309 (7), S. F583-594 (2015).
- [116] **Inscho EW, Cook AK, Webb RC, et al.** Rho-kinase inhibition reduces pressure-mediated autoregulatory adjustments in afferent arteriolar diameter. Am J Physiol Renal Physiol. 296 (3), S. F590-597 (2009).
- [117] **Inscho EW, Imig JD and Cook AK.** Afferent and efferent arteriolar vasoconstriction to angiotensin II and norepinephrine involves release of Ca²⁺ from intracellular stores. Hypertension. 29 (1 Pt 2), S. 222-227 (1997).
- [118] **Ivy JR and Bailey MA.** Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. J Physiol. 592 (18), S. 3955-3967 (2014).
- [119] **Jensen-Holm J and Juul P.** Changes of the rat superior cervical ganglion induced by guanethidine (histology and cholinesterase histochemistry). Br J Pharmacol. 34 (1), S. 211p-212p (1968).
- [120] **Jensen-Holm J and Juul P.** Ultrastructural changes in the rat superior cervical ganglion following prolonged guanethidine administration. Acta pharmacologica et toxicologica. 30 (3), S. 308-320 (1971).
- [121] **Johns EJ.** The neural regulation of the kidney in hypertension and renal failure. Exp Physiol. 99 (2), S. 289-294 (2014).
- [122] **Johns EJ, Kopp UC and DiBona GF.** Neural control of renal function. Compr Physiol. 1 (2), S. 731-767 (2011).
- [123] **Johnson EM, Jr., Cantor E and Douglas JR, Jr.** Biochemical and functional evaluation of the sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 193 (2), S. 503-512 (1975).
- [124] **Johnson EM, Jr., O'Brien F and Werbitt R.** Modification and characterization of the permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats. European journal of pharmacology. 37 (1), S. 45-54 (1976).
- [125] **Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, et al.** Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. J Hypertens. 26 (3), S. 381-391 (2008).
- [126] **Joyner MJ, Barnes JN, Hart EC, et al.** Neural control of the circulation: how sex and age differences interact in humans. Compr Physiol. 5 (1), S. 193-215 (2015).

- [127] **Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, et al.** Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. Circ Res. 38 (6 Suppl 2), S. 21-29 (1976).
- [128] **Jurkat-Rott K and Lehmann-Horn F.** The impact of splice isoforms on voltage-gated calcium channel alpha1 subunits. J Physiol. 554 (Pt 3), S. 609-619 (2004).
- [129] **Kacem K and Sercombe R.** Differing influence of sympathectomy on smooth muscle cells and fibroblasts in cerebral and peripheral muscular arteries. Auton Neurosci. 124 (1-2), S. 38-48 (2006).
- [130] **Karaki H, Ozaki H, Hori M, et al.** Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. Pharmacol Rev. 49 (2), S. 157-230 (1997).
- [131] **Kast R, Schirok H, Figueroa-Perez S, et al.** Cardiovascular effects of a novel potent and highly selective azaindole-based inhibitor of Rho-kinase. Br J Pharmacol. 152 (7), S. 1070-1080 (2007).
- [132] **Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, et al.** Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet. 365 (9455), S. 217-223 (2005).
- [133] **Khawaja Z and Wilcox CS.** Role of the kidneys in resistant hypertension. Int J Hypertens. 2011 S. 143471 (2011).
- [134] **Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, et al.** Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. J Biol Chem. 275 (14), S. 9897-9900 (2000).
- [135] **Kneale BJ, Chowienczyk PJ, Brett SE, et al.** Gender differences in sensitivity to adrenergic agonists of forearm resistance vasculature. J Am Coll Cardiol. 36 (4), S. 1233-1238 (2000).
- [136] **Kornfeld M, Gutierrez AM, Gonzalez E, et al.** Cell calcium concentration in glomerular afferent and efferent arterioles under the action of noradrenaline and angiotensin II. Acta Physiol Scand. 151 (1), S. 99-105 (1994).
- [137] **Koyama M, Ito M, Feng J, et al.** Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. FEBS Lett. 475 (3), S. 197-200 (2000).
- [138] **Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, et al.** Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. Lancet. 373 (9671), S. 1275-1281 (2009).
- [139] **Kunes J and Zicha J.** The interaction of genetic and environmental factors in the etiology of hypertension. Physiol Res. 58 Suppl 2 S. S33-41 (2009).
- [140] **Kurtz A.** Renal connexins and blood pressure. Biochim Biophys Acta. 1818 (8), S. 1903-1908 (2012).
- [141] **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 (5259), S. 680-685 (1970).
- [142] **Lambert E, Dawood T, Schlaich M, et al.** Single-unit sympathetic discharge pattern in pathological conditions associated with elevated cardiovascular risk. Clin Exp Pharmacol Physiol. 35 (4), S. 503-507 (2008).
- [143] **Lamont C and Wier WG.** Different roles of ryanodine receptors and inositol (1,4,5)-trisphosphate receptors in adrenergically stimulated contractions of small arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 287 (2), S. H617-625 (2004).
- [144] **Laurent S and Boutouyrie P.** The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. Circ Res. 116 (6), S. 1007-1021 (2015).

- [145] **Lawson K.** Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. Kidney Int. 57 (3), S. 838-845 (2000).
- [146] **Lee RM, Berecek KH, Tsoporis J, et al.** Prevention of hypertension and vascular changes by captopril treatment. Hypertension. 17 (2), S. 141-150 (1991).
- [147] **Lee RM, Borkowski KR, Leenen FH, et al.** Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats. Circ Res. 69 (3), S. 714-721 (1991).
- [148] **Lee RM, Triggle CR, Cheung DW, et al.** Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 10 (3), S. 328-338 (1987).
- [149] **Leech CJ and Faber JE.** Different alpha-adrenoceptor subtypes mediate constriction of arterioles and venules. Am J Physiol. 270 (2 Pt 2), S. H710-722 (1996).
- [150] **Leuenberger UA, Brubaker D, Quraishi SA, et al.** Effects of intermittent hypoxia on sympathetic activity and blood pressure in humans. Auton Neurosci. 121 (1-2), S. 87-93 (2005).
- [151] **Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, et al.** Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Lancet. 360 (9349), S. 1903-1913 (2002).
- [152] **Li L, Wu J and Jiang C.** Differential expression of Kir6.1 and SUR2B mRNAs in the vasculature of various tissues in rats. J Membr Biol. 196 (1), S. 61-69 (2003).
- [153] **Li Z and Duckles SP.** Influence of gender on vascular reactivity in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 268 (3), S. 1426-1431 (1994).
- [154] **Lifton RP.** Genetic determinants of human hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A. 92 (19), S. 8545-8551 (1995).
- [155] **Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al.** A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 380 (9859), S. 2224-2260 (2012).
- [156] **Ling G and Gerard RW.** The influence of stretch on the membrane potential of the striated muscle fiber. J Cell Physiol. 34 (3), S. 397-405 (1949).
- [157] **Ling G and Gerard RW.** The membrane potential and metabolism of muscle fibers. J Cell Physiol. 34 (3), S. 413-438 (1949).
- [158] **Liu QH, Zheng YM and Wang YX.** Two distinct signaling pathways for regulation of spontaneous local Ca²⁺ release by phospholipase C in airway smooth muscle cells. Pflugers Arch. 453 (4), S. 531-541 (2007).
- [159] **Logan AG, Perlikowski SM, Mente A, et al.** High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. J Hypertens. 19 (12), S. 2271-2277 (2001).
- [160] **Lohn M, Plettenburg O, Ivashchenko Y, et al.** Pharmacological characterization of SAR407899, a novel rho-kinase inhibitor. Hypertension. 54 (3), S. 676-683 (2009).
- [161] **Loirand G, Guerin P and Pacaud P.** Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. Circ Res. 98 (3), S. 322-334 (2006).
- [162] **Loria AS, Brinson KN, Fox BM, et al.** Sex-specific alterations in NOS regulation of vascular function in aorta and mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats compared to Wistar Kyoto rats. Physiol Rep. 2 (8), S. (2014).

- [163] **Loutzenhiser K and Loutzenhiser R.** Angiotensin II-induced Ca(2+) influx in renal afferent and efferent arterioles: differing roles of voltage-gated and store-operated Ca(2+) entry. Circ Res. 87 (7), S. 551-557 (2000).
- [164] **Low AM, Kotecha N, Neild TO, et al.** Relative contributions of extracellular Ca²⁺ and Ca²⁺ stores to smooth muscle contraction in arteries and arterioles of rat, guinea-pig, dog and rabbit. Clin Exp Pharmacol Physiol. 23 (4), S. 310-316 (1996).
- [165] **Lundin S, Ricksten SE and Thoren P.** Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. Acta Physiol Scand. 120 (2), S. 265-272 (1984).
- [166] **Mahfoud F, Cremers B, Janker J, et al.** Renal hemodynamics and renal function after catheter-based renal sympathetic denervation in patients with resistant hypertension. Hypertension. 60 (2), S. 419-424 (2012).
- [167] **Malpas SC.** Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. Physiol Rev. 90 (2), S. 513-557 (2010).
- [168] **Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al.** 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). J Hypertens. 31 (7), S. 1281-1357 (2013).
- [169] **Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, et al.** Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. Hypertension. 34 (4 Pt 2), S. 724-728 (1999).
- [170] **Mark AL.** The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. J Hypertens Suppl. 14 (5), S. S159-165 (1996).
- [171] **Martinez-Lemus LA.** Persistent agonist-induced vasoconstriction is not required for angiotensin II to mediate inward remodeling of isolated arterioles with myogenic tone. J Vasc Res. 45 (3), S. 211-221 (2008).
- [172] **Martinez-Lemus LA, Zhao G, Galinanes EL, et al.** Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 300 (6), S. H2005-2015 (2011).
- [173] **Martinsen A, Dessy C and Morel N.** Regulation of calcium channels in smooth muscle: new insights into the role of myosin light chain kinase. Channels (Austin). 8 (5), S. 402-413 (2014).
- [174] **Martinsen A, Yerna X, Rath G, et al.** Different effect of Rho kinase inhibition on calcium signaling in rat isolated large and small arteries. J Vasc Res. 49 (6), S. 522-533 (2012).
- [175] **Mitchell JR and Oates JA.** Guanethidine and related agents. I. Mechanism of the selective blockade of adrenergic neurons and its antagonism by drugs. J Pharmacol Exp Ther. 172 (1), S. 100-107 (1970).
- [176] **Moosmang S, Schulla V, Welling A, et al.** Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. Embo j. 22 (22), S. 6027-6034 (2003).
- [177] **Mulvany MJ.** Abnormalities of the resistance vasculature in hypertension: correction by vasodilator therapy. Pharmacol Rep. 57 Suppl S. 144-150 (2005).
- [178] **Mulvany MJ.** Small artery remodelling in hypertension. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 110 (1), S. 49-55 (2012).
- [179] **Mulvany MJ and Halpern W.** Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circ Res. 41 (1), S. 19-26 (1977).

- [180] **Mulvany MJ, Nilsson H and Flatman JA.** Role of membrane potential in the response of rat small mesenteric arteries to exogenous noradrenaline stimulation. J Physiol. 332 S. 363-373 (1982).
- [181] **Mulvany MJ and Warshaw DM.** The active tension-length curve of vascular smooth muscle related to its cellular components. The Journal of general physiology. 74 (1), S. 85-104 (1979).
- [182] **Norrelund H, Christensen KL, Samani NJ, et al.** Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. Hypertension. 24 (3), S. 301-308 (1994).
- [183] **O'Neill SK and Bolger GT.** Enantiomer selectivity and the development of tolerance to the behavioral effects of the calcium channel activator BAY K 8644. Brain Res Bull. 21 (6), S. 865-872 (1988).
- [184] **Ohishi M, Takagi T, Ito N, et al.** Renal-protective effect of T- and L-type calcium channel blockers in hypertensive patients: an Amlodipine-to-Benidipine Changeover (ABC) study. Hypertens Res. 30 (9), S. 797-806 (2007).
- [185] **Omura M, Saito J, Yamaguchi K, et al.** Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan. Hypertens Res. 27 (3), S. 193-202 (2004).
- [186] **Palatini P and Julius S.** The role of cardiac autonomic function in hypertension and cardiovascular disease. Curr Hypertens Rep. 11 (3), S. 199-205 (2009).
- [187] **Parati G and Esler M.** The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. Eur Heart J. 33 (9), S. 1058-1066 (2012).
- [188] **Paulis L, Liskova S, Pinterova M, et al.** Nifedipine-sensitive noradrenergic vasoconstriction is enhanced in spontaneously hypertensive rats: the influence of chronic captopril treatment. Acta Physiol (Oxf). 191 (4), S. 255-266 (2007).
- [189] **Pedrosa RP, Drager LF, Gonzaga CC, et al.** Obstructive sleep apnea: the most common secondary cause of hypertension associated with resistant hypertension. Hypertension. 58 (5), S. 811-817 (2011).
- [190] **Pesic A, Madden JA, Pesic M, et al.** High blood pressure upregulates arterial L-type Ca²⁺ channels: is membrane depolarization the signal? Circ Res. 94 (10), S. e97-104 (2004).
- [191] **Pettinger WA, Sanchez A, Saavedra J, et al.** Altered renal alpha 2-adrenergic receptor regulation in genetically hypertensive rats. Hypertension. 4 (3 Pt 2), S. 188-192 (1982).
- [192] **Piasecki MT, Soltis EE, Piasecki MM, et al.** Alpha-adrenoceptors and vascular regulation: molecular, pharmacologic and clinical correlates. Pharmacol Ther. 72 (3), S. 215-241 (1996).
- [193] **Picklo MJ.** Methods of sympathetic degeneration and alteration. J Auton Nerv Syst. 62 (3), S. 111-125 (1997).
- [194] **Poulsen CB, Al-Mashhadi RH, Cribbs LL, et al.** T-type voltage-gated calcium channels regulate the tone of mouse efferent arterioles. Kidney Int. 79 (4), S. 443-451 (2011).
- [195] **Pratt PF, Bonnet S, Ludwig LM, et al.** Upregulation of L-type Ca²⁺ channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. Hypertension. 40 (2), S. 214-219 (2002).
- [196] **Puetz S, Lubomirov LT and Pfitzer G.** Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. Physiology (Bethesda). 24 S. 342-356 (2009).
- [197] **Puzdrova VA, Kudryashova TV, Gaynullina DK, et al.** Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca²⁺ sensitivity during early post-natal development in rats. Acta Physiol (Oxf). 212 (2), S. 128-141 (2014).

- [198] **Ralevic V and Burnstock G.** Effects of short- and long-term sympathectomy on vasoconstrictor responses of the rat mesenteric arterial bed. Br J Pharmacol. 119 (7), S. 1347-1354 (1996).
- [199] **Reho JJ, Zheng X, Benjamin JE, et al.** Neural programming of mesenteric and renal arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 307 (4), S. H563-573 (2014).
- [200] **Renart J, Reiser J and Stark GR.** Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 76 (7), S. 3116-3120 (1979).
- [201] **Rettig R and Grisk O.** The kidney as a determinant of genetic hypertension: evidence from renal transplantation studies. Hypertension. 46 (3), S. 463-468 (2005).
- [202] **Rettig R, Schmitt B, Pelzl B, et al.** The kidney and primary hypertension: contributions from renal transplantation studies in animals and humans. J Hypertens. 11 (9), S. 883-891 (1993).
- [203] **Rimoldi SF, Scherrer U and Messerli FH.** Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? Eur Heart J. 35 (19), S. 1245-1254 (2014).
- [204] **Risler NR, Cruzado MC and Miatello RM.** Vascular remodeling in experimental hypertension. ScientificWorldJournal. 5 S. 959-971 (2005).
- [205] **Rizzoni D and Agabiti-Rosei E.** Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. Intern Emerg Med. 7 (3), S. 205-212 (2012).
- [206] **Rizzoni D, Perlini S, Mircoli L, et al.** Enhanced vascular reactivity in the sympathectomized rat: studies in vivo and in small isolated resistance arteries. J Hypertens. 18 (8), S. 1041-1049 (2000).
- [207] **Rizzoni D, Porteri E, Guefi D, et al.** Cellular hypertrophy in subcutaneous small arteries of patients with renovascular hypertension. Hypertension. 35 (4), S. 931-935 (2000).
- [208] **Robertson D and Smith CR.** Guanethidin. Manual of Clinical Pharmacology. S. 79-81 (1981).
- [209] **Roos MH, van Rodijnen WF, van Lambalgen AA, et al.** Renal microvascular constriction to membrane depolarization and other stimuli: pivotal role for rho-kinase. Pflugers Arch. 452 (4), S. 471-477 (2006).
- [210] **Saiz J, Lara B, Torres A, et al.** Hypertensinogenic factors and renal alpha-adrenoceptors in young SHR and WKY rats. Life Sci. 41 (20), S. 2261-2268 (1987).
- [211] **Sakurada S, Okamoto H, Takuwa N, et al.** Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 281 (2), S. C571-578 (2001).
- [212] **Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, et al.** Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. Circ Res. 93 (6), S. 548-556 (2003).
- [213] **Salman IM, Sarma Kandukuri D, Harrison JL, et al.** Direct conscious telemetry recordings demonstrate increased renal sympathetic nerve activity in rats with chronic kidney disease. Front Physiol. 6 S. 218 (2015).
- [214] **Salomonsson M and Arendshorst WJ.** Calcium recruitment in renal vasculature: NE effects on blood flow and cytosolic calcium concentration. Am J Physiol. 276 (5 Pt 2), S. F700-710 (1999).
- [215] **Salomonsson M and Arendshorst WJ.** Norepinephrine-induced calcium signaling pathways in afferent arterioles of genetically hypertensive rats. Am J Physiol Renal Physiol. 281 (2), S. F264-272 (2001).

- [216] **Salomonsson M, Brannstrom K and Arendshorst WJ.** alpha(1)-adrenoceptor subtypes in rat renal resistance vessels: in vivo and in vitro studies. Am J Physiol Renal Physiol. 278 (1), S. F138-147 (2000).
- [217] **Salomonsson M, Oker M, Kim S, et al.** Alpha1-adrenoceptor subtypes on rat afferent arterioles assessed by radioligand binding and RT-PCR. Am J Physiol Renal Physiol. 281 (1), S. F172-178 (2001).
- [218] **Salomonsson M, Sorensen CM, Arendshorst WJ, et al.** Calcium handling in afferent arterioles. Acta Physiol Scand. 181 (4), S. 421-429 (2004).
- [219] **Sanchez-Alvarez C, Gonzalez-Velez M, Stilp E, et al.** Renal sympathetic denervation in the treatment of resistant hypertension. Yale J Biol Med. 87 (4), S. 527-535 (2014).
- [220] **Savard S, Amar L, Plouin PF, et al.** Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. Hypertension. 62 (2), S. 331-336 (2013).
- [221] **Schlaich MP, Bart B, Hering D, et al.** Feasibility of catheter-based renal nerve ablation and effects on sympathetic nerve activity and blood pressure in patients with end-stage renal disease. Int J Cardiol. 168 (3), S. 2214-2220 (2013).
- [222] **Schlaich MP, Lambert E, Kaye DM, et al.** Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. Hypertension. 43 (2), S. 169-175 (2004).
- [223] **Schluter T, Grimm R, Steinbach A, et al.** Neonatal sympathectomy reduces NADPH oxidase activity and vascular resistance in spontaneously hypertensive rat kidneys. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 291 (2), S. R391-399 (2006).
- [224] **Lang F.** Niere. In: Physiologie des Menschen. Hrsg. Schmidt RF, Lang F and Heckmann M. 31. überarbeitete und aktualisierte Auflage. Heidelberg: Springer-Medizin-Verlag. (2010); S. 629-663
- [225] **Schmitz JM, Graham RM, Sagalowsky A, et al.** Renal alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors: biochemical and pharmacological correlations. J Pharmacol Exp Ther. 219 (2), S. 400-406 (1981).
- [226] **Schütze K.** Mechanismen der Noradrenalin-Supersensitivität nach neonataler Sympathektomie bei proximalen Widerstandsarterien von Wistar-Ratten. S. (2014).
- [227] **Seko T, Ito M, Kureishi Y, et al.** Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. Circ Res. 92 (4), S. 411-418 (2003).
- [228] **Shokoji T, Nishiyama A, Fujisawa Y, et al.** Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 41 (2), S. 266-273 (2003).
- [229] **Slovut DP, Mehta SH, Dorrance AM, et al.** Increased vascular sensitivity and connexin43 expression after sympathetic denervation. Cardiovasc Res. 62 (2), S. 388-396 (2004).
- [230] **Smithwick RH, Bush RD, Kinsey D, et al.** Hypertension and associated cardiovascular disease; comparison of male and female mortality rates and their influence on selection of therapy. J Am Med Assoc. 160 (12), S. 1023-1026 (1956).
- [231] **Smithwick RH and Thompson JE.** Splanchnicectomy for essential hypertension; results in 1,266 cases. J Am Med Assoc. 152 (16), S. 1501-1504 (1953).
- [232] **Sonkusare S, Palade PT, Marsh JD, et al.** Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. Vascul Pharmacol. 44 (3), S. 131-142 (2006).

- [233] **Sorensen CM, Braunstein TH, Holstein-Rathlou NH, et al.** Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics. *Am J Physiol Renal Physiol.* 302 (5), S. F505-518 (2012).
- [234] **Sorensen CM, Giese I, Braunstein TH, et al.** Closure of multiple types of K⁺ channels is necessary to induce changes in renal vascular resistance in vivo in rats. *Pflugers Arch.* 462 (5), S. 655-667 (2011).
- [235] **Stassen FR, Maas RG, Schiffers PM, et al.** A positive and reversible relationship between adrenergic nerves and alpha-1A adrenoceptors in rat arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 284 (1), S. 399-405 (1998).
- [236] **Suzuki F, Morishima S, Tanaka T, et al.** Snapin, a new regulator of receptor signaling, augments alpha1A-adrenoceptor-operated calcium influx through TRPC6. *J Biol Chem.* 282 (40), S. 29563-29573 (2007).
- [237] **Takenaka T, Suzuki H, Okada H, et al.** Biophysical signals underlying myogenic responses in rat interlobular artery. *Hypertension.* 32 (6), S. 1060-1065 (1998).
- [238] **Tan JH, Al Abed A and Brock JA.** Inhibition of KATP channels in the rat tail artery by neurally released noradrenaline acting on postjunctional alpha2-adrenoceptors. *J Physiol.* 581 (Pt 2), S. 757-765 (2007).
- [239] **Tang ZZ, Hong X, Wang J, et al.** Signature combinatorial splicing profiles of rat cardiac- and smooth-muscle Cav1.2 channels with distinct biophysical properties. *Cell Calcium.* 41 (5), S. 417-428 (2007).
- [240] **Thai TL, Fellner SK and Arendshorst WJ.** ADP-ribosyl cyclase and ryanodine receptor activity contribute to basal renal vasomotor tone and agonist-induced renal vasoconstriction in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol.* 293 (4), S. F1107-1114 (2007).
- [241] **Thoren P and Ricksten SE.** Recordings of renal and splanchnic sympathetic nervous activity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond).* 57 Suppl 5 S. 197s-199s (1979).
- [242] **Toprak A, Wang H, Chen W, et al.** Prehypertension and black-white contrasts in cardiovascular risk in young adults: Bogalusa Heart Study. *J Hypertens.* 27 (2), S. 243-250 (2009).
- [243] **Touw KB, Haywood JR, Shaffer RA, et al.** Contribution of the sympathetic nervous system to vascular resistance in conscious young and adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2 (4), S. 408-418 (1980).
- [244] **Towbin H, Staehelin T and Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76 (9), S. 4350-4354 (1979).
- [245] **Tsioufis C, Kordalis A, Flessas D, et al.** Pathophysiology of resistant hypertension: the role of sympathetic nervous system. *Int J Hypertens.* 2011 S. 642416 (2011).
- [246] **Tsunoda M, Takezawa K, Santa T, et al.** New approach for measurement of sympathetic nervous abnormality in conscious, spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol.* 83 (1), S. 39-45 (2000).
- [247] **Uchino K, Frohlich ED, Nishikimi T, et al.** Spontaneously hypertensive rats demonstrate increased renal vascular alpha 1-adrenergic receptor responsiveness. *Am J Physiol.* 260 (5 Pt 2), S. R889-893 (1991).
- [248] **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al.** Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 389 (6654), S. 990-994 (1997).

- [249] **Urban D, Ewen S, Ukena C, et al.** Treating resistant hypertension: role of renal denervation. Integr Blood Press Control. 6 S. 119-128 (2013).
- [250] **Vinet R and Vargas FF.** L- and T-type voltage-gated Ca²⁺ currents in adrenal medulla endothelial cells. Am J Physiol. 276 (4 Pt 2), S. H1313-1322 (1999).
- [251] **Vlachakis ND, Alexander N and Maronde RF.** Increased plasma normetanephrine in spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Hypertens. 2 (2), S. 309-319 (1980).
- [252] **Wallin BG, Delius W and Hagbarth KE.** Comparison of sympathetic nerve activity in normotensive and hypertensive subjects. Circ Res. 33 (1), S. 9-21 (1973).
- [253] **Webb RC.** Smooth muscle contraction and relaxation. Adv Physiol Educ. 27 (1-4), S. 201-206 (2003).
- [254] **Wehrwein EA, Orer HS and Barman SM.** Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. Compr Physiol. 6 (3), S. 1239-1278 (2016).
- [255] **Welsby PJ, Wang H, Wolfe JT, et al.** A mechanism for the direct regulation of T-type calcium channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. J Neurosci. 23 (31), S. 10116-10121 (2003).
- [256] **Wirth A.** Rho kinase and hypertension. Biochim Biophys Acta. 1802 (12), S. 1276-1284 (2010).
- [257] **Wolff DW, Gesek FA and Strandhoy JW.** In vivo assessment of rat renal alpha adrenoceptors. J Pharmacol Exp Ther. 241 (2), S. 472-476 (1987).
- [258] **Woodcock EA, Morris MJ, McLeod JK, et al.** Specific increase in renal alpha 1-adrenergic receptors following unilateral renal denervation. J Recept Res. 5 (2-3), S. 133-146 (1985).
- [259] **Xia J and Duling BR.** Patterns of excitation-contraction coupling in arterioles: dependence on time and concentration. Am J Physiol. 274 (1 Pt 2), S. H323-330 (1998).
- [260] **Yip KP and Marsh DJ.** [Ca²⁺]_i in rat afferent arteriole during constriction measured with confocal fluorescence microscopy. Am J Physiol. 271 (5 Pt 2), S. F1004-1011 (1996).
- [261] **Young JB, Rosa RM and Landsberg L.** Dissociation of sympathetic nervous system and adrenal medullary responses. Am J Physiol. 247 (1 Pt 1), S. E35-40 (1984).
- [262] **Young WF, Jr.** Adrenal causes of hypertension: pheochromocytoma and primary aldosteronism. Rev Endocr Metab Disord. 8 (4), S. 309-320 (2007).

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Noradrenalin(NA)-induzierte Kontraktionsmechanismen.	10
Abb. 2-1 Protein-Größenstandard für die SDS-Page.	25
Abb. 2-2 Darstellung der Gefäßpräparation.	30
Abb. 2-3 Dual-Wire-Myograph-System 410A.	32
Abb. 2-4 Kammerabdeckung für das Dual-Wire-Myograph-System 410A.	33
Abb. 2-5 Kalibrierungswaage für das Dual-Wire-Myograph-System 410A.	34
Abb. 2-6 Schematische Darstellung der Gefäßfixierung zwischen den Klemmbacken.	36
Abb. 2-7 Originalaufzeichnung von Vordehnung und Vitalitätsprüfung eines isolierten Interlobargefäßes.	38
Abb. 2-8 Schematischer Aufbau eines Western-Blot Sandwiches nach Towbin.	49
Abb. 2-9 Versuchsaufbau zur Registrierung von Membranpotential und Gefäßwandspannung.	53
Abb. 3-1 Kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve renaler Widerstandsgefäße der dritten Aufzweigungsgeneration.	59
Abb. 3-2 Kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven vor und nach Nifedipin-vermittelter L-Typ-Ca ²⁺ -Kanalblockade von renalen Widerstandsgefäßen.	62
Abb. 3-3 Kumulative NA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven von mit Nifedipin vorbehandelten renalen Widerstandsgefäßen.	64
Abb. 3-4 Kumulative S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurven für renale Widerstandsgefäße von sympathektomierten Tieren (SYX) und Kontrollen (CTR).	66
Abb. 3-5 Kontraktionsantwort renaler Widerstandsgefäße nach Stimulation mit NA in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Ca ²⁺	67
Abb. 3-6 Gefäßkontraktion renaler Widerstandsgefäße nach RyR-Stimulation mit 20mM Coffein.	68
Abb. 3-7 K ⁺ -induzierte Gefäßkontraktion der renalen Widerstandsgefäße von sympathektomierten Tieren (SYX) und Kontrollen (CTR).	70
Abb. 3-8 K ⁺ -Konzentrations-Wirkungs-Kurve renaler Widerstandsgefäße scheinsympathektomierter Kontrolltiere in An- und Abwesenheit von Y-27632.	71
Abb. 3-9 K ⁺ -Konzentrations-Wirkungs-Kurve renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter Tiere in An- und Abwesenheit von Y-27632.	72
Abb. 3-10 Kumulative S(-)-BayK8644-Konzentrations-Wirkungs-Kurve für renale Widerstandsgefäße unter Kontrollbedingungen (KRB-Lösung), Membrandepolarisation (20 mmol/l K ⁺) und Membranhyperpolarisation (Lev, 1 µmol/l).	74
Abb. 3-11 Relativer Proteingehalt der α1-Untereinheit (Typ C) des L-Typ-Ca ²⁺ -Kanals (Cav1.2).	75
Abb. 3-12 Membranpotential der glatten Gefäßmuskelzellen von isolierten renalen Widerstandsgefäßen neonatal sympathektomierter und scheinsympathektomierter Tiere.	76

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1	Übersicht der spannungsgesteuerten Calciumkanäle - Nomenklatur und Vorkommen (modifiziert nach: „Hayashi et al. ,CircRes 100; 2007“)	13
Tab. 2-1	Laborgeräte und Hilfsmittel	20
Tab. 2-2	Verbrauchsmaterial	21
Tab. 2-3	Chemikalien und Substanzen	22
Tab. 2-4	Lösungen und Puffer	23
Tab. 2-5	primäre Antikörper	25
Tab. 2-6	sekundäre Antikörper	25
Tab. 2-7	Alter und Gewicht der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Nierenentnahme	26
Tab. 2-8	Übersicht Protokoll 1	39
Tab. 2-9	Übersicht Protokoll 2	40
Tab. 2-10	Übersicht Protokoll 3	41
Tab. 2-11	Übersicht Protokoll 4	41
Tab. 2-12	Übersicht der Zusammensetzung der Organbadlösung für die verschiedenen K ⁺ -Konzentrationen (c in mmol/l)	42
Tab. 2-13	Übersicht Protokoll 5	42
Tab. 2-14	Übersicht Protokoll 6	43
Tab. 2-15	Übersicht über Pharmaka und Lösungsmittel	44
Tab. 2-16	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	47
Tab. 2-17	Verdünnung der Antikörper zur Immundetektion der porenbildenden α 1C-Untereinheit (Ca _v 1.2)	50
Tab. 2-18	Verdünnung der Antikörper zur Immundetektion von β -Aktin	51
Tab. 2-19	Übersicht Programmparameter für Programm 6 und 7	54
Tab. 3-1	LogEC ₅₀ und E _{max} der NA-induzierten Vasokontraktion, Ruhewandspannung, K ⁺ -induzierte Wandspannung und Gefäßdurchmesser renaler Widerstandsgefäße	60
Tab. 3-2	Effekt von Nifedipin auf logEC ₅₀ und E _{max} der NA-induzierten Vasokontraktion	61
Tab. 3-3	Effekt von Y-27632 auf logEC ₅₀ und E _{max} der NA-induzierten Vasokontraktion unter simultaner L-Typ-Ca ²⁺ -Kanalblockade	63
Tab. 3-4	LogEC ₅₀ und E _{max} der S(-)-BayK8644-induzierten Vasokontraktion	66
Tab. 3-5	E _{max} der NA-induzierten Vasokontraktion in Ca ²⁺ -haltiger und Ca ²⁺ -freier Organbadlösung	67
Tab. 3-6	LogEC ₅₀ und E _{max} der Depolarisations-induzierten Vasokontraktion ohne / mit ROCK-Inhibition	69
Tab. 3-7	LogEC ₅₀ und E _{max} der S(-)-Bayk8644-induzierten Vasokontraktion vor und nach Membrandepolarisation	73

8 Publikationen

Heumann P, Koenen A, Zavaritskaya O, Schütze K, Ramm A, Schlüter T, Steinbach A, Rettig R, Schubert R and Grisk O. Sympathetic denervation facilitates L-type Ca²⁺-channel activation in renal but not in mesenteric resistance arteries. Journal of Hypertension. 34 (4), S. 692-703 (2016)

Abstracts:

Heumann P, Koenen A, Rettig R, Grisk O. K^{ATP} channels contribute to VSMC membrane potential in distal renal interlobar arteries. Acta Physiologica. 216, S. 151 (2016)

Grisk O, Heumann P, Koenen A, Steinbach A, Zavaritskaya O, Schubert R, Rettig R. Sympathetic Denervation Facilitates L-Type Ca²⁺ Channel Activation in Renal Resistance Arteries by Depolarization of Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs). The FASEB Journal. 29, S. 53 (2015)

Heumann P, Koenen A, Steinbach A, Rettig R, Grisk O. Sympathetic denervation facilitates L-type Ca²⁺ channel activation in renal resistance arteries. Acta Physiologica. 210, S. 53 (2014)

9 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, 22.10.2018

Philipp Heumann

10 Danksagung

Ich bedanke mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. O. Grisk für die Überlassung des Themas. Weiterhin danke ich für die hervorragende Betreuung, die Unterstützung bei allen auftretenden Fragen während der Arbeit im Labor und für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Rainer Rettig danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am von Ihm geleiteten Institut für Physiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität anzufertigen. Weiterhin danke ich für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. O. Grisk und Herrn Prof. Dr. med. Rainer Rettig danke ich insbesondere für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit an diversen wissenschaftlichen Veranstaltungen teilnehmen zu können und meine Forschungsergebnisse präsentieren zu dürfen.

Besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Physiologie in Karlsburg für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die vielen wertvollen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft, welche wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön richtet sich an Doreen Nierath für die tägliche Unterstützung im Labor und die Hilfe bei der Haltung der Versuchstiere. Weiterhin danke ich Frau Svea Gerber für die wertvollen Ratschläge und Anregungen zur Durchführung der Western-Blots.

Bei der Stipendienvergabekommission des Gerhard Domagk-Nachwuchsförderprogramms der Universitätsmedizin Greifswald bedanke ich mich für die Aufnahme in das Stipendienprogramm und die ideelle sowie finanzielle Unterstützung während meines Promotionsjahres.

Bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Schubert (Leiter des Instituts für Kardiovaskuläre Physiologie am Centrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim) und Frau Dr. Olga Zavaritskaya bedanke ich mich für die freundliche Betreuung und die Unterstützung bei der Laborarbeit während meines Forschungsaufenthaltes in Mannheim am Centrum für Biomedizin und Medizintechnik (CBTM).

Für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern.

11 Anhang

11.1 Publikation

Heumann P, Koenen A, Zavaritskaya O, Schütze K, Ramm A, Schlüter T, Steinbach A, Rettig R, Schubert R and Grisk O. Sympathetic denervation facilitates L-type Ca²⁺-channel activation in renal but not in mesenteric resistance arteries. Journal of Hypertension. 34 (4), S. 692-703 (2016)

Original Article

Sympathetic denervation facilitates L-type Ca^{2+} channel activation in renal but not in mesenteric resistance arteries

Philipp Heumann^a, Anna Koenen^a, Olga Zavaritskaya^b, Konrad Schütze^a, André Ramm^a,
Torsten Schlüter^a, Antje Steinbach^a, Rainer Rettig^a, Rudolf Schubert^b, and Olaf Grisk^a

Objectives: Sympathetic denervation enhances agonist-induced vasoconstriction. This effect may involve altered function of signaling mechanisms such as Rho kinase (Rock) and L-type Ca^{2+} channels downstream from vasoconstrictor receptors. We tested if enhanced Rock and L-type calcium channel activation contribute to exaggerated norepinephrine-induced vasoconstrictions in renal and mesenteric resistance arteries after sympathectomy.

Methods: Rats underwent neonatal sympathectomy or sham sympathectomy. Resistance arteries were investigated by small vessel myography. Vascular Rock and L-type Ca^{2+} channel expression as well as Rock activation were investigated by quantitative real-time PCR and Western blot. Vascular smooth muscle cell (VSMC) membrane potential was recorded with microelectrodes.

Results: Sympathetic denervation enhanced norepinephrine sensitivity in renal and mesenteric arteries. Both, Rock inhibition or L-type Ca^{2+} inhibition shifted the norepinephrine concentration–response curve to the right. This effect was more pronounced in renal than in mesenteric arteries from sympathectomized vs. sham-sympathectomized animals. The L-type Ca^{2+} channel activator S(-)-BayK8644 elicited strong vasoconstrictions only in renal arteries from sympathectomized rats. Rock activity and L-type Ca^{2+} channel α -subunit expression were similar in renal arteries from sympathectomized and sham-sympathectomized animals. VSMC membrane potential was -57.5 ± 2.0 and -64.3 ± 0.3 mV ($P < 0.01$), respectively, in renal arteries from sympathectomized and from sham-sympathectomized rats. Depolarization enhanced and K_{ATP} channel activation abolished S(-)-BayK8644-induced contractions in renal arteries from sympathectomized rats.

Conclusion: Sympathetic denervation enhances L-type Ca^{2+} channel-dependent signaling in renal but not in mesenteric arteries. This effect may be partly explained by the decreased VSMC membrane potential in denervated renal arteries.

Keywords: blood vessels, Ca^{2+} channels, kidney, rats, Rho kinase, sympathetic nervous system

Abbreviations: EC_{50} , half maximal effective concentration; E_{max} , maximal effect; ERM, ezrin, radixin, moesin; IC, internal circumference; MYPT1, myosin phosphatase target subunit 1; PSS, physiological salt solution; Rock, Rho kinase; VSMC, vascular smooth muscle cells

INTRODUCTION

Developmental, mechanic, endocrine, paracrine, and neuronal factors cause functional heterogeneity of blood vessels that are in part because of variations in vascular smooth muscle cell (VSMC) phenotype [1–5]. Arteries possess afferent and efferent innervation [3,6,7]. Their efferent innervation is mainly of sympathetic and to a lesser and more variable extent of parasympathetic origin [3]. Physiologically, sympathetic innervation mediates rapid changes in vascular tone and has long-term effects on arterial structure and function including the maintenance of a mature contractile VSMC phenotype [1,5,6,8–12]. Chronic sympathetic overactivity induces arterial remodeling and increased peripheral vascular resistance that contribute to the pathogenesis of arterial hypertension [6,8,9]. Prompted by the introduction of renal denervation techniques for the treatment of arterial hypertension, there is renewed interest in basic and clinical research on the effects of perivascular denervation on vascular and renal function [10,13,14]. The effects of sympathetic denervation may differ between vascular beds and sexes because of regional [1,12] and sex-related [5,15–18] differences in the neural control of the circulation.

Journal of Hypertension 2016, 34:692–703

^aInstitute of Physiology, University of Greifswald, Greifswald and ^bCenter for Biomedicine and Medical Technology Mannheim (CBTM), Research Division Cardiovascular Physiology, Medical Faculty, Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

Correspondence to Professor Olaf Grisk, Institute of Physiology, University of Greifswald, Greifswalder Str. 11c, 17495 Karlsburg, Germany. Tel: +49 3834 8619300; fax: +49 3834 8619310; e-mail: grisko@uni-greifswald.de

Received 3 September 2015 Revised 27 November 2015 Accepted 15 December 2015

J Hypertens 34:692–703 Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/HJH.0000000000000856

Dissection of the physiological long-term effects of sympathetic and sensory denervation on resistance artery function may help to better understand the chronic effects of perivascular renal denervation in the treatment of hypertension [19].

Local and generalized sympathetic denervation frequently enhances the vascular sensitivity to the contractile effects of adrenoceptor agonists as well as nonadrenoceptor agonists [11,20–22]. We have previously shown that constrictions to pharmacological L-type Ca^{2+} channel activation were enhanced in renal resistance arteries of spontaneously hypertensive rats that underwent neonatal sympathectomy [22]. Recently, it has been shown that sympathetic denervation increased myofilament Ca^{2+} sensitivity in rat saphenous arteries [11]. Together, these findings [11,20–22] suggest that alterations in signaling mechanisms on which different signal transduction pathways converge contribute to increased sensitivity of sympathetically denervated arteries to vasoconstrictors in addition to the well established adrenoceptor upregulation and sensitization [23,24]. RhoA/Rho kinase (Rock) and L-type Ca^{2+} channel-dependent signaling are central for the generation of vascular tone and activated by many vasoconstrictor stimuli [25–27]. The Rock pathway sensitizes VSMC myofilaments to Ca^{2+} [25] and may thereby enhance the responsiveness to L-type Ca^{2+} channel activation in sympathetically denervated arteries. Alternatively, the lack of sympathetic innervation could facilitate Ca^{2+} entry into VSMCs via L-type Ca^{2+} channels because of effects on L-type Ca^{2+} channel expression or on VSMC membrane potential [26,28].

Currently, the roles of altered Rock-dependent Ca^{2+} sensitization and Ca^{2+} entry via L-type Ca^{2+} channels for the sympathetic denervation-induced increase in norepinephrine sensitivity in small arteries are unknown. To perform selective sympathetic denervation, we chose a model of chemical sympathectomy, which leads to selective removal of sympathetic nerve fibers onto adulthood [29] combined with removal of the adrenal medulla. We tested the hypotheses that enhanced Rock and L-type Ca^{2+} channel-dependent signaling contribute to the increased sensitivity to the contractile effects of norepinephrine in small resistance arteries from sympathectomized animals. Because neural control of arterial function may differ between vascular beds and sexes, we further tested if the contribution of these mechanisms to enhanced norepinephrine-induced vasoconstriction following sympathectomy differs between renal and mesenteric resistance arteries as well as between males and females.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals

All studies involving experimental animals were performed in accordance with the German Animal Protection Act. Permission to perform the animal experiments reported herein was obtained from the authorities for animal welfare of the federal states Mecklenburg-Vorpommern and Baden-Württemberg, Germany. The animals were kept at constant humidity (60%) and temperature (22°C) with lights on from 0600 to 1800 h. Food (ssniff R-Z extrudate containing 0.26%

Na^+ , Ssniff Spezial Diäten, Soest, Germany) and fresh tap water were available *ad libitum*. The experiments were performed in male and female Wistar rats, which were first generation offspring of breeding pairs obtained from Charles River, Sulzfeld, Germany. Litters were randomized to neonatal sympathectomy or sham treatment [30]. Briefly, neonatal sympathectomy was performed by daily intraperitoneal injections of guanethidine monosulfate (O. Tro-pitzsch e.K., Marktredwitz, Germany) at 50 $\mu\text{g/g}$ body weight beginning on postnatal day 5 and ending on postnatal day 28. Animals were weaned on postnatal day 28 followed by surgical removal of the adrenal medulla on postnatal day 29. This procedure leads to a permanent, extensive sympathectomy with renal and mesenteric norepinephrine concentrations reduced by 90% in young adult rats [29–32], indicating similar efficiency of this procedure in both tissues. Control animals received daily intraperitoneal isotonic saline injections and underwent sham surgery on postnatal day 29 without removal of the adrenal medulla. Organs for in-vitro studies (kidneys, mesentery, and aorta) were harvested from 9–12-week-old animals under deep anesthesia and immediately placed in ice cold physiological salt solution (PSS) (composition see below) for further dissection.

Arterial pressure recordings

To test for the effect of neonatal sympathectomy on arterial pressure prior to the vessel myograph studies, a subset of sham-sympathectomized and sympathectomized animals was implanted with catheters into the femoral artery, which were exteriorized at the back of the neck under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg) at the age of 9–10 weeks. Thereafter, the animals were placed into individual cages with food and water available *ad libitum*. One day later, the animals were transferred to the lab and the catheter was connected to a pressure transducer (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). After a 1-h adaptation period, arterial pressure and heart rate were recorded for 30 min with the animals resting or moving within their home cages as described previously [30].

Small vessel myography

Segments from third-order renal artery branches (distal interlobar artery) and from distal third-order mesenteric artery branches were dissected and mounted in a model 410A small vessel wire myograph (Danish Myotechnology, Aarhus, Denmark). Passive length-tension curves were obtained by stretching the vessels in 20- μm steps each lasting 2 min after which the corresponding wall tension was recorded. The relationship between internal circumference (IC) and corresponding wall tension (T) was fitted to a two-parametric exponential curve $T = T_0 \exp [b(\text{IC} - \text{IC}_0)/\text{IC}_0]$ where T_0 (mN/mm) is the wall tension at the transmural pressure corresponding to the animals' mean arterial pressure and b is a measure of vascular stiffness. Experiments were performed with the vessels stretched to an IC corresponding to 90% of the IC at the respective mean arterial pressure values (IC_0) based on the arterial pressure data obtained at the beginning of the study. Cumulative concentration–response curves or responses to

Heumann *et al.*

single concentrations of substances were recorded depending on the design of the experiments. Time control experiments confirmed that repeated recordings of cumulative norepinephrine concentration–response curve were not associated with a significant decline of vasoconstrictor responses in renal or mesenteric arteries from sympathectomized or control animals ($n = 4/\text{group}$, data not shown). Pretreatment of vessels with the Rock inhibitor Y27632 and the L-type Ca^{2+} channel blocker nifedipine lasted 15 min. Viability of isolated vessels prior to experimentation was assessed by stimulating vasoconstriction with 125 mmol/l K^+ . If not stated otherwise, drug-induced increases in wall tension were normalized to maximum wall tension in response to 125 mmol/l K^+ and given as relative tension.

Solutions and drugs for myography

All myograph experiments were performed in bicarbonate-buffered PSS containing 4.7 mmol/l K^+ and 2.5 mmol/l Ca^{2+} at 37°C aerated with carbogen [22]. When higher K^+ concentrations were required, the respective amounts of Na^+ were substituted by K^+ . When experiments required the absence of Ca^{2+} from the bathing solution for a certain period, nominally Ca^{2+} -free solution containing 1 mmol/l ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ethoxy) N,N,N',N' -tetraacetic acid was used. Norepinephrine bitartrate, methoxamine hydrochloride, and Y27632 dihydrochloride were dissolved in isotonic NaCl solution. Caffeine was dissolved in PSS. Nifedipine, S(-)-BayK8644, and levromakalim were dissolved in dimethyl sulfoxide. The dimethyl sulfoxide concentration never exceeded 0.1% in the organ bath. Levromakalim was obtained from Tocris Bioscience, Bristol, UK. All other drugs were from Sigma-Aldrich, Munich, Germany.

Vascular rock and L-type Ca^{2+} channel mRNA abundances

The mRNA abundances for Rock 1, Rock 2, and the α -subunit of the L-type Ca^{2+} channel ($\text{Ca}_v1.2$) were determined by quantitative real-time PCR. For this purpose, six to eight third-order renal or mesenteric arteries were collected per animal and put into prechilled test tubes. Samples were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until further analysis. RNA extraction, reverse transcription, and PCRs were performed as described in detail previously [33]. PCRs were carried out using Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Böblingen, Germany) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR data were analyzed with the analysis for real-time PCR MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) workbook developed by Peirson *et al.* [34]. The vascular mRNA abundances for Rock 1, Rock 2,

and the α -subunit of $\text{Ca}_v1.2$ were normalized to the geometric means of β -actin and porphobilinogen deaminase mRNA abundances. Primer sequences are given in Table 1.

Norepinephrine-induced Rock activation

Third-order intrarenal arteries ($n = 12/\text{animal}$) or aortic rings (4–5/animal) were dissected, collected into a test tube and incubated in PSS at 37°C for 10 min. Thereafter, the vessels were treated with 10 $\mu\text{mol/l}$ norepinephrine at 37°C for 2 min. Controls remained untreated. After incubation with norepinephrine, renal arteries or aortic rings were rapidly shock frozen in acetone on dry ice for 10 min. Then, the vessels were fixed in a dry ice acetone slurry containing 15% trichloroacetic acid and 10 mmol/l dithiothreitol for 1 h. The tissue was washed four times with acetone (10 min) to remove trichloroacetic acid and dithiothreitol and stored at -70°C until western blot analysis. Prior to western blot analyses, renal arteries or aortic rings were transferred to 150 μl or 300 μl lysis buffer (pH 7.4) containing 150 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris HCl, 10 mmol/l ethylene diamine tetraacetate, 0.1% Tween 20, 0.1% β -mercaptoethanol, 0.1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 $\mu\text{mol/l}$ okadaic acid, and 10 $\mu\text{l/ml}$ protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), frozen in liquid nitrogen and ground (mortar). Thereafter, the homogenate was treated with ultrasonic waves twice for 15 s at 4°C. Protein concentrations were determined by the Biuret reaction (Carl Roth, Karlsruhe, Germany).

The phosphorylation of the Rock substrates myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1), ezrin, radixin, and moesin (ERM) served as a measure of Rock activation. For measurements of MYPT1 phosphorylation, intrarenal artery proteins (5–10 $\mu\text{g}/\text{sample}$) were electrophoretically separated on XT-Criterion XT Bis-Tris Precast Gels (Bio-Rad, Munich, Germany) and transferred to nitrocellulose. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 and incubated with an anti-MYPT1 antibody (1:1000) (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). Alternatively, membranes were incubated with an antiphospho-MYPT1 (T850) antibody (1:1000) (Millipore). Thereafter, membranes were incubated with a peroxidase-labeled secondary antibody (1:10000, goat antirabbit, Bio-Rad). For measurements of ERM phosphorylation, intrarenal artery or aortic proteins (10–15 $\mu\text{g}/\text{sample}$) were electrophoretically separated on a 10% SDS-PAGE with a 5% stacking gel and transferred to nitrocellulose. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 and incubated with a polyclonal rabbit anti-ERM antibody (1:1000, Chemicon, Temecula, Canada) and a polyclonal rabbit antiphospho-ERM antibody

TABLE 1. Primer sequences

Gene	GenBank accession	Forward primer, 5'–3'	Reverse primer, 5'–3'
$\text{Ca}_v1.2$ α -subunit	NM_012517.2	AGACGTTCCCTCAGGCTGTGCT	TTCCGTGCTGTTGCTGGGCT
Rock 1	NM_031098	CTGGATGGATTGGATGCTTT	GCATTAACCTTCCTGGTGGGA
Rock 2	NM_013022	AGATCAGTGCAGCGGCTATT	ACCACGCTTGACAGGTTCTT
β -Actin	NM_031144	ACCACACTGTGCCCATCTA	GCCACAGGATCCATACCCA
Pbgd	NM_X06827	TGGGCACCCGGAAGAGT	CCTGTGGTGGACATAGCAATGAT

Pbgd, porphobilinogen deaminase; Rock, Rho kinase.

(1:1000–1:2000, Chemicon) that binds to T567 phosphorylated ezrin, T564 phosphorylated radixin, and T558 phosphorylated moesin. This procedure was followed by incubation with a peroxidase-labeled secondary antibody (goat antirabbit, 1:10000, Chemicon).

L-type Ca^+ channel α -1C-subunit ($\text{Ca}_v1.2$) protein abundance

Third-order renal arteries ($n=8-10/\text{kidney}$) were dissected from male Wistar rats (eight sham-sympathectomized and eight sympathectomized animals), collected into cooled test tubes, rapidly shock frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until western blot analysis. Renal arteries from both kidneys were pooled to yield a sufficient amount of protein. Samples were ground in lysis buffer (as described above without okadaic acid) and thawed on ice. The homogenates were treated with ultrasonic waves twice for 15 s at 4°C . After clearing the homogenates from cell debris by centrifugation (2000g for 10 min at 4°C), samples were further centrifuged at 100000g for 1 h at 4°C . Thereafter, the pellet containing the membrane proteins was resuspended in an appropriate amount of lysis buffer. Protein concentrations were determined with a bicinchoninic acid assay (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany). Membrane proteins (40 $\mu\text{g}/\text{sample}$) were electrophoretically separated on a 7.5% SDS-PAGE gel with a 5% stacking gel and transferred to nitrocellulose. Membranes were blocked with $1\times$ Roti-Block (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and incubated with a mouse anti- $\text{Ca}_v1.2$ antibody (1:10, NeuroMab, UC Davis/NIH NeuroMab Facility, USA) at 4°C overnight. This procedure was followed by incubation with a peroxidase-labeled secondary antibody (1:2000, goat antimouse, Bio-Rad).

In all western blots, immunoreactive bands were detected using an enhanced chemiluminescence kit (ECL Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) and quantified by densitometry (GelScan Standard V5.02; BioSciTec, Frankfurt am Main, Germany). Equal loading was confirmed by stripping the membrane and reprobing it with an antibody against β -actin (1:25000, Chemicon).

Membrane potential recordings

For measurements of VSMC membrane potential, intrarenal arteries were dissected and mounted in the organ chamber of a single channel wire myograph (Danish Myotechnology, Aarhus, Denmark) filled with PSS as described above. After the normalization procedure, viability of the dissected vessels was confirmed by testing the contractile response to the α_1 -adrenoceptor agonist methoxamine (10 $\mu\text{mol}/\text{l}$). Microelectrodes pulled from aluminosilicate glass and filled

with 3 mol/l KCl were used to perform intracellular recordings of membrane potential in smooth muscle cells of intact arteries. The membrane potential was recorded with an M-767 amplifier (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA). Impalements of the smooth muscle cells, made from the adventitial side, were facilitated employing a Piezo stepper (PM-20; World Precision Instruments). Several criteria were used for acceptance of membrane potential recordings: an abrupt change in membrane potential upon cell penetration; a constant electrode resistance when compared before, during and after the measurement; a stable reading of the membrane potential lasting longer than 1 min; no change in baseline when the electrode was removed.

Statistics

Sigmoidal curve fitting of concentration–response curves to a four-parameter logistic function to calculate $\log\text{EC}_{50}$ (half maximal effective concentration) and maximal effect (E_{max}) was performed with SigmaPlot graphical Software (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). When no sigmoidal curve could be fitted to concentration–response curves, the data were analyzed by two-way analysis of variance for repeated measurements. When experiments had a 2×2 factorial design, data were analyzed by two-way analysis of variance or two-way analysis of variance for repeated measurements. Posthoc pairwise multiple comparisons were performed by the Student–Newman–Keuls method. Comparisons of two group means were performed by Student's t test. Data are given as means \pm SEM; n is the number of animals tested. Descriptive and analytical statistics were performed with SigmaStat statistical software (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

RESULTS

Effects of sympathectomy on arterial pressure and norepinephrine sensitivity of small arteries

Neonatal sympathectomy caused a slight reduction in mean arterial pressure (Table 2). Heart rate was not significantly different between groups. Renal and mesenteric arteries from sympathectomized animals showed lower $\log\text{EC}_{50}$ and higher E_{max} ($P<0.05$) for norepinephrine-induced contractions than the respective vessels from sham-sympathectomized animals (Table 3). The differences in E_{max} for norepinephrine-induced contractions in renal and mesenteric arteries did not reach statistical significance for individual group comparisons. Potassium (125 mmol/l K^+)-induced increases in wall tension and lumen diameters of renal and mesenteric arteries corresponding to a wall

TABLE 2. Effects of neonatal sympathectomy on mean arterial pressure, heart rate, and body weight in 9–10-week-old rats

	Sham sympathectomized		Sympathectomized	
	Male, $n=3$	Female, $n=4$	Male, $n=4$	Female, $n=5$
MAP (mmHg)	110 \pm 3	110 \pm 2	105 \pm 2*	104 \pm 2*
HR (bpm)	374 \pm 25	424 \pm 19	409 \pm 22	424 \pm 22
Body weight (g)	378 \pm 31	280 \pm 24 [‡]	381 \pm 45	259 \pm 12 [‡]

There was a sex-independent effect of sympathectomy on MAP, HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure.

* $P<0.05$ vs. sham sympathectomized.

[‡] $P<0.05$ vs. male animals.

Heumann *et al.***TABLE 3. LogEC₅₀ and E_{max} for norepinephrine-induced contractions, 125 mmol/l K⁺-induced wall tension and lumen diameters in renal and mesenteric arteries**

	Sham sympathectomized		Sympathectomized	
	Male, n = 7	Female, n = 7	Male, n = 7	Female, n = 7
Third-order renal arteries				
LogEC ₅₀ (mol/l)	-5.95 ± 0.12	-6.03 ± 0.17	-6.96 ± 0.24*	-6.88 ± 0.18*
E _{max} (relative tension)	1.33 ± 0.08	1.34 ± 0.12	1.62 ± 0.10	1.72 ± 0.09
K ⁺ -induced wall tension (mN/mm)	2.1 ± 0.37	1.16 ± 0.28	1.18 ± 0.41	1.66 ± 0.24
Lumen diameter (μm)	138 ± 5	128 ± 4	129 ± 6	131 ± 7
Third-order mesenteric arteries				
LogEC ₅₀ (mol/l)	-6.06 ± 0.15	-5.75 ± 0.10	-6.41 ± 0.22*	-6.15 ± 0.09*
E _{max} (relative tension)	1.11 ± 0.03	1.05 ± 0.08	1.46 ± 0.12	1.36 ± 0.12
K ⁺ -induced wall tension (mN/mm)	2.98 ± 0.23	1.87 ± 0.42 [‡]	3.31 ± 0.62	1.71 ± 0.30 [‡]
Lumen diameter (μm)	123 ± 4	115 ± 2	129 ± 2	122 ± 9
Body weight (g)	401 ± 23	283 ± 15 [†]	409 ± 31	267 ± 9 [†]

Lumen diameters were estimated from length-tension curves and correspond to a wall tension at 90% of mean arterial pressure.

*P < 0.05 vs. vessels from sham-sympathectomized animals.

†P < 0.05 vs. male animals.

‡P < 0.05 vs. vessels from male animals.

tension at 90% of mean arterial pressure were not significantly affected by sympathectomy (Table 3). With the exception of potassium-induced wall tension in mesenteric arteries, the data presented in Table 3 were not affected by the sex of the animals.

Effects of sympathectomy on Rock and L-type Ca²⁺ channel-dependence of norepinephrine-induced vasoconstrictions in renal and mesenteric arteries

Rock inhibition increased the logEC₅₀ for norepinephrine-induced vasoconstrictions in renal arteries, but had no significant effects on logEC₅₀ in mesenteric arteries (Fig. 1). The Y27623-induced rightward shift of the norepinephrine concentration–response curve was significantly greater in renal arteries from sympathectomized than from sham-sympathectomized rats ($\Delta\log\text{EC}_{50}$ 0.79 ± 0.14 vs. 0.28 ± 0.07 mol/l; P < 0.05). Rock inhibition reduced E_{max} for norepinephrine-induced vasoconstrictions in both renal and mesenteric arteries regardless whether the vessels had been obtained from sympathectomized or sham-sympathectomized animals (P < 0.05, Fig. 1). Nifedipine caused a rightward shift of the norepinephrine concentration response curve in renal arteries from sympathectomized rats ($\Delta\log\text{EC}_{50}$ 0.87 ± 0.11 vs. 0.08 ± 0.13 mol/l; P < 0.05) but not in renal arteries from sham-sympathectomized rats and reduced E_{max} of norepinephrine-induced vasoconstrictions to a similar extent in renal arteries from both groups (Fig. 2a). In mesenteric arteries, nifedipine did not affect logEC₅₀ and reduced E_{max} of norepinephrine-induced vasoconstrictions to a similar degree in both groups (Fig. 2b). The effects of Rock inhibition or L-type Ca²⁺ channel blockade on norepinephrine-induced vasoconstrictions were not sex dependent (Tables S1 and S2, online data supplement, <http://links.lww.com/HJH/A579>). Therefore, the data from males and females were pooled and analyzed together. The L-type Ca²⁺ channel activator S(-)-BayK8644 increased wall tension in renal arteries from sympathectomized animals but not in renal arteries from sham-sympathectomized animals and not in mesenteric arteries from both groups (Fig. 3). Neonatal sympathectomy enhanced

the effects of Rock inhibition as well as of L-type Ca²⁺ channel blockade or activation on norepinephrine-induced vasoconstriction in renal but not in mesenteric arteries (Table 4). Therefore, the consecutive experiments were performed in renal arteries only.

We tested if the greater rightward shift of the norepinephrine concentration–response curve in response to Rock inhibition in renal arteries of sympathectomized animals depends on L-type Ca²⁺ channel function. Therefore, we repeated the experiment shown in Figure 2a and confirmed that nifedipine caused a greater rise in logEC₅₀ in vessels from sympathectomized animals than in vessels from control animals ($\Delta\log\text{EC}_{50}$ = 0.69 ± 0.10 vs. 0.35 ± 0.05 mol/l; P < 0.05). Subsequently, these vessels were treated with Y27623 in the presence of nifedipine. In the presence of the L-type Ca²⁺ channel blocker, Rock inhibition did not shift the norepinephrine concentration–response curves further to the right and reduced E_{max} (P < 0.001) for norepinephrine to a similar extent in vessels from sympathectomized and sham-sympathectomized animals (Fig. 4a). Conversely, Rock inhibition completely abolished the S(-)-BayK8644-induced contractions in renal arteries from sympathectomized rats (Fig. 4b).

Effects of sympathectomy on rock activity, L-type-Ca²⁺ channel expression and VSMC membrane potential in small renal arteries

Rock isoenzyme mRNA abundances were similar in renal arteries from sympathectomized and sham-treated animals and norepinephrine did not increase Rock-dependent MYPT1 T850 phosphorylation in small renal arteries (Fig. 5). Furthermore, norepinephrine failed to change the phosphorylation status of the Rock substrates ERM in small renal arteries, whereas it significantly increased ERM phosphorylation in aortic rings (Fig. 6).

The mRNA and protein abundances of the pore-forming α -subunit of Ca_v1.2 were similar in renal vessels from sympathectomized and control animals (Fig., online data supplement, <http://links.lww.com/HJH/A579>). To test if inositol triphosphate-dependent Ca²⁺ release was affected by sympathectomy, renal arteries were constricted with

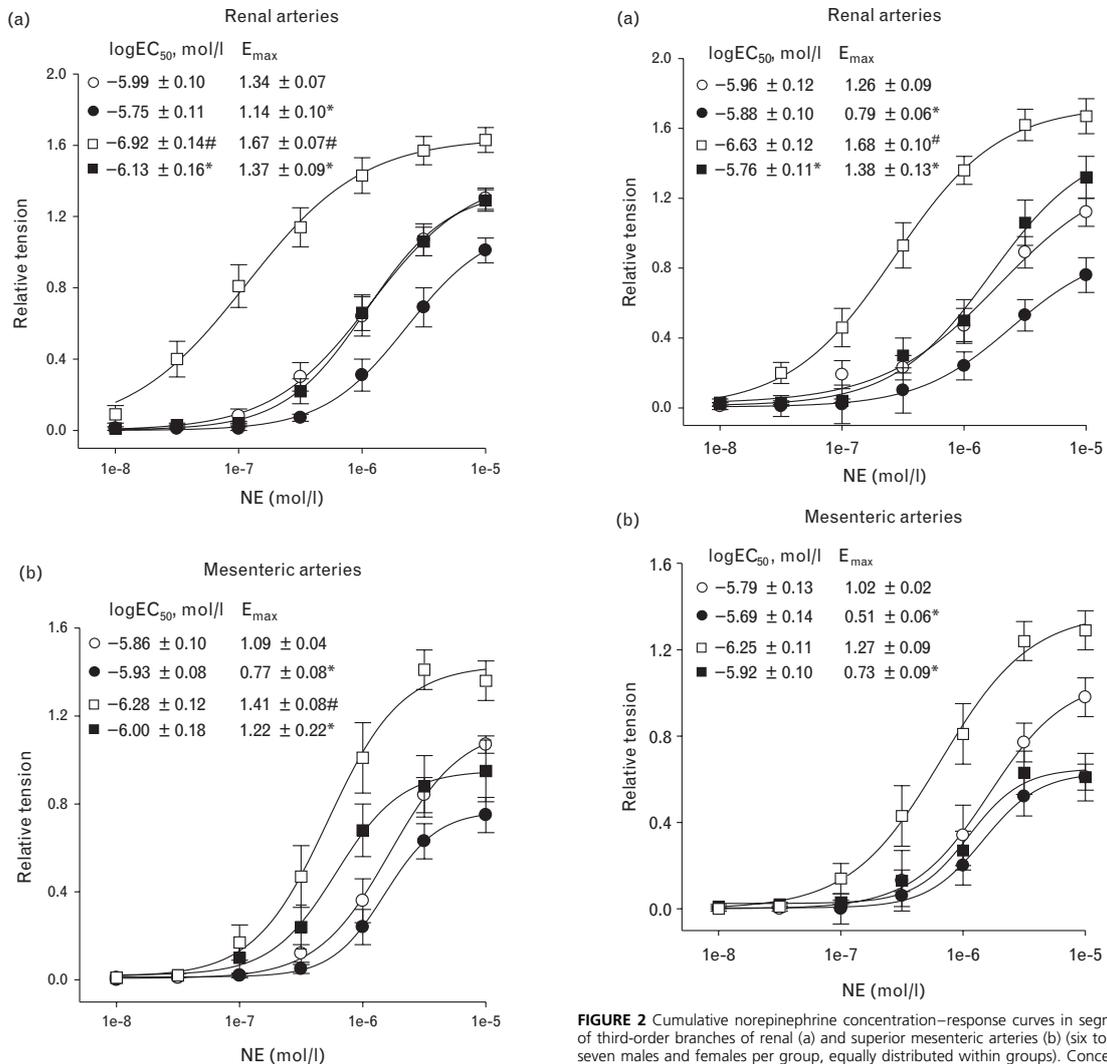


FIGURE 1 Cumulative norepinephrine concentration–response curves in segments of third-order branches of renal (a) and superior mesenteric arteries (b) (seven males and seven females per group). The concentration–response curves without and with the Rho kinase inhibitor Y27632 were obtained in the same vessels. Y27632 increased logEC₅₀ values only in renal arteries from sympathectomized rats. ○ Sham sympathectomized; ● +3 μmol/l Y27632, n = 14; □ sympathectomized; ■ +3 μmol/l Y27632, n = 14; *P < 0.05 vs. respective values during vehicle treatment; #P < 0.05 vs. respective values from sham-sympathectomized animals.

FIGURE 2 Cumulative norepinephrine concentration–response curves in segments of third-order branches of renal (a) and superior mesenteric arteries (b) (six to seven males and females per group, equally distributed within groups). Concentration response curves without and with nifedipine were obtained in the same vessels. Nifedipine increased logEC₅₀ values only in renal arteries from sympathectomized rats. ○ Sham sympathectomized; ● +10 μmol/l nifedipine, n = 13 renal, n = 14 mesenteric; □ sympathectomized; ■ +10 μmol/l nifedipine, n = 13; *P < 0.05 vs. respective values during vehicle treatment; #P < 0.05 vs. respective values from sham-sympathectomized animals.

norepinephrine in the presence or absence of Ca²⁺. The removal of Ca²⁺ from the organ bath decreased the norepinephrine-induced constrictions of renal arteries from sympathectomized and sham-treated animals to a similar extent (Fig. 7a). The ryanodine receptor activator caffeine increased wall tension similarly in small renal arteries from both groups (Fig. 7b).

The sensitivity to K⁺-induced contractions was higher in renal arteries from sympathectomized rats than in renal arteries from sham-sympathectomized animals as indicated

by lower EC₅₀ values in the former (32.6 ± 1.0 vs. 41.7 ± 1.0 mmol/l, P < 0.001) (Fig. 8a). Direct measurements showed that VSMC resting potential was significantly lower in vessels from sympathectomized than in vessels from sham-sympathectomized animals (Fig. 8b). Application of a depolarizing stimulus (20 mmol/l extracellular K⁺ concentration) enhanced S(-)-BayK8644-induced contractions in renal arteries from sympathectomized animals. LogEC₅₀ decreased from -7.25 ± 0.08 to -7.96 ± 0.06 mol/l and E_{max} increased from 0.21 ± 0.03 to 0.34 ± 0.04 (both P < 0.001). K_{ATP}-channel activation with levcromakalim abolished the S(-)-BayK8644-induced contractions in

Heumann et al.

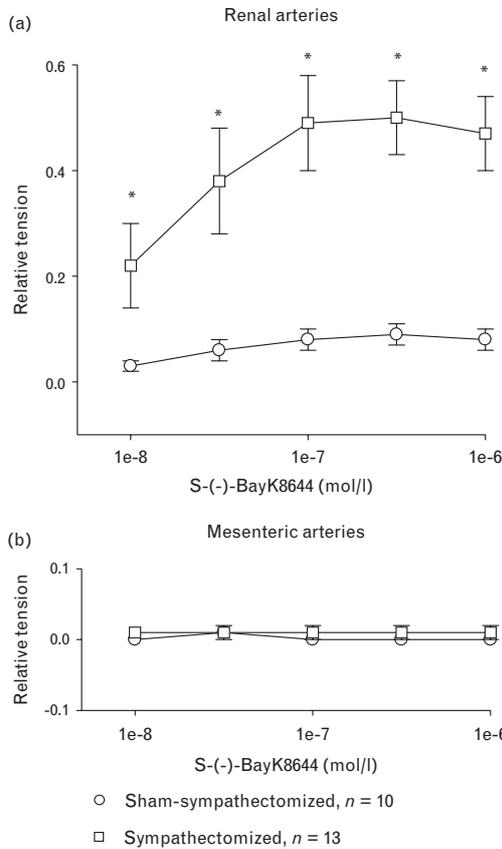


FIGURE 3 Cumulative concentration–response curves to the L-type Ca^{2+} channel activator S(-)-BayK8644 in third-order renal (a) and mesenteric (b) arteries (five male sham-sympathectomized rats and seven male sympathectomized rats). * $P < 0.05$ vs. sham sympathectomized.

vessels from sympathectomized animals without effects on basal vascular tone (Fig. 9a). Elevating extracellular K^+ concentration to 20mmol/l also led to concentration-dependent contractions in renal arteries from sham-sympathectomized animals in response to S(-)-BayK8644, whereas pretreatment with levromakalim had no effect on vascular tone in response to S(-)-BayK8644 (Fig. 9b).

TABLE 4. Effects of neonatal sympathectomy on pharmacological characteristics of small renal and mesenteric arteries

	Renal	Mesenteric
NE log EC_{50}	↓	↓
NE E_{max}	↑	↑
NE log EC_{50} during Rock inhibition	↑	↔
NE E_{max} during Rock inhibition	↓	↓
NE log EC_{50} during L-type Ca^{2+} channel blockade	↑	↔
NE E_{max} during to L-type Ca^{2+} channel blockade	↓	↓
Vasoconstriction in response to S(-)-BayK8644	↑	—

NE, norepinephrine, Rock, Rho kinase.

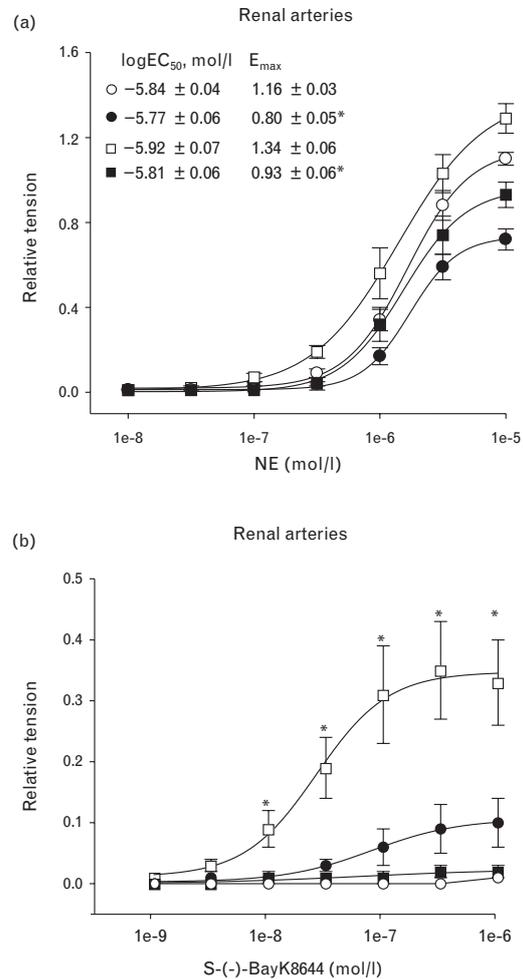


FIGURE 4 (a) Cumulative norepinephrine concentration–response curves in nifedipine-pretreated third-order branches of renal arteries from male rats. Concentration–response curves without and with Y27632 were obtained in the same vessels. ○ Sham sympathectomized + 10 $\mu\text{mol/l}$ nif; ● 10 $\mu\text{mol/l}$ nif + 3 $\mu\text{mol/l}$ Y27632, $n = 8$; □ sympathectomized + 10 $\mu\text{mol/l}$ nif; ■ 10 $\mu\text{mol/l}$ nif + 3 $\mu\text{mol/l}$ Y27632, $n = 8$; * $P < 0.05$ vs. respective values during treatment with nifedipine only. (b) Cumulative S(-)-BayK8644 concentration–response curves in intrarenal arteries from male rats. Concentration–response curves without and with Y27632 were obtained in the same vessels. ○ sham sympathectomized; ● +3 $\mu\text{mol/l}$ Y27632, $n = 8$; □ sympathectomized; ■ +3 $\mu\text{mol/l}$ Y27632, $n = 8$; * $P < 0.01$ vs. sham sympathectomized with or without Y27632 or vs. sympathectomized with Y27632. nif, nifedipine.

DISCUSSION

The present study shows that neonatal sympathectomy increases the sensitivity of small renal and mesenteric arteries to norepinephrine-induced vasoconstrictions, enhances the rightward shifts of norepinephrine concentration–response curves during Rock and L-type Ca^{2+} channel inhibition in renal but not in mesenteric arteries, and facilitates L-type Ca^{2+} channel activation in renal but not in mesenteric arteries because of a depolarized

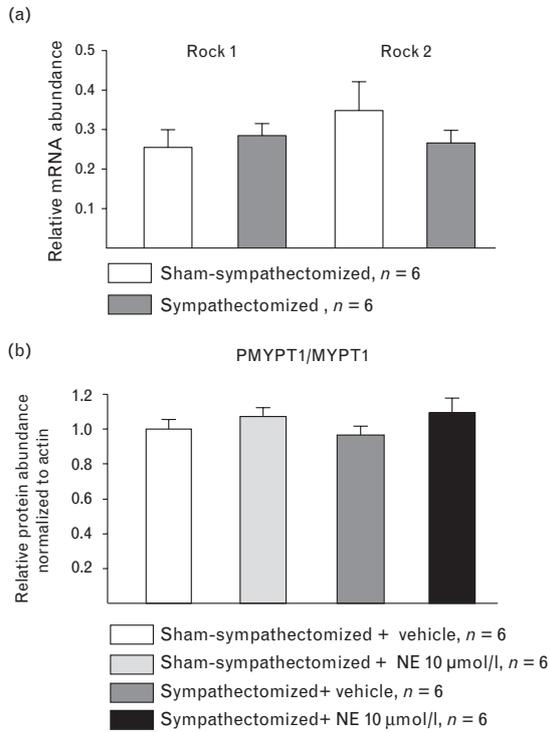


FIGURE 5 (a) Rho kinase 1 and Rho kinase 2 mRNA abundances in small renal arteries from male sham-sympathectomized and sympathectomized animals. mRNA abundances were normalized to the geometric mean of β -actin and porphobilinogen deaminase mRNA abundances. (b) Effects of norepinephrine on the phosphorylation status (T850) of myosin phosphatase target subunit 1 in small renal arteries. PMYPT1, phosphorylated myosin phosphatase target subunit 1.

membrane potential in renal arterial VSMCs. These findings indicate that the dependence of molecular mechanisms regulating vascular tone on sympathetic innervation differs between renal and mesenteric arteries. In agreement with other studies [35,36], our experiments did not reveal sex-specific differences of norepinephrine sensitivity in small arteries. We did not observe sex-specific effects of sympathectomy on the pharmacological characteristics of the arteries investigated suggesting that long-term effects of sympathetic innervation on these blood vessels are similar in male and female rats.

Neonatal sympathectomy increased the Rock-dependence of norepinephrine-induced contractions in renal arteries. However, we did not find differences in Rock mRNA abundances and basal Rock substrate phosphorylation between renal arteries from sympathectomized and sham-sympathectomized rats. Thus, the greater Rock dependence of norepinephrine-induced vasoconstrictions in renal arteries from sympathectomized vs. sham-sympathectomized animals may have been secondary to enhanced adrenoceptor-dependent or L-type Ca^{2+} channel-dependent activation of the RhoA/Rock pathway [25,27]. Our data on the effects of Rock inhibition on norepinephrine-induced contraction in renal arteries pretreated with nifedipine are consistent with this notion, but we did not find a rise in norepinephrine-induced Rock substrate phosphorylation in small renal arteries from sham-sympathectomized and sympathectomized rats. Together, these data indicate that enhanced Rock activity does not contribute to increased norepinephrine sensitivity in renal arteries from sympathectomized animals. Our data correspond well with recent findings in mesenteric and saphenous arteries where sympathectomy was not associated with alterations in Rock mRNA or protein abundances [10,11]. The enhanced Rock dependence of

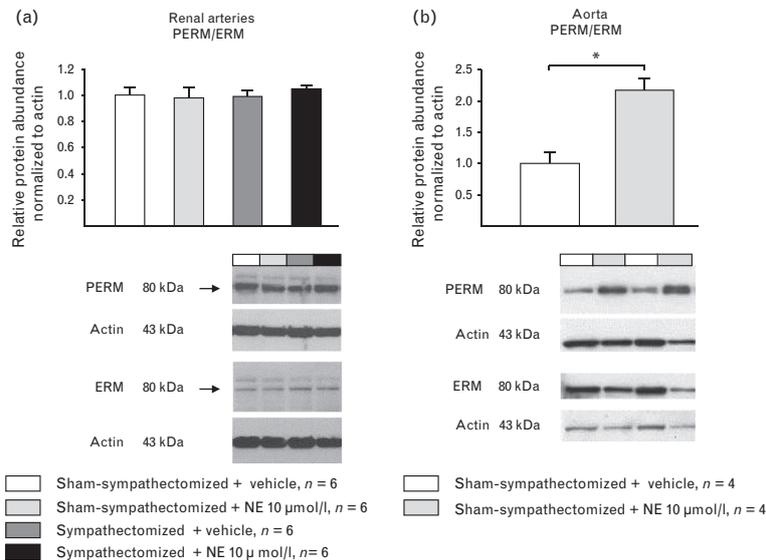


FIGURE 6 Effects of norepinephrine on the phosphorylation status of the Rock substrates ezrin (at T567), radixin (at T564), and moesin (at T558) in small renal arteries (a) and in aortic rings (b) from male rats. * $P < 0.05$.

Heumann *et al.*

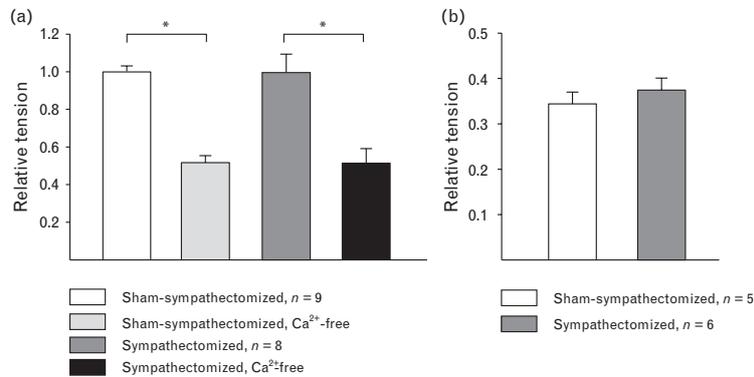


FIGURE 7 (a): Contractile responses of intrarenal arteries from male rats to 10 $\mu\text{mol/l}$ norepinephrine in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} (2.5 mmol/l). Contractile responses in Ca^{2+} -free solution are given relative to the norepinephrine-induced responses in the presence of Ca^{2+} . (b) Contractile responses of intrarenal arteries from male rats to ryanodine receptor activation with caffeine (2 mmol/l). * $P < 0.001$.

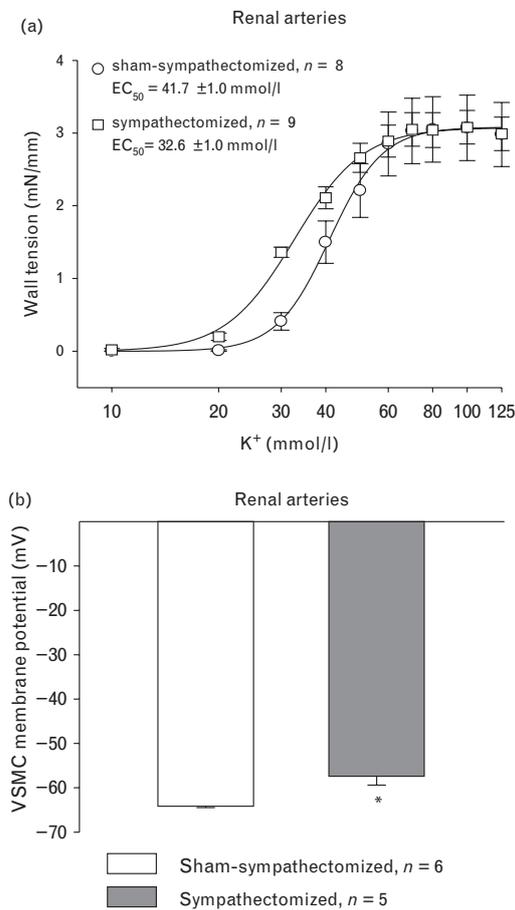


FIGURE 8 (a) K^{+} -induced contractions in small renal arteries from male sham-sympathectomized or sympathectomized rats. EC_{50} values were significantly lower in vessels from sympathectomized animals than in vessels from sham-treated animals ($P < 0.001$). (b) Vascular smooth muscle cell membrane potential in isolated intrarenal arteries from male sham-treated and sympathectomized animals. * $P < 0.01$.

norepinephrine-induced vasoconstrictions may have been because of denervation-induced changes in the function of Rock-dependent constituents of the contractile apparatus or the activation of signaling molecules involved in Ca^{2+} -independent activation of the contractile apparatus, such as mitogen-activated protein kinases [11]. Alternatively, constitutively active Rock may play a permissive role for the development of vascular tone in response to stimuli that increase intracellular Ca^{2+} in VSMCs [37]. The greater responsiveness of renal arteries from sympathectomized vs. sham-sympathectomized animals to Rock inhibition may thus be a consequence of enhanced L-type Ca^{2+} channel-dependent signaling mechanisms that require constitutively active Rock for the development of vascular tone (Fig. 10).

Renal vessels from sham-sympathectomized rats hardly responded with a constriction to S(-)-BayK8644, which corresponds with findings by Hansen *et al.* [38] in rabbit afferent arterioles which did not contract in response to S(-)-BayK8644. In contrast to the lack of effect in renal arteries from sham-sympathectomized animals, L-type Ca^{2+} channel activation with S(-)-BayK8644 caused a clear vasoconstriction in renal arteries from sympathectomized animals. In accordance with the differential effects of L-type Ca^{2+} channel activation in sympathectomized vs. sham-sympathectomized rats, L-type Ca^{2+} channel blockade with nifedipine caused a greater rightward shift of the norepinephrine concentration–response curve in renal arteries from sympathectomized animals than in renal arteries from sham-sympathectomized controls. Searching for an explanation of these results on the molecular level, we tested if sympathectomy increased the expression of the pore-forming α_1 -subunit of the L-type Ca^{2+} channel, which contains the dihydropyridine binding site [26]. There were no significant differences in $\text{Ca}_v1.2$ α_1 -subunit mRNA or protein abundances between small renal arteries from sympathectomized rats and from control rats, indicating that the enhanced responses of renal arteries from sympathectomized rats to nifedipine or to S(-)-BayK8644 are not because of different expression levels of the dihydropyridine-binding structures.

As we did not find evidence for altered L-type Ca^{2+} channel abundance in renal arteries from neonatally

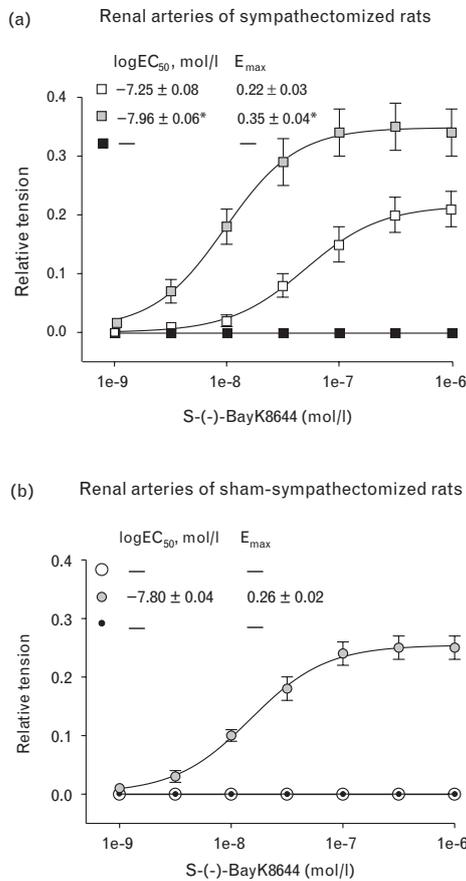


FIGURE 9 (a) Cumulative concentration–response curves to S(-)-BayK8644 in small renal arteries from male sympathectomized animals in physiological salt solution (○, n = 9), in the presence of 20 mmol/l K⁺ (■, n = 8) and in the presence of the K_{ATP} channel activator levcromakalim (●, n = 8). The graphs depict the active tension development in response to S(-)-BayK8644 related to the active tension developed in response to 125 mmol/l K⁺. High extracellular K⁺ decreased logEC₅₀ and increased E_{max}, whereas levcromakalim completely abolished the contractile responses to S(-)-BayK8644. (b) Cumulative concentration–response curves to S(-)-BayK8644 in small renal arteries from male sham-sympathectomized animals in physiological salt solution (○, n = 9), in the presence of 20 mmol/l K⁺ (●, n = 8) and in the presence of the K_{ATP} channel activator levcromakalim (■, n = 8). The two curves obtained in physiological salt solution and in the presence of levcromakalim were almost totally superimposed. *P < 0.001 vs. respective value obtained in physiological salt solution.

sympathectomized rats, we performed additional experiments to test whether neonatal sympathectomy may have affected Ca²⁺ release from intracellular stores. The results of our pharmacological experiments in Ca²⁺-free solution and on ryanodine receptor activation indicate that sympathectomy did not affect the dependence of norepinephrine-induced vasoconstriction on intracellular Ca²⁺ release in small renal arteries.

L-type Ca²⁺ channels require a strong depolarization stimulus for activation [26] raising the question whether the enhanced response of isolated renal arteries from sympathectomized vs. sham-sympathectomized rats to L-type Ca²⁺ channel activation may have been because

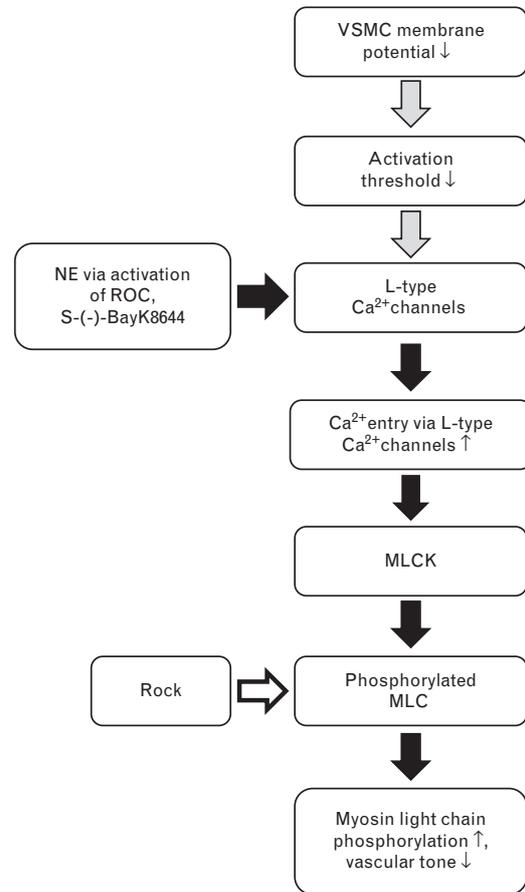


FIGURE 10 Working model illustrating how a depolarized vascular smooth muscle cell membrane potential, L-type Ca²⁺ channels and Rock may interact to increase the sensitivity of renal resistance arteries from sympathectomized rats to norepinephrine-induced vasoconstrictions: removal of sympathetic innervation depolarizes vascular smooth muscle cell membrane potential. The depolarized membrane potential facilitates activation of voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels by norepinephrine (possibly via receptor-operated ion channels that depolarize the membrane potential further) or by the L-type Ca²⁺ activator S(-)-BayK8644. The subsequent rise in intracellular [Ca²⁺] activates the myosin light chain kinase, which in turn increases MLC phosphorylation and vascular tone. In parallel, Rock activity maintains a basal MLC phosphorylation state that is required for the facilitated Ca²⁺-dependent myosin light chain kinase activation to become effective. Rock inhibition is associated with reduced basal MLC phosphorylation leading to reduced or blocked (S(-)-BayK8644) agonist-induced vasoconstrictor responses depending on the signaling mechanisms activated. MLC, myosin light chain; Rock, Rho kinase.

of a lower resting VSMC membrane potential. In the present study, renal arteries from sympathectomized rats showed a higher sensitivity to K⁺-induced contractions than renal arteries from sham-treated animals suggesting that the resting potential of VSMCs in renal resistance arteries of sympathectomized rats was depolarized relative to the VSMC membrane potential in renal arteries from sham-sympathectomized rats. Direct measurements showed that the VSMC membrane potential was less in renal arteries from sympathectomized animals than in renal arteries from sham-sympathectomized controls.

Heumann *et al.*

Data on the effects of sympathetic denervation on smooth muscle resting potential are sparse. In agreement with the present data, measurements in the guinea pig vas deferens showed that sympathetic denervation was accompanied by a depolarized smooth muscle membrane potential [28]. The VSMC membrane potentials in renal arteries from sham-treated animals as obtained here were similar to those reported for small mesenteric arteries [39,40]. In afferent and efferent arterioles, VSMC resting potentials have been reported to be somewhat lower than in the third-order renal artery segments investigated here, that is, -55 mV to -40 mV [41], suggesting that VSMC resting potential decreases in the renal vascular bed from proximal resistance arteries toward arterioles.

To test if the enhanced responsiveness of renal resistance arteries from sympathectomized rats to L-type Ca^{2+} channel activation is because of the depolarized membrane potential, we applied depolarizing and hyperpolarizing stimuli. Elevation of the extracellular K^+ concentration to 20 mmol/l does not elicit a significant rise in vascular tone but depolarizes VSMC membrane potential by approximately 10 mV [39]. In the presence of this depolarizing stimulus, S(-)-BayK8644-induced contractions were significantly increased in renal vessels from sympathectomized animals. As a hyperpolarizing stimulus we used the K_{ATP} channel activator levcromakalim, which abolished the constrictor response to S(-)-BayK8644 in renal arteries from sympathectomized animals. Renal arteries from sham-sympathectomized animals that hardly contracted in response to pharmacological L-type Ca^{2+} channel activation at an extracellular K^+ concentration of 4.7 mmol/l also developed a clear vasoconstriction in response to S(-)-BayK8644. These findings indicate that the depolarized membrane potential in renal arteries from sympathectomized rats facilitates pharmacological L-type Ca^{2+} channel activation thereby contributing to the increased sensitivity to norepinephrine-induced contractions (Fig. 10).

Multiple transporters and ion channels, including several families of potassium channels, contribute to VSMC membrane potential and the regulation of renal vascular resistance. The precise role of individual potassium channels is currently not well defined and may vary between different segments of the renal vasculature [41]. Some data of the present study point to the ATP-sensitive potassium channels. These channels consist of pore-forming units that belong to the inward rectifier (K_{ir}) family of potassium channels and sulfonyl urea receptors. Rat small renal arteries express $\text{K}_{\text{ir}}6.1$ and sulfonyl urea receptor 2B in the vascular smooth muscle layer [42]. *In vivo*, pharmacological activation of K_{ATP} channels causes a rise in renal blood flow [43] and K_{ATP} channels are part of α_2 and β -adrenoceptor-dependent signaling mechanisms in VSMCs [40,44,45]. It remains to be investigated, if sympathetic innervation chronically supports hyperpolarizing currents in renal VSMCs thereby contributing to a mature VSMC phenotype and if the regulation of K_{ATP} channel function by sympathetic nerves is part of these mechanisms.

We conclude that rat renal and mesenteric resistance arteries develop enhanced sensitivity to norepinephrine-induced vasoconstrictions after generalized neonatal

sympathectomy. The underlying mechanisms differ between both vessels types and are not affected by sex. Renal arteries from sympathectomized rats show a depolarized VSMC membrane potential that facilitates L-type Ca^{2+} channel activation and agonist-induced vasoconstrictions. Future studies may address the issues whether regional renal denervation that also affects afferent nerve fibers causes similar alterations in renal resistance artery function than systemic sympathectomy and whether these alterations blunt the blood pressure lowering effects of renal denervation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been presented in abstract form at Experimental Biology, Boston, MA, 2015.

This work was supported by the Department of Molecular Medicine and a Gerhard Domagk scholarship to P.H. by the University of Greifswald, Greifswald, Germany.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Daemen MJ, De Mey JG. Regional heterogeneity of arterial structural changes. *Hypertension* 1995; 25:464–473.
- Fisher SA. Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiol Genomics* 2010; 42A:169–187.
- Hill CE, Phillips JK, Sandow SL. Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. *Med Res Rev* 2001; 21:1–60.
- Qiao X, McConnell KR, Khalil RA. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. *Gen Med* 2008; 5 (Suppl A):S46–64.
- Joyner MJ, Barnes JN, Hart EC, Wallin BG, Charkoudian N. Neural control of the circulation: how sex and age differences interact in humans. *Compr Physiol* 2015; 5:193–215.
- Johns EJ, Kopp UC, DiBona GF. Neural control of renal function. *Compr Physiol* 2011; 1:731–767.
- Wang Y, Bukoski RD. Distribution of the perivascular nerve Ca_2+ receptor in rat arteries. *Br J Pharmacol* 1998; 125:1397–1404.
- Malpas SC. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiol Rev* 2010; 90:513–557.
- Lee RM, Borkowski KR, Leenen FH, Tsoporis J, Coughlin M. Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1991; 69:714–721.
- Reho JJ, Zheng X, Benjamin JE, Fisher SA. Neural programming of mesenteric and renal arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 307:H563–H573.
- Puzdrova VA, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Mochalov SV, Aalkjaer C, Nilsson H, *et al.* Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle $\text{Ca}(2+)$ sensitivity during early postnatal development in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 2014; 212:128–141.
- Kacem K, Sercombe R. Differing influence of sympathectomy on smooth muscle cells and fibroblasts in cerebral and peripheral muscular arteries. *Auton Neurosci* 2006; 124:38–48.
- Foss JD, Wainford RD, Engeland WC, Fink GD, Osborn JW. A novel method of selective ablation of afferent renal nerves by periaxonal application of capsaicin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015; 308:R112–R122.
- Mahfoud F, Cremers B, Janker J, Link B, Vonend O, Ukena C, *et al.* Renal hemodynamics and renal function after catheter-based renal sympathetic denervation in patients with resistant hypertension. *Hypertension* 2012; 60:419–424.
- Sandberg K, Umans JG. Recommendations concerning the new U.S. National Institutes of Health initiative to balance the sex of cells and animals in preclinical research. *FASEB J* 2015; 29:1646–1652.
- Kneale BJ, Chowienzyk PJ, Brett SE, Coltart DJ, Ritter JM. Gender differences in sensitivity to adrenergic agonists of forearm resistance vasculature. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1233–1238.

17. Caplea A, Seachrist D, Daneshvar H, Dunphy G, Ely D. Noradrenergic content and turnover rate in kidney and heart shows gender and strain differences. *J Appl Physiol (1985)* 2002; 92:567–571.
18. Scislo TJ, DiCarlo SE. Gender difference in cardiopulmonary reflex inhibition of sympathetic nerve activity. *Am J Physiol* 1994; 267:H1537–H1543.
19. Iliescu R, Lohmeier TE, Tudorancea I, Laffin L, Bakris GL. Renal denervation for the treatment of resistant hypertension: review and clinical perspective. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; 309:F583–F594.
20. Rizzoni D, Perlini S, Mircoli L, Porteri E, Franzelli C, Castellano M, et al. Enhanced vascular reactivity in the sympathectomized rat: studies in vivo and in small isolated resistance arteries. *J Hypertens* 2000; 18:1041–1049.
21. Hogestatt ED, Johansson O, Andersson KE, Kullendorff CM. Influence of renal denervation on vascular responsiveness of isolated rat intrarenal arteries. *Acta Physiol Scand* 1988; 132:59–66.
22. Grisk O, Lother U, Gabriels G, Rettig R. Influence of neonatal sympathectomy on proximal renal resistance artery function in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch* 2005; 449:364–371.
23. Woodcock EA, Morris MJ, McLeod JK, Johnston CI. Specific increase in renal alpha 1-adrenergic receptors following unilateral renal denervation. *J Recept Res* 1985; 5:133–146.
24. Colucci WS, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. Regulation of the postsynaptic alpha-adrenergic receptor in rat mesenteric artery. Effects of chemical sympathectomy and epinephrine treatment. *Circ Res* 1981; 48:104–111.
25. Wirth A. Rho kinase and hypertension. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802:1276–1284.
26. Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, Wegener JW. L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev* 2014; 94:303–326.
27. Fernandez-Tenorio M, Porras-Gonzalez C, Castellano A, Del Valle-Rodriguez A, Lopez-Barneo J, Urena J. Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated kinase by L-type Ca²⁺ channels: new mechanism for depolarization-evoked mammalian arterial contraction. *Circ Res* 2011; 108:1348–1357.
28. Fleming WW, Westfall DP. Altered resting membrane potential in the supersensitive vas deferens of the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 192:381–389.
29. Picklo MJ. Methods of sympathetic degeneration and alteration. *J Auton Nerv Syst* 1997; 62:111–125.
30. Grisk O, Rose HJ, Lorenz G, Rettig R. Sympathetic-renal interaction in chronic arterial pressure control. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283:R441–R450.
31. Johnson EM Jr, Cantor E, Douglas JR Jr. Biochemical and functional evaluation of the sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 193:503–512.
32. Johnson EM Jr, O'Brien F, Werbit R. Modification and characterization of the permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats. *Eur J Pharmacol* 1976; 37:45–54.
33. Schluter T, Rohsius R, Wanka H, Schmid C, Siepelmeyer A, Rettig R, et al. Amiloride lowers arterial pressure in cyp11a1ren-2 transgenic rats without affecting renal vascular function. *J Hypertens* 2010; 28:2267–2277.
34. Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:e73.
35. Li Z, Duckles SP. Influence of gender on vascular reactivity in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268:1426–1431.
36. Loria AS, Brinson KN, Fox BM, Sullivan JC. Sex-specific alterations in NOS regulation of vascular function in aorta and mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats compared to Wistar Kyoto rats. *Physiol Rep* 2014; 2:e12125.
37. Alvarez SM, Miner AS, Browne BM, Ratz PH. Failure of Bay K 8644 to induce RhoA kinase-dependent calcium sensitization in rabbit blood vessels. *Br J Pharmacol* 2010; 160:1326–1337.
38. Hansen PB, Jensen BL, Andreasen D, Skott O. Differential expression of T- and L-type voltage-dependent calcium channels in renal resistance vessels. *Circ Res* 2001; 89:630–638.
39. Mulvany MJ, Nilsson H, Flatman JA. Role of membrane potential in the response of rat small mesenteric arteries to exogenous noradrenaline stimulation. *J Physiol* 1982; 332:363–373.
40. Goto K, Fujii K, Abe I, Fujishima M. Sympathetic control of arterial membrane potential by ATP-sensitive K(+) channels. *Hypertension* 2000; 35:379–384.
41. Sorensen CM, Braunstein TH, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302:F505–F518.
42. Li L, Wu J, Jiang C. Differential expression of Kir6.1 and SUR2B mRNAs in the vasculature of various tissues in rats. *J Membr Biol* 2003; 196:61–69.
43. Sorensen CM, Giese I, Braunstein TH, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. Closure of multiple types of K⁺ channels is necessary to induce changes in renal vascular resistance in vivo in rats. *Pflugers Arch* 2011; 462:655–667.
44. El-Mas MM, El-Gowilly SM, Gohar EY, Ghazal AR. Pharmacological characterization of cellular mechanisms of the renal vasodilatory effect of nicotine in rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 588:294–300.
45. Tan JH, Al Abed A, Brock JA. Inhibition of KATP channels in the rat tail artery by neurally released noradrenaline acting on postjunctional alpha2-adrenoceptors. *J Physiol* 2007; 581:757–765.

Reviewers' Summary Evaluations

Reviewer 1

The blood pressure response to renal denervation is blunted in some hypertensive subjects. The sensitivity of renal and mesenteric resistance vessels to norepinephrine-induced constriction are enhanced by different mechanisms after neonatal sympathectomy. In this study the mechanisms of this enhanced sensitivity in both vessel types are elegantly unraveled. Clearly differences exist between permanent (chemical and surgical) sympathectomy in neonatal rats and selective endovascular renal denervation in adult humans. Whether this enhanced sensitivity to norepinephrine plays a role in the resistance of blood pressure to the antihypertensive effects of renal denervation remains to be seen.

Reviewer 2

Strengths: Elegant studies showed peripheral adrenergic sympathectomy resulted in compensatory mechanisms to seemingly maintain arterial tonicity in both renal and mesenteric arteries. These mechanisms involved increased L-type calcium channel signaling dependent on decreased VSMC membrane potential in renal but not mesenteric arteries.

Weaknesses: Mechanisms of sympathectomy to increase constriction in mesenteric arteries nor reasons for differences in this response between arterial beds was examined. What role such mechanisms have on venous constriction, mean circulatory filling pressure and blood pressure regulation during normotensive and hypertensive states, and the vascular tone mechanisms affected specifically by renal denervation during hypertension, are not clear.