

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. L. C. Rump

# Einwirkung des $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptors auf die Progression der chronischen Niereninsuffizienz

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Henning Karl Rudolf Hoch

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ. Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent : Univ. Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

Korreferent : Priv. Doz. Dr. med. Bernhard Rauch

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Hintergrund . . . . .	1
1.2	$\alpha_2$ -Adrenozeptor als Teil des sympatho-adrenergen Systems . . . . .	2
1.3	$\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor Knockout als Modell der Sympathikusüberaktivität	3
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>5</b>
2.1	Versuchstiere . . . . .	5
2.2	Narkose . . . . .	5
2.3	Subtotale Nephrektomie der Maus . . . . .	5
2.4	Isoliert perfundierte Mausnieren . . . . .	7
2.4.1	Präparation der Nieren . . . . .	8
2.5	Quantitative Bestimmung des Neurotransmitters Noradrenalin . . . . .	10
2.5.1	Allgemeiner Versuchsablauf . . . . .	10
2.5.2	Versuchsprotokolle der Noradrenalinbestimmung . . . . .	11
2.5.3	Probenaufbereitung . . . . .	12
2.5.4	Auswertung der Noradrenalinfreisetzung . . . . .	13
2.6	Bestimmung der renalen Druckantwort . . . . .	14
2.6.1	Versuchsprotokolle . . . . .	14
2.7	Blutdruck- und Herzfrequenzmessung . . . . .	14
2.8	Serumparameter . . . . .	15
2.9	Urinparameter . . . . .	15
2.10	NoradrenalinKonzentration im Gewebe . . . . .	16
2.11	Real-Time-quantitative (RTq)-PCR . . . . .	16
2.12	Statistik . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>18</b>
3.1	Charakterisierung des Genotyps . . . . .	18

3.2	Charakterisierung des Phänotyps . . . . .	19
3.2.1	Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation mit 1-15 Hz	19
3.2.2	Untersuchung der renalen Druckantwort . . . . .	19
3.2.3	Neurotransmission nach $\alpha_2$ -Adrenozeptorblockade . . . . .	20
3.3	Subtotal nephrektomierte Wildtyp- und Knockout- Maus im Vergleich	22
3.3.1	Albumin-Kreatinin-Ratio als Verlaufsparemeter für die chronische Nierenerkrankung . . . . .	22
3.3.2	Postoperative Überlebensanalyse . . . . .	23
3.3.3	Einfluss der subtotalen Nephrektomie auf Blutdruck und Puls	24
3.4	Präsynaptische Neurotransmission nach subtotaler Nephrektomie . .	25
3.4.1	Neurotransmission im Wildtyp 10 Tage postoperativ . . . . .	26
3.5	Interaktionen mit RAAS . . . . .	27
3.5.1	Ang II-Einfluss auf Neurotransmission . . . . .	27
3.5.2	Ang II-Einfluss auf Neurotransmission nach SNx . . . . .	28
3.6	Präsynaptische NA Autoinhibition nach SNx . . . . .	29
3.7	Katecholaminkonzentration in Blutplasma und Gewebe . . . . .	30
3.8	Noradrenalin-Reuptake . . . . .	32
3.9	Renalase . . . . .	33
3.10	Generierung der dbh- $\alpha_{2A}$ transgenen Knockout-Maus . . . . .	33
4	Diskussion	35
4.1	$\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout . . . . .	35
4.2	Sympathikusaktivierung bei Niereninsuffizienz . . . . .	36
4.3	Einwirkungen des $\alpha_{2A}$ -KOs auf die chronische Niereninsuffizienz . . .	38
4.4	Rescue-Mechanismus bei Knockout-Maus . . . . .	39
4.4.1	Allgemein adaptiert . . . . .	40
4.4.2	Präsynaptische Untersuchungen . . . . .	40
4.4.3	Postsynaptische Untersuchungen . . . . .	43
4.4.4	Renalase . . . . .	46
4.5	Schlussfolgerung . . . . .	47
5	Zusammenfassung	49
	Literaturverzeichnis	51
A	Danksagung	59

B Beruflicher Werdegang

60

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Nach wie vor sind die Mechanismen der Sympathikusaktivierung und erhöhter Neurotransmitterspiegel nach chronischen Nierenerkrankungen unvollständig verstanden. Es ist aber wichtig, ein genaueres Verständnis über diese Pathomechanismen zu gewinnen, um sich über Wirkmechanismus und Stellenwert sympatholytischer Medikamente in der Behandlung von Hypertonien und chronischen Nierenerkrankungen klar zu werden.

Es ist bekannt, dass Sympathikusüberaktivität bei chronischer Niereninsuffizienz (CNI) mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und mit einer gesteigerten Mortalität einhergeht. Dabei steht der Sympathikotonus eng mit der Plasmakonzentration von Noradrenalin (NA) in Korrelation [1–5]. In Tiermodellen und bei Patienten mit chronischen Nierenleiden konnte gezeigt werden, dass die geschädigte Niere Ausgangsort für erhöhte Sympathikusaktivität ist, die wiederum wesentlich zur Entwicklung einer Hypertonie und Progression der Niereninsuffizienz beiträgt. Durchtrennung der sensorischen Afferenzen durch dorsale Rhizotomie bei subtotal nephrektomierten Ratten verhinderte [6] und Entfernung einer erkrankten Niere senkte einen erhöhten Sympathikotonus einhergehend mit Blutdruckanstieg und einem erhöhten NA-Umsatz im Hypothalamus und Locus coeruleus [7, 8]. Zusätzlich konnte an einem Modell der chronischen Niereninsuffizienz histomorphologisch sowie funktionell gezeigt werden, dass das Sympatholytikum Moxonidin zu einer Verzögerung der renalen Progression führt. In einer nicht blutdruckwirksamen Dosis senkt das Sympatholytikum die Albuminurie chronisch nierenkranker Ratten, hemmt die Entwicklung der Glomerulosklerose und beeinflusst die renale Genexpression [9]. Moxonidin führt über Stimulierung der als  $I_1$ -Rezeptoren bezeichneten Strukturen im Stammhirn zu einer generellen Hemmung des Sympathikotonus, was eine Senkung der Noradrenalin- und Adrenalinplasmaspiegel sowie der Plasma-Renin-Aktivität zur Folge hat.

Über die Rolle der sympathischen Neurotransmitter bei der Progression der Niereninsuffizienz ist wenig bekannt. Neben einer Erhöhung des renovaskulären Widerstandes [10, 11] ließen sich direkte Effekte der Katecholamine und Kotransmitter auf die Podozytenfunktion sowie renovaskuläre und mitogene Effekte nachweisen [12–15]. Durch Fortschritte in der Molekulargenetik der Maus ist es nun möglich, nach Knockout von Rezeptoren des adrenergen Systems gezielt die Aktivität des Sympathikus zu beeinflussen. Es wurde eine  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout (KO) Maus generiert [16], die es ermöglicht, eine durch  $\alpha_{2A}$ -Knockout einhergehende erhöhte Neurotransmission und daraus resultierende Sympathikusüberaktivität auf die vorgeschädigte Niere zu untersuchen. Die gesteigerte Neurotransmission lässt sich auf eine aufgehobene  $\alpha_2$ -Autoinhibition der Noradrenalinfreisetzung und seiner Kotransmitter an der präsynaptischen Nervenendigung zurückführen.

## 1.2 $\alpha_2$ -Adrenozeptor als Teil des sympatho-adrenergen Systems

Der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor gehört neben den  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1-3}$ -Adrenozeptoren zu den Rezeptoren des sympathischen Nervensystems (SNS). Das sympathische Nervensystem bildet zusammen mit seinem Antagonisten, dem Parasympathikus, das vegetative Nervensystem und ist maßgeblich an der Regulation von Blutdruck und auch Nierenfunktion beteiligt. Adrenozeptoren (AR) vermitteln einen durch die Katecholamine Noradrenalin (NA) und Adrenalin (A) hervorgerufenen Effekt. Die Wirkung erfolgt bei allen AR über G-Proteine. Bis jetzt konnten über 800 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-protein-coupled receptors, GPCR) im menschlichen Genom und in vielen anderen Spezies identifiziert werden [17]. Die über die verschiedenen AR vermittelten Effekte und auch die Empfindlichkeit der AR für NA und A unterscheiden sich von Rezeptor zu Rezeptor. Über den  $\alpha_1$ -AR erfolgen hauptsächlich Vaso- und Bronchokonstriktion, über  $\alpha_2$ -AR zentral die Senkung des Sympathikotonus und peripher die Autoinhibition der Noradrenalinfreisetzung. Der  $\beta_1$ -AR ist überwiegend verantwortlich für die Regulation von Herzantrieb und für Reninfreisetzung in der Niere, der  $\beta_2$ -AR für die Vaso- und Bronchodilatation und der  $\beta_3$ -AR für die Lipolyse im braunen Fettgewebe. Während A auf alle AR wirkt, hat NA wenig Wirkung auf  $\beta_2$ -AR und starke Wirkung vor allem auf die beiden  $\alpha$ -AR [18, 19].

Es existieren drei  $\alpha_2$ -Subtypen ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ), deren Lokalisation und Funktion unterschiedlich sind [18, 20]. Dabei ist der  $\alpha_{2A}$ -Subtyp hauptverantwortlich für die

präsynaptische Autoinhibition der Noradrenalinfreisetzung aus der sympathischen Nervenendigung [21]. Die Rezeptorsubtypen sind sich bei Mensch und Maus qualitativ sehr ähnlich. Der orthologe  $\alpha_{2A}$ -Subtyp in der Maus wird auch als  $\alpha_{2D}$ - oder  $\alpha_{2A/D}$ -Subtyp bezeichnet; im Folgenden wird die Gattungsbezeichnung  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor durchgängig benutzt.

Eine Aktivierung des SNS führt über eine efferent gesteigerte Sympathikusaktivität zu einem Anstieg der Herzfrequenz und Myozytenkontraktilität am Herzen sowie zu einer Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße. An der Niere wird vermehrt Natrium reteniert und über die Renin-Ausschüttung das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) konsekutiv aktiviert. Das Renin-Angiotensin-System bzw. Angiotensin II hat selbst auch wiederum Einfluss auf das sympathische Nervensystem. Es bestehen verschiedene Möglichkeiten der Interaktion zwischen beiden Systemen, insbesondere wenn beide aktiviert sind, wie im Rahmen chronischer Herz- oder Nierenerkrankungen [22, 23]. Dabei kommen im ZNS lokalisierte wie auch peripher gelegene prä- bzw. postsynaptische Schnittpunkte in Frage (Abbildung 1.1) [24].

Auch die kürzlich entdeckte Renalase, die offensichtlich Katecholamine metabolisiert, beeinflusst möglicherweise das SNS und ist somit an der Blutdruckregulation beteiligt [25].

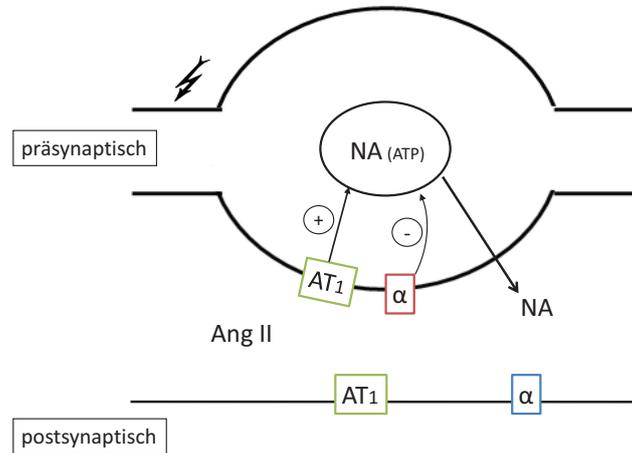
### 1.3 $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor Knockout als Modell der Sympathikusüberaktivität

Durch Deletion des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptors wird die präsynaptische Autoinhibition von Noradrenalin außer Kraft gesetzt. Die zirkulierende NA-Konzentration ist in dem  $\alpha_{2A}$ -Subtyp gegenüber dem Wildtyp aufgrund der fehlenden Autoinhibition signifikant erhöht [21, 26], was auf eine erhöhte Sympathikusaktivität schließen lässt.

Vonend und Mitarbeiter stellten mit dem Modell der isoliert perfundierten Mausniere an Mäusen vom C57/Bl6-Stamm bereits heraus, dass der  $\alpha_{2A}$ -Subtyp auch in der Niere hauptverantwortlich für die präsynaptische Modulation von Noradrenalin ist (Abbildung 1.1). So war die Neurotransmitterausschüttung nach renaler Nervenstimulation (RNS) in Nieren der Knockout-Maus aufgrund fehlender Autoinhibition signifikant gesteigert [27]. In gleichen Untersuchungen wurde deutlich, dass der  $\alpha_{2A}$ -AR nicht nur als Autorezeptor die Freisetzung von NA reguliert, sondern als Heterorezeptor

auch die des Kostransmitters Adenosinriphosphat (ATP).

Die Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass eine durch den  $\alpha_{2A}$ -AR-Knockout gesteigerte NA- und ATP-Freisetzung zu einer verstärkten Vasokonstriktion führt und glomerulosklerotische Umbauprozesse fördert.



**Abbildung 1.1:** Überblick sympathische Nervendingung

Neben der präsynaptischen Mehrausschüttung von NA war auch der aus dem hohen NA-Angebot resultierende postsynaptische Effekt, nämlich die Vasokonstriktion, signifikant höher in der Knockout-Maus [27]. Allerdings konnte der Effekt erhöhter renaler Neurotransmitterspiegel auf die chronische Nierenerkrankung zu diesem Zeitpunkt nur unzureichend untersucht werden. Mäuse vom C57/Bl6-Stamm entwickeln nach subtotaler Nephrektomie zwar einen Hypertonus und auch eine glomeruläre Hypertrophie, zeigen sich aber bei der Entwicklung einer Glomerulosklerose äußerst resistent [28]. Deswegen ist für die praktische Durchführbarkeit von Relevanz, den Knock-Out (bzw. -In: Neomycin-Kassette) in einem sensiblen Mausstamm zu platzieren. Dafür wurde der  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout des C57/Bl6-Stammes auf den Hintergrund des sensiblen FVB-Stammes gekreuzt und mit Vorversuchen demonstriert (Daten nicht gezeigt), dass die Kreuzung der C57/Bl6-Maus auf den FVB-Stamm in der 6. Generation eine ähnlich ausgeprägte Mikroalbuminurie entwickelt, die auf glomerulosklerotische Veränderungen schließen lässt. Von dem reinen FVB-Stamm war bereits bekannt, dass er, anders als die C57/Bl6 Maus, diese Eigenschaft besitzt [29].

## 2 Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden die Männchen der  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout FVB-Maus und als Vergleichsgruppe der entsprechende FVB-Wildtyp (WT) verwendet. Die Knockout-Tiere stammten aus einer Kreuzung des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout C57/Bl6 Mausstammes auf den Hintergrund des FVB-Stammes (Labormaus-Inzuchlinie von Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Die Tiere wurden in der zentralen Versuchstierhaltung der medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität-Bochum gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

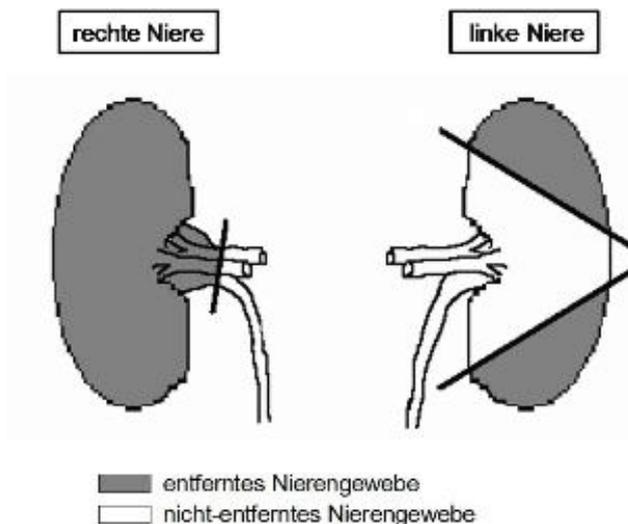
### 2.2 Narkose

Die Vollnarkose der  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout FVB-Maus und des Wildtyps erfolgte gewichtsadaptiert durch intraperitoneale Injektion mit 270 mg/kg Narcoren (Pentobarbital; Merial, Rohrdorf). Im Rahmen der Inhalationsanästhesie wurden die Versuchstiere in eine mit Isofluran (Baxter) befüllte Glasglocke gesetzt.

Als Indikator für eine ausreichende Narkosetiefe diente jeweils der Ausfall des „toe pinch reflex“ (Flexorreflex). Hierbei wurden die Zehen eines Hinterbeins zwischen den Fingernägeln fest gekniffen.

### 2.3 Subtotale Nephrektomie der Maus

Als in-vivo Experiment ermöglicht die subtotale (5/6) Nephrektomie (SNx) (Abbildung 2.1) die Induktion einer chronischen Nierenerkrankung. Für diese Zwecke wird die rechte Niere in toto, bei der linken Niere lediglich die obere und untere Polkappe der Niere entfernt. Das Alter der Versuchstiere betrug am Operationstag zirka 60 Tage (d).



**Abbildung 2.1:** Modell der subtotalen Nephrektomie

Vor Operationsbeginn wurden nach ausreichender Narkosetiefe die Augen zum Schutz mit Augensalbe (Polyspectran HC, Alcon) behandelt.

Die Schein-Operation (im Weiteren Sham) war bis auf die Organentnahme und Entfernung der Nierenkapsel mit der subtotalen Nephrektomie identisch, welche im Folgenden beschrieben wird:

Zuerst erfolgte die vollständige Nephrektomie der rechten Niere. Zu diesem Zweck wurde die Maus auf die linke Seite gelegt und die Haut der rechten Flanke desinfiziert. Der Flankenschnitt (Feine Schere, gerade, 11.5 cm, Martin) wurde entlang eines zuvor gebildetem Scheitels parallel, ein fingerbreit unterhalb, zum Rippenbogen vorbereitet. Nun wurde an dieser Stelle eine kleine Hautinzision gesetzt und ein zirka 1 cm großer Schnitt entlang des Scheitels vorgenommen. Die Haut wurde von der Muskulatur abgelöst und ein Schnitt durch die Muskulatur in Größe und Schnittführung dem Hautschnitt entsprechend durchgeführt. Jetzt konnte die rechte Niere mit Hilfe von Pinzetten (Martin) mobilisiert und die Nierenkapsel vorsichtig abpräpariert werden. Eine Ligatur wurde um den Nierenhilus gelegt (Miralene, USP 4/0, metric 1.5, nicht-resorbierbar, Braun) und mit drei Knoten zugezogen. Dies ermöglichte es, den Hilus distal der Ligatur zu durchtrennen und die Niere zu entfernen. Anschließend wurden Hilusstumpf und Knoten in den Bauch zurückgeschoben, die Bauchmuskulatur mit einer U-Naht und die Haut mit 3-4 Einzelknopfnähten wieder verschlossen.

Die Freilegung der linken Niere erfolgte analog zur rechten Niere. Jedoch wurde hier keine Ligatur um den Hilus, sondern jeweils eine Schlinge um den oberen und

unteren Pol der Niere gelegt und vorsichtig zugezogen. Das abgeschnürte Nierengewebe wurde mit einer gebogenen Strabismus-Federschere (gebogen, 11.5 cm, Martin) abgetrennt und die subtotal nephrektomierte Niere in den Bauchraum zurückgelagert. Anschließend wurde die Flanke analog zur rechten Seite verschlossen.

Postoperativ wurden die Wunden desinfiziert, die Maus mit einem Knipser am Ohr markiert, der Blutverlust durch Applikation von 1 ml NaCl im Nackenbereich kompensiert und eine konstante Körpertemperatur durch Bestrahlung mit einer Infrarot-Lampe gesichert.

## 2.4 Isoliert perfundierte Mausniere

Das Modell der isoliert perfundierten Mausniere (Abbildung 2.2) stellt ein in-vitro Experiment dar. Es ermöglicht zum Einen das (1) Aufzeichnen von Druckantworten der renalen Gefäße und zum Anderen das (2) Sammeln des Nierenperfundats, dessen Gehalt an Noradrenalin anschließend chromatographisch bestimmt werden kann.

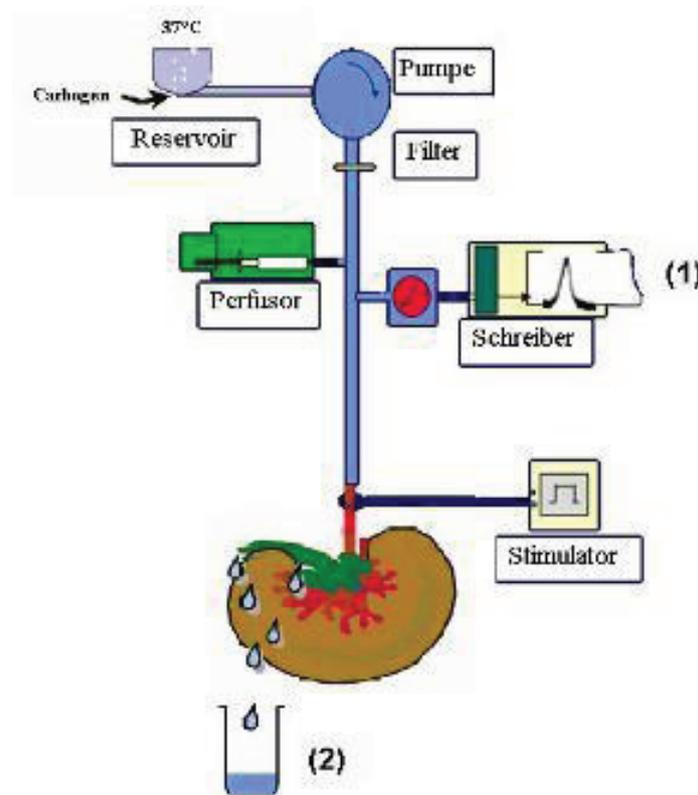


Abbildung 2.2: Modell der isoliert perfundierten Mausniere

### 2.4.1 Präparation der Nieren

Sobald die Maus eine ausreichende Narkosetiefe erreicht hatte, wurde eine mediane Laparoskopie durchgeführt, die Haut von der Muskulatur nach beiden Seiten zur Wirbelsäule hin abpräpariert und die Bauchdecke an der Linea alba eröffnet. Nach zwei Entlastungsschnitten durch die rechte und linke Bauchwand wurde der Bauchsitus mit vier Mosquitoklemmen (Martin, gebogen, 12.5 cm) aufgespannt und fixiert. Mit einem Tupfer wurden nun die Darmeingeweide der Maus zur linken Seite verschoben und das Lig. phrenicocolicum mit einer Strabismus-Federschere (gerade, 11.5, Martin) durchtrennt, so dass sich gute Sicht auf das Retroperitoneum ergab. Die nun folgenden Operationsschritte erfolgten unter einem Olympus SD 30 Mikroskop. Am cranialen Anteil der Bauchaorta kurz unterhalb des Zwerchfells wurde eine Ligatur (Seraflex USP 5/0, EP1, nicht-resorbierbare Seide, Serag-Wiessner) zur späteren Umkehrung des Kreislaufs vorbereitet. An Aorta und V. Cava inferior wurde weiter caudal kurz vor der Aortenbifurkation eine gebogene Mosquitoklemme (Martin, gebogen, 12.5 cm), knapp unterhalb des Abgangs der A. renalis sinister ein Mini-Gefäßclip (nach Biemer, 9mm, Martin) angesetzt. An diesem Abschnitt war der Blustrom unterbrochen und es bestand die Möglichkeit, nachdem die Aorta von der V. cava freipräpariert war, den abdominalen Teil der Aorta cranial der Bifurkation nach einer Inzision mit einer Strabismus-Federschere (gerade, 11.5 cm, Martin) mit einem Polyethylenschlauch (Außen-Ø 0.61 mm, Innen-Ø 0.28 mm, neoLab, Heidelberg) zu kanülieren. Der Polyethylenschlauch in der Aorta wurde mit einer Ligatur (Seide, 1 EP, Serag Wiessner) befestigt. Über diesen arteriellen Zugang konnten die Nieren nun zur Ausschwemmung des Blutes mit 37°C warmer (geheizt über einen Umwälzthermostaten DC10-P5/U, Roth) und mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) gesättigter Krebs-Henseleit-Lösung (6,895 g/l NaCl; 0,35 g/l KCl; 0,11 g/l MgSO<sub>4</sub>; 2,10 g/l NaHCO<sub>3</sub>; 0,14 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,9997 g/l Glucose; 0,3727 g/l CaCl<sub>2</sub>; 0,0249 g/l EDTA; 0,012 g/l Ascorbinsäure; Merk, Darmstadt) in situ perfundiert werden. Diese modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung passierte einen 0.45 µm Filter (Millex-AA, Millipore, F) bevor sie die Niere erreichte. Die Perfusion wurde mit einer planetengetriebenen Pumpe (Abimed, Gilson, Minipuls 2, Langenfeld, BRD) mit einer Perfusionsrate von 7.25 ml/min/g Niere konstant gehalten. Das Nierengewicht wurde über lineare Regression aus dem Verhältnis des Körpergewichtes zum Nierengewicht bestimmt.

Der kurz unterhalb des Abgangs der A. renalis sinister gesetzte Mini-Gefäßclip wurde nun entfernt, die zu Beginn um die Aorta, unterhalb des Zwerchfells und oberhalb

des Abgangs de A. renalis dextra, gesezte Ligatur zugezogen und die linke V. renalis eröffnet, um einen Abfluss zu schaffen. Die Maus wurde anschließend unter Eröffnung beider Jugularvenen und Exartikulation im Occipitalgelenk mit Durchtrennung des Rückenmarkes euthanasiert.

**Weiteres Vorgehen bei scheinoperierten Mäusen:** Mit anatomischen Pinzetten (fein, gebogen, 10.5 cm, Martin) wurden die Nierenkapseln, ohne die Niere zu verletzen, inzisiert und die Kapsel von der Niere getrennt. Nach Entfernung beider Nierenkapseln wurden nun vorsichtig die Aorta und beide Arteriae renalis von Fettgewebe und den Venen befreit, so dass alle Strukturen und Abgänge gut sichtbar waren. Auch das an den Nierenbecken liegende Fett wurde entfernt und die Harnleiter nah an der Niere abgetrennt. Wenn von den Nierenarterien noch weitere Gefäße abgingen, wurden diese mit Seide legiert. Um eine Dichtigkeit der A. renalis gewährleisten zu können, mussten oftmals die A. suprarenalis sowie die A. spermatica sinistra unterbunden werden. Anschließend wurde nun die rechte Nierenarterie über die Aorta mit einem Polyethylenschlauch (Außen-Ø 0.61 mm, Innen-Ø 0.28 mm) kanüliert und mit einer Ligatur (Seide, 1 EP, Serag Wiessner) befestigt. Zuvor war eine Ligatur an der Aorta zwischen den Abgängen der rechten und linken Nierenarterie gesetzt worden. Die rechte Niere konnte nun durch vorsichtiges Heraustrennen unter Inzision des Restgewebes der Nierenvenen aus dem Situs entnommen werden und an einer bipolaren Platinelektrode so befestigt werden, dass sich ein Flüssigkeitsfilm zwischen Elektrode und Nierenhilus bildete. Der Zufluss der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung wurde weiter über den Polyethylenschlauch sichergestellt. Die Niere wurde anschließend in eine beheizte Glaskammer (37°C) gehängt.

Die verbliebene linke Niere wurde im Folgenden über den caudalen Teil der Aorta kanüliert, ebenfalls mit einer Ligatur an dem Polyethylenschlauch (Außen-Ø 0.61 mm, Innen-Ø 0.28 mm) befestigt, vorsichtig herausgelöst und an der zweiten bipolaren Platinelektrode angebracht und in der zweiten Glaskammer platziert. Beide um die Nierenarterien platzierten Elektroden wurden zur elektrischen Reizung an einen Stimulator (Typ 21512, HSE, Electronics, March, BRD) angeschlossen.

**Weiteres Vorgehen bei subtotal nephrektomierten Mäusen:** Da bei einer FVB-Maus nach subtotaler Nephrektomie lediglich die linke Niere zu entfernen war (siehe Abbildung 2.1), unterschieden sich die Arbeitsschritte nach Euthanasierung der Maus von denen der scheinoperierten Maus.

Die rechte teilnephrektomierte entkapselte Niere war als Folge der Operation stark mit umliegenden Strukturen verwachsen und musste von diesen mit anatomischen Pinzetten (fein, gebogen, 10.5 cm, Martin) vorsichtig gelöst werden, bevor sie aus dem Organbett freigelegt werden konnte. Nach Setzen einer Ligatur kurz oberhalb des Abgangs der A. renalis sinistra wurde die linke Niere, analog zum Prozedere bei der scheinoperierten Maus, über die caudale Bauchaorta mit einem Polyethylenschlauch (Außen-Ø 0.61 mm, Innen-Ø 0.28 mm) kanüliert und an einer von zwei bipolaren Platinelektroden angebracht. Der Zufluss der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung wurde auch hier weiter über den Polyethylenschlauch sichergestellt. Die Niere wurde anschließend in eine beheizte Glaskammer (37°C) gehängt.

## 2.5 Quantitative Bestimmung des Neurotransmitters

### Noradrenalin

Am Modell der isoliert perfundierten Mausniere wurde die NA-Freisetzung, die durch eine renale nervale Stimulation oder durch die Zugabe von Antagonisten und Agonisten induziert wurde, bestimmt. Zur Quantifizierung verwendet wurde die „High Pressure Liquid Chromatography“ (HPLC).

#### 2.5.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Nach jeder Präparation wurde zunächst ein Nierenfunktionstest durchgeführt, um die regelrechte Funktion der präparierten Niere zu testen. Dieser sah eine Probestimulation mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA) und nach einer Pause von 15 min, in der sich die Nieren stabilisieren konnten, die Gabe einer Bolusinjektion von 60 mM KCl über einen Perfusor (Harvard Pump 11 Plus Dual Syringe) vor. Sobald die durch KCl ausgelöste Maximalkontraktion erreicht war, wurde der Perfusor gestoppt. Anschließend wurde 15 min bis zur Stabilisierung des Systems gewartet.

Danach wurden Kokain (10 µM) und Kortikosteron (20 µM) als Reuptake-Hemmer in die Perfusionslösung hinzu gegeben, um die neuronale und extraneuronale Wiederaufnahme von freigesetztem NA zu verhindern. Nach 20 min Einlaufzeit konnte mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden, dessen Ablauf ein jeweiliges Versuchsprotokoll vorgab. Die Eluate in je dreiminütigen Fraktionen wurden in kleinen Probenkontainern aufgefangen. Zu Beginn wurde bei jedem Experiment jeweils eine 3

Minuten Fraktion als Recovery und die nachfolgende Fraktion als Leerwert gesammelt.

### 2.5.2 Versuchsprotokolle der Noradrenalinbestimmung

**Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation mit 1-15 Hz:** Bei diesem Versuch erfolgten nacheinander renale Nervenstimulationen (RNS) mit den Frequenzen 1, 2, 5, 7.5, 10 und 15 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA). Nach jeder Stimulation wurden zwei Fraktionen à drei Minuten des Nierenperfundats gesammelt. Der nächsten Stimulation ging eine Pause von 3 Minuten voraus. Die Messung erfolgte über das Laboratorium Eberhard in Dortmund. Die Proben der 1 und 2 Hz Stimulationen mussten aus organisatorischen Gründen verworfen werden. Die Ergebnisse der Messungen wurden in pg/g Niere angegeben.

**Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation mit 5 Hz unter Einfluss von Phentolamin:** Die Versuchsdurchführung beinhaltete sechs renale Nervenstimulationen ( $S_0$ - $S_5$ ) mit einer Frequenz von jeweils 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA). Über einen Perfusor (Harvard Pump 11 Plus Dual Syringe) wurden die Stimulationen  $S_1$ - $S_5$  in aufsteigender Konzentration (0.01, 0.03, 0.1, 0.3 und 1  $\mu$ M) mit dem unselektiven  $\alpha$ -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin (-Hydrochlorid, Sigma) bei einer konstanten Flußrate von 0.158 ml/min unterspült. Das Perfusionsintervall von Phentolamin reichte von 5 min vor bis 1 min nach der renalen Nervenstimulation. Das Nierenperfundat wurde auch hier wieder in 2 Fraktionen à drei Minuten nach jeder RNS aufgefangen. Gemessen wurde der NA Ausscheidung mittels HPLC und angegeben in pg/g Niere.

**Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation mit 5 Hz unter Einfluss von Angiotensin II:** Die experimentelle Versuchsdurchführung sah fünf renale Nervenstimulationen ( $S_0$ - $S_4$ ) mit einer Frequenz von jeweils 5 Hz (30 s, 1 ms Pulsbreite, 40 mA) vor. In aufsteigender Konzentration (11, 10, 9 und 8 -log mol/l) wurde Angiotensin II (Sigma) über einen Perfusor (Harvard Pump 11 Plus Dual Syringe) mit einer konstanten Flußrate von 0.158 ml/min appliziert. Das Perfusionsintervall von Angiotensin II reichte von 5 min vor bis 1 min nach der renalen Nervenstimulation.

**Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation mit 5 Hz als Kontrolle:** Die Versuchsdurchführung entsprach den Versuchsprotokollen „Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation mit 5 Hz unter Einfluss von Phentolamin bzw. Angio-

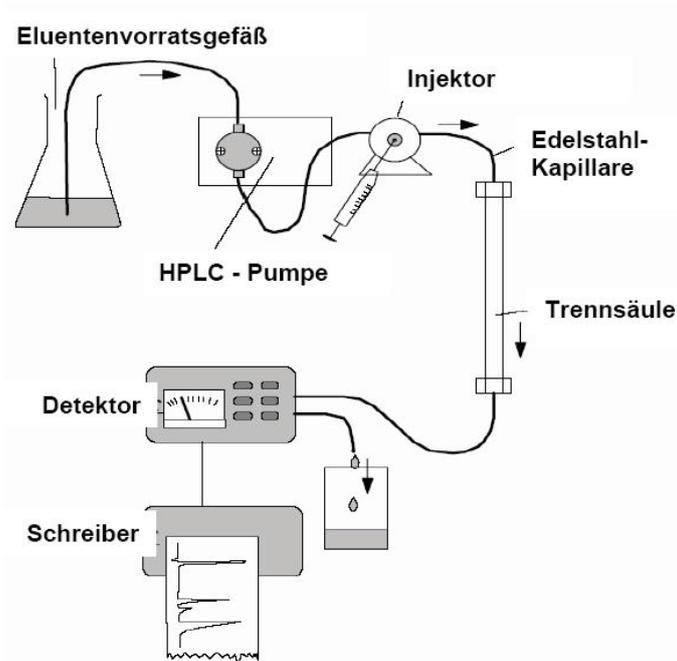
tensin II“. Nur fanden die renalen Nervenstimulationen ( $S_0$ - $S_4$  bzw.  $S_0$ - $S_5$ ) mit 5 Hz jeweils ohne Applikation von Phentolamin oder Angiotensin II statt.

**Bestimmung des Noradrenalin-Reuptakes:** Das Nierenperfundat wurde nach der einmaligen renalen Nervenstimulation mit 5 Hz ( $S_0$ ), die im Rahmen des Nierenfunktionstests durchgeführt wurde, in 2 Fraktionen à drei Minuten aufgefangen (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA) und der Nierenfunktionstest, wie oben beschrieben, fortgesetzt. Nach Stabilisierung des Systems wurden die Reutake-Hemmer Kokain ( $10 \mu\text{M}$ ) und Kortikosteron ( $20 \mu\text{M}$ ) hinzugegeben. Nach einer Einlaufzeit von 20 min sah die Versuchsdurchführung eine erneute renale Stimulation mit 5 Hz ( $S_1$ ) vor, worauf das Nierenperfundat erneut in 2 Fraktionen à drei Minuten gesammelt wurde. Der Noradrenalin-Reuptake errechnete sich aus  $S_1/S_0 \cdot 100$ .

### 2.5.3 Probenaufbereitung

Um sowohl die Reinheit als auch die Effizienz der Probenaufbereitung überprüfen zu können, wurden für jedes Experiment zusätzlich zu den gesammelten Fraktionen je zwei Proben aufbereitet, die nur Krebs-Henseleit-Lösung (Prä-Wert), beziehungsweise die zweite Probe 1000 pg Noradrenalin-HCl (Recoveries) und 600 pg DHBA (Chromsystems, DHBA,  $12 \text{ pg}/\mu\text{l}$ ) als interner Standard enthielten. Zur Noradrenalin-stabilisierung wurde jede Probe mit  $125 \mu\text{l}$  HCl (1 M),  $10 \mu\text{l}$  EDTA (0.067 M) und  $2.5 \mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$  versetzt und nach dem Aufsammeln des Eluats mit einem Tris-Puffer (1 M, pH 10) auf pH 8.4 eingestellt. Nach Zugabe von 50 mg  $\text{Al}_2\text{O}_3$  wurden die Proben zur quantitativen Adsorption des Noradrenalins 35 min lang umgeschüttelt. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, konnte das an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Recipe, München) absorbierte Noradrenalin mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  in mit Mikrofiltern (Glasfaser, Whatman, Maidstone, GB) vorbereitete Glasröhrchen überführt werden. Das  $\text{Al}_2\text{O}_3$  wurde noch zweimal mit jeweils 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, welches nach weiteren Zentrifugierschritten verworfen wurde. Das Noradrenalin wurde letztlich mit zunächst  $150 \mu\text{l}$  und schließlich  $100 \mu\text{l}$  Perchlorsäure (0.1 M) desorbiert. Von diesen  $250 \mu\text{l}$  wurde ein  $125 \mu\text{l}$  Aliquot auf eine HPLC-Säule computergesteuert injiziert und das darin enthaltene Noradrenalin detektiert. Das HPLC-System bestand aus einer Pumpe (Waters 600 Controller), einem automatischen Injektor (Waters 717 plus Autosampler), einem Detektor (Waters 460 Electrochemical Detector), einer Vorsäule (Waters Guard-Pack, Reslove<sup>TM</sup> C18), und einer Säule (WiCom, Prontosil, 120-5- C18 AQ  $5,0 \mu\text{m}$ ). Die mobile Phase wurde

vor jedem Probendurchlauf entgast, filtriert und anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/min durch das HPLC-System gepumpt. Sie enthielt  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (15 mM), Citronensäure (30 mM),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (2 mM), (-)Natriumoctylsulfonat (2.77 mM) und Methanol 12% (V/V). Der pH-Wert der mobilen Phase wurde mit NaOH (10 M) auf pH 6.5 eingestellt. Der Noradrenalinegehalt des Eluats wurde mit einem Detektor (Waters 460 Electrochemical Detector) bei einem Arbeitspotential von 0.4 V bestimmt (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3:** Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau einer HPLC. Das Probeneluat wird aus speziellen Vorratsgefäßen über eine Pumpe mit der Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min zu einem Injektor gefördert, welcher 125  $\mu\text{l}$  der Probe über eine Trennsäule leitet. Die mit einem Detektor gemessene NA-Konzentration wird dann mittels eines Schreibers dargestellt.

#### 2.5.4 Auswertung der Noradrenalinfreisetzung

Die stimulationsinduzierte NA-Freisetzung in jeder Probe wurde anhand einer Noradrenalineichgeraden (0-37.5-75-187.5-375-750 pg NA / 125  $\mu\text{l}$  Perchlorsäure ( $\text{HClO}_4$ ) und jeweils 600 pg DHBA / 125  $\mu\text{l}$  Perchlorsäure), die für jeden Probendurchlauf neu erstellt wurde, berechnet (und mit den Wiederfindungsraten (Recoveries) des entsprechenden Experiments korrigiert. Zudem wurde jede Probe auf den internen Standard bezogen und somit Schwankungen, die innerhalb der Probenaufbereitung auftreten

können, ausgeglichen.) Letztendlich wurde die freigesetzte Menge von Noradrenalin auf das Feuchtgewicht der jeweils untersuchten Niere bezogen und pro Stimulationsphase in pg/g Niere angegeben. Anschließend wurde das Ergebnis noch verdoppelt, da nur die Hälfte des bei der Probenaufbereitung gewonnenen Eluats gemessen wurde. Es konnte auf Grund der unterschiedlich großen, tierindividuellen Freisetzung von NA zu Schwankungen bei den Noradrenalinabsolutwerten kommen. Um die Werte besser miteinander vergleichen zu können, wurden sie in manchen Versuchen auf eine interne Kontrolle bezogen.  $S_0$  diente in diesen Fällen deshalb als Kontrollstimulation, auf die die stimulationsinduzierte Noradrenalinfreisetzung in Prozent bezogen wurde ( $S_n/S_0 \cdot 100$ ). Auf diese Weise konnten auch substanzabhängige Dosiswirkungskurven (DWK) für die NA Freisetzung nach Stimulation oder Wirkstoffbeigabe ermittelt werden, die in % von  $S_0$  angegeben wurden.

## 2.6 Bestimmung der renalen Druckantwort

Am Modell der isoliert perfundierten Mausniere (Abbildung 2.2) ließ sich auch die renale Druckantwort, die durch unterschiedliche Stimulationsfrequenzen erzeugt wurde, bestimmen. Zur Ermittlung wurde ein MLT844 Physiological Pressure Transducer (ADInstruments) verwendet, der mit einem PC-System verbunden war. Die renalen Widerstände wurden mit der Software Chart 5 für Windows (ADInstruments) aufgezeichnet.

### 2.6.1 Versuchsprotokolle

**Stimulation renaler Nerven mit 1-15 Hz:** Die Nieren wurden mit einem jeweils dazwischen liegenden Intervall von 9 min mit 2, 5, 7.5, 10 und 15 Hz stimuliert. Die darauf erfolgte Druckantwort wurde durchgehend aufgenommen. Die renale Druckantwort auf diese Stimulationsreihe errechnete sich aus dem maximalen Druckanstieg des Perfusionsdruckes über den basalen Perfusionsdruck ( $\Delta P_{max} = P_{max} - P_{basal}$ ). Die gemessene Erhöhung wurde dann wie zuvor in % von KCl angegeben.

## 2.7 Blutdruck- und Herzfrequenzmessung

Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden mit der Methode der Schwanzmanschetten-Plethysmographie (Softron BP-98A; Softron, Tokyo, Japan) ermittelt.

Dafür wurde die Maus in ein Leinentuch eingewickelt und in eine Heizspirale gesetzt. Der Schwanz wurde durch die Schwanzmanschette gezogen. Es erfolgten an 5 aufeinander folgenden Tagen 10 Messzyklen, denen jeweils eine kurze Trainingsphase vorausging. Die an den 5 Messtagen mit den 10 Messzyklen ermittelten systolischen Blutdrücke und Herzfrequenzen wurden gemittelt. Gemessen wurde kurz vor und 4 Wochen nach subtotaler Nephrektomie.

## 2.8 Serumparameter

Die Narkose zur Blutentnahme erfolgte in Inhalationsnarkose mit Isofluran. Der Kopf der Tiere wurde mit Daumen und Zeigefinger fixiert und durch einen leichten Druck auf die Gegenseite des Bulbus aus seiner Höhle hervorgehoben. Mit der Pasteurpipette (lang, 230 mm, Assistent), an deren Spitze man einen kleinen Tropfen Heparin (Liquemin N 25000, Roche, Germany) applizierte, wurde nun in den medialen Augenwinkel eingegangen und der retroperitoneale Venenplexus durchstoßen. Durch waagrechtes Halten der Pipette füllte sich diese nun mit Blut, welches dann in ein 1.5-ml-Eppendorfgefäß, in dem sich ein Tröpfchen Heparin befand, entleert wurde. Die Tubes wurden gekühlt auf Eis aufbewahrt. Etwa 0.4 ml Blut wurden so pro Tier entnommen. Nach Zentrifugation der abgestandenen Blutprobe in dem 1.5-ml-Eppendorfgefäß für 10 min bei 4°C und 3000 U/min wurde das überstehende Plasma entnommen und für die Bestimmung von Kreatinin, Harnstoff,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  Parameter und Normetanephrin verwendet. Die Untersuchung des Serums wurde im Routinelabor des Marienhospitals Herne in einem ILab 600, Hitado (Instrumental Laboratories) und im Laboratorium Eberhard durchgeführt.

## 2.9 Urinparameter

Die Uringewinnung erfolgte durch metabolische Käfige (Tecniplast GmbH). Der Beobachtungszeitraum betrug 60 Tage. Die Ermittlung der Urinparameter erfolgte 5, 10, 17, 24, 31, 42 und 58 Tage nach der subtotalen Nephrektomie. Da insbesondere für die subtotal nephrektomierten Mäuse (SNx) die Zeit im metabolischen Käfig einen erheblichen Stressor darstellte, wurde die Urinsammelzeit von üblicherweise 24 auf 12 Stunden (h) reduziert. Um die Versuchsvoraussetzungen zu egalisieren, wurde immer das gleiche 12h-Intervall gewählt: über Nacht von abends 20:30 bis 08:30 Uhr morgens

des folgenden Tages.

Nach Beendigung der Sammelzeit wurde die Menge des gesammelten Urins bestimmt und der Urin 10 min bei 4°C und 3800 Umdrehungen zentrifugiert. Falls die Sammelmenge ausreichend war, wurden 0.5 ml des Überstands abpipettiert. Die Messung erfolgte anschließend im Zentrallabor des Marienhospital Herne. Neben Mikroalbumin wurde der Urin auf Kreatinin, als interner Standard, Gesamteiweiß und Harnstoff untersucht.

## 2.10 Noradrenalin-Konzentration im Gewebe

Die Konzentration von Noradrenalin im Gewebe wurde anhand des Überstandes von gesamten Herz- und Nierenhomogenaten bestimmt. Gewebeproben wurden in 0.1 M Natriumphosphat (pH 7.4) auf Eis homogenisiert, kleine Probestückchen wurden zur Proteinbestimmung entfernt. Nach Hinzufügen von Perchlorsäure (0.6 M Finalkonzentration) wurden die Proben bei 10,000g und 4°C 15 min zentrifugiert. Die Überstände, die sich daraus ergaben, wurden, wie unter Abschnitt 2.5.3 beschrieben, aufbereitet und mittels HPLC analysiert.

## 2.11 Real-Time-quantitative (RTq)-PCR

RNA wurde aus Nierengewebe von WT-FVB- und  $\alpha_{2A}$ -KO-Mäusen mit RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) isoliert. Die gewonnene RNA wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) in die cDNA umgeschrieben. Für die RTq-PCR kam ein 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) unter Verwendung von TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) zum Einsatz. Die Realtime-PCR wurde entsprechend des Assay-Protokolls durchgeführt.

### Primer

- Mm99999915\_g1 (Gapdh)
- Mm\_6530404N21Rik\_1\_SG (Renalase)
- Mm\_Adra2\_I\_SG ( $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor)
- Mm\_Adra2b\_1\_SG ( $\alpha_{2B}$ -Adrenozeptor)

- Mm\_Adra2c\_vb\_1\_SG ( $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptor)

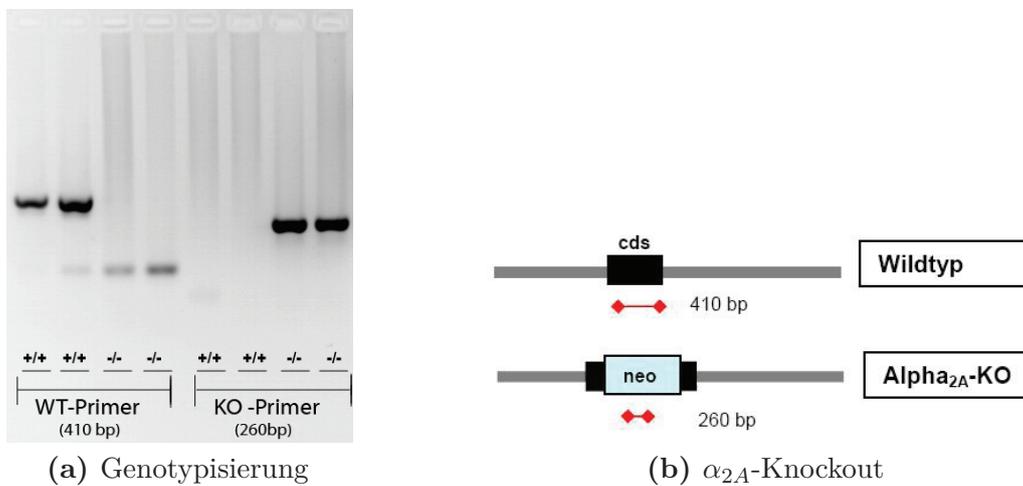
## 2.12 Statistik

Die Anzahl der Experimente pro Gruppe ist mit n aufgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden bei allen Tiergruppen die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet. Mit Hilfe des Computerprogramms SigmaPlot (Systat Software Inc., Point Richmond, USA) wurden durch ungepaarten Student's T-Test Signifikanzen ermittelt. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  galten als signifikant. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch die Bildung von homogenen Gruppen. Die Anzahl der Experimente steht für die Anzahl der einzelnen Nieren.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Charakterisierung des Genotyps

Der C57/Bl6-Wildtyp war nicht geeignet für das Modell der 5/6 Nephrektomie, weil dieser Mausstamm protektive Faktoren für die Entwicklung einer Glomerulosklerose besitzt [29]. Deshalb wurde der  $\alpha_{2A}$ -Knockout des C57/Bl6-Stammes auf den Hintergrund des sensiblen FVB-Wildtyps rückgekreuzt. Um eine gute genomische Homogenität der Rückkreuzung zu erreichen, wurden sechs Rückkreuzungen durchgeführt [30]. Als Kontrolle der Rückzuchten wurden Genotypisierungen mittels PCR aus cDNA von Schwanzbiopsien durchgeführt. Abbildung 3.1 (a) zeigt die Genotypisierung nach sechs Kreuzungen, die die  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout FVB-Linie eindeutig charakterisiert.

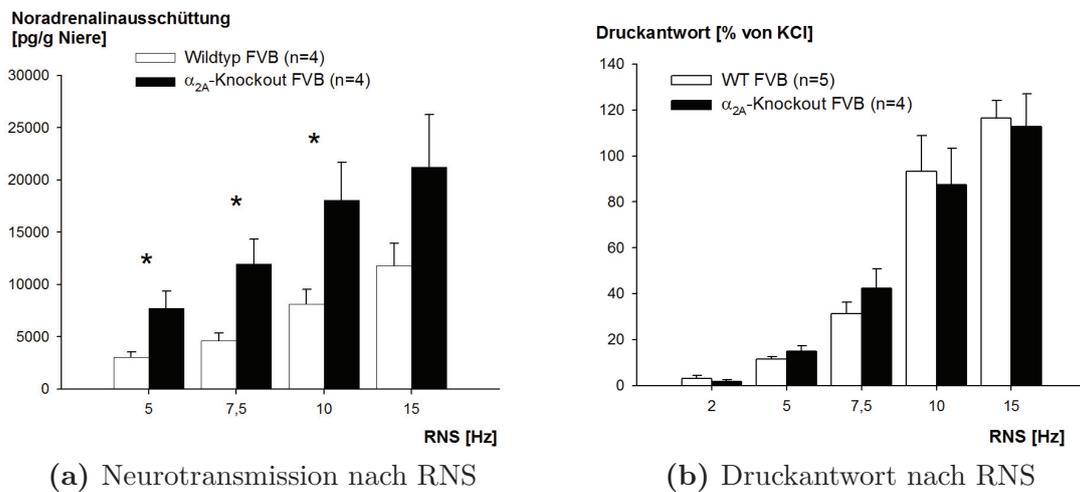


**Abbildung 3.1:** (a) Genotypisierung aus Schwanzzell-DNA mittels Multiplex-PCR. Die obere 410 bp lange Bande entspricht dem Wildtyp-Allel, die untere 260 bp lange Bande dem KO-Allel. (b) Schematische Darstellung der Primärlokalisierung bei der Multiplex-PCR (c<sub>ds</sub> =  $\alpha_{2A}$ -coding-sequence; bp = base pairs; neo = Neomycin-Resistenzkassette)

## 3.2 Charakterisierung des Phänotyps

### 3.2.1 Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation mit 1-15 Hz

Untersucht wurde hier die präsynaptische Transmitterfreisetzung nach renaler Nervenstimulation (RNS). Die durch RNS elektrisch induzierte NA-Ausschüttung stieg mit Zunahme der Stimulationsfrequenz in beiden Mausarten abhängig von der Frequenzhöhe an. Die Noradrenalinfreisetzung in der Knockout-Maus war im Vergleich zum Wildtyp bei den Stimulationsfrequenzen 5, 7.5, 10 Hz signifikant und bei 15 Hz deutlich höher (Abbildung 3.2 (a)).



**Abbildung 3.2:** NA-Ausschüttung nach renaler Nervenstimulation bei Wildtyp- und  $\alpha_{2A}$ -KO-Mäusen. NA-Ausschüttung wurde mittels HPLC gemessen und in pg/g Niere angegeben. \* $P < 0.05$  zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und KO Maus an (a). Die elektrisch induzierte Druckantwort der Wildtyp-Mäuse wird mit der der  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout-Mäuse verglichen. Druckveränderungen bei beiden Mausstämmen wurden in % von KCl angegeben (b).

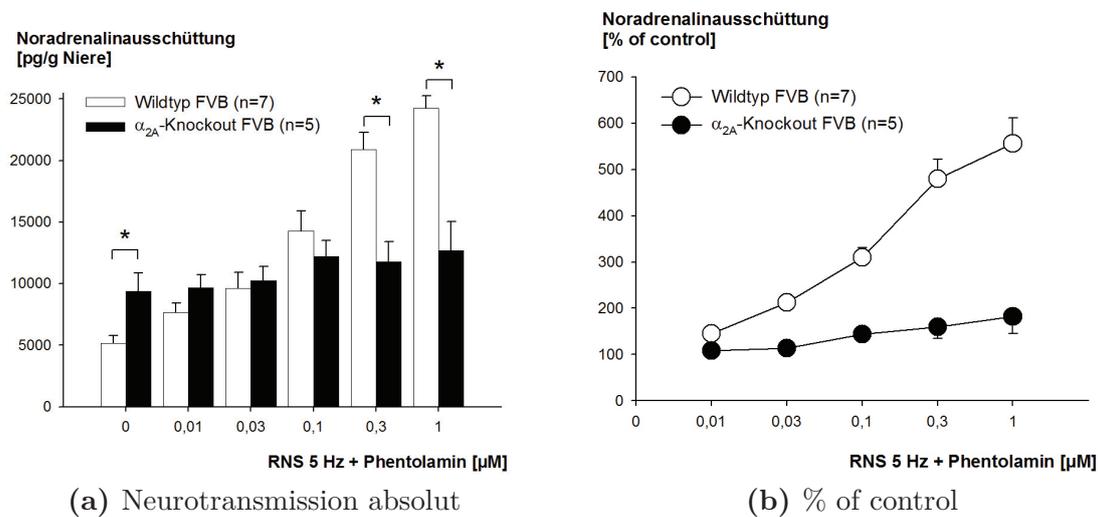
### 3.2.2 Untersuchung der renalen Druckantwort

Bestimmt wurde bei diesen Experimenten die renale Druckantwort bei isoliert perfundierten Nieren von Wildtyp- und Knockout-Mäusen nach renaler Nervenstimulation mit den Stimulationsfrequenzen 2, 5, 7.5, 10 und 15 Hz. Die durch RNS induzierte Druckantwort der Nieren stieg abhängig von der steigenden Frequenz bei beiden Maustypen an. Anders als bei der Noradrenalinfreisetzung zeigte sich in allen Fre-

quenzbereichen kein signifikanter Unterschied der Druckausschläge nach RNS bei  $\alpha_{2A}$ -AR-KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.2 (b)).

### 3.2.3 Neurotransmission nach $\alpha_2$ -Adrenozeptorblockade

Nieren von  $\alpha_{2A}$ -KO- und Wildtyp-Mäusen wurden unter Applikation des unselektiven  $\alpha_2$ -Adrenorezeptorblockers Phentolamin in aufsteigender Konzentration (0-1  $\mu\text{M}$ ) in Reihe ( $S_0$ - $S_5$ ) mit 5 Hz elektrisch stimuliert (RNS). Phentolamin verstärkte die RNS (5 Hz-) induzierte renale NA-Ausschüttung im Wildtyp konzentrationsabhängig. Bei den Knockout-Mäusen hingegen führte Phentolamin zu keiner signifikanten Steigerung.



**Abbildung 3.3:** Nieren von  $\alpha_{2A}$ -KO- und Wildtyp-Mäusen wurden in Anwesenheit von Phentolamin in Reihe ( $S_0$ - $S_5$ ) mit 5 Hz elektrisch stimuliert (RNS). Die Gabe des unselektiven  $\alpha_2$ -Adrenorezeptorblockers erfolgte in aufsteigender Konzentration (0-1  $\mu\text{M}$ ). NA-Ausschüttung wurde mittels HPLC gemessen und in pg/g Niere angegeben. \* $P < 0.05$  zeigt den signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und KO-Maus (a). Steigerung der NA-Ausschüttung, bezogen auf  $S_0$  (0  $\mu\text{M}$  Phentolamin) unter Berücksichtigung der Kontrolle (sechs renale Nervenstimulationen in Folge ohne Anwesenheit von Phentolamin) ( $(S_n/S_0)/S_{Kontrolle} * 100$ ). NA-Ausschüttung wurde in % Kontrolle angegeben (b).

Ohne Phentolaminapplikation ( $S_0$  - 0  $\mu\text{M}$ ) war die NA-Ausschüttung in der Knockout-Maus signifikant (\* $P < 0.05$ ) höher als bei dem Wildtyp. Mit aufsteigender Konzentrationsreihe von Phentolamin erreichte der Wildtyp das Basalniveau der KO-Maus (NA-Freisetzung nach RNS ohne Einwirkung von Phentolamin) und setzte bei 0,3 und 1  $\mu\text{M}$  des  $\alpha$ -Adrenorezeptorblockers signifikant (\* $P < 0.05$ ) mehr Noradrenalin frei.

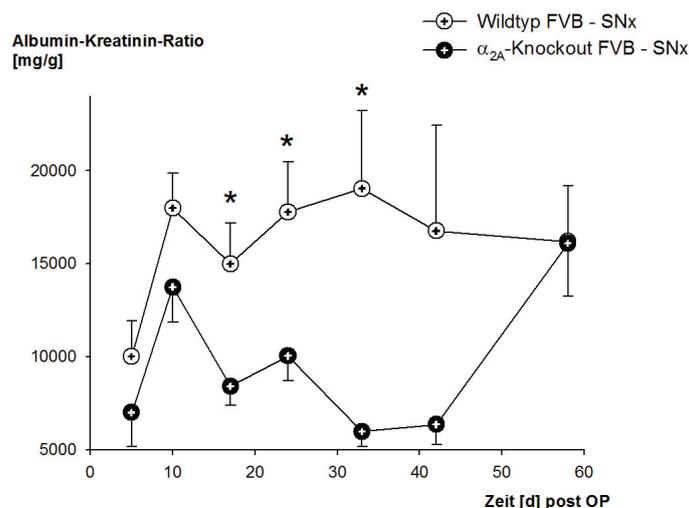
Unabhängig von den Experimenten mit aufsteigender Phentolaminapplikation wurden Nieren von Knockout- und Wildtyp-Mäusen in Reihe mit 5 Hz ohne Phentolamin-gabe stimuliert (die Daten sind hier nicht gezeigt; es ergaben sich keine signifikanten Änderungen über S<sub>1</sub>-S<sub>5</sub>). Diese Kontrollstimulationen dienten der Überprüfung, inwiefern der Zeitpunkt der Stimulation Einfluss auf die NA-Ausscheidung hat, und wurden bei der Berechnung von „% of control“ berücksichtigt (Abbildung 3.3 (b)). Die NA-Ausscheidung stieg bei der Wildtyp-Maus um  $556.0 \pm 55.4$  % Kontrolle (S<sub>5</sub> - 1  $\mu$ M Phentolamin) an. Somit steigerte der  $\alpha$ -Adrenozeptorblocker die NA-Ausschüttung im Wildtyp signifikant (\*P<0.05) um das 5,5-Fache. Bei der transgenen Maus war lediglich ein Zuwachs um  $182.1 \pm 36.5$  % Kontrolle zu verzeichnen.

### 3.3 Subtotal nephrektomierte Wildtyp- und Knockout- Maus im Vergleich

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Sympathikusüberaktivität [ $\alpha_{2A}$ -Rezeptor-Knockout] nach subtotaler Nephrektomie (SNx) und Induktion einer chronischen Niereninsuffizienz auf deren Progression auswirkt. Entgegen den Vermutungen zeigte die Knockout-FVB-Maus überraschend einen wesentlich günstigeren Verlauf als ihr Wildtyp, was sich in der Mikroalbuminurie und in der Mortalität widerspiegelte.

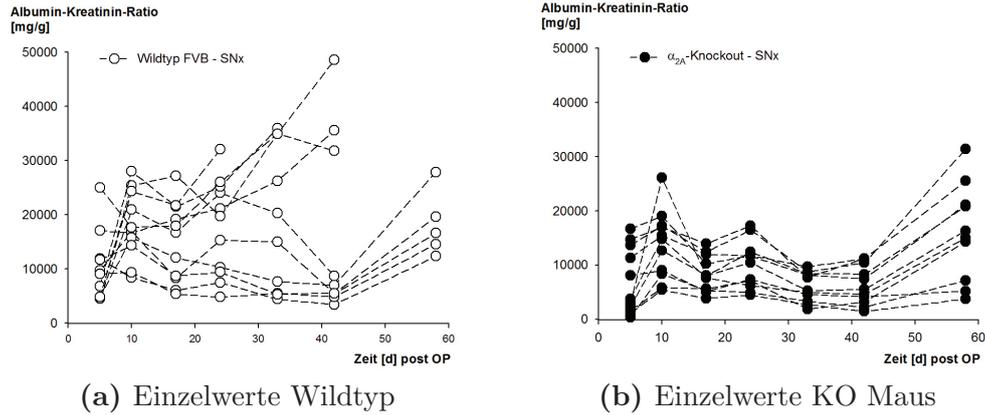
#### 3.3.1 Albumin-Kreatinin-Ratio als Verlaufspareter für die chronische Nierenerkrankung

Das Auftreten einer Albuminurie ist ein früher und sensitiver Marker der glomerulären Schädigung und stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung und Progression kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen dar.



**Abbildung 3.4:** Gegenüberstellung der Mikroalbuminurie im zeitlichen Verlauf von Wildtyp (n=11) und  $\alpha_{2A}$ -KO-Maus (n=11) nach subtotaler Nephrektomie. Der Urin wurde im Stoffwechsellkäfig gesammelt und die Urinparameter im Zentrallabor des Marienhospital Herne bestimmt. Ausgedrückt wurde die Mikroalbuminurie mit dem Albumin/Kreatinin-Quotienten [mg/g]. \*P<0.05 zeigt den signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und KO-Maus.

Als aussagekräftigen Verlaufspareter zur Untersuchung der Mikroalbuminurie und der Progression der induzierten Niereninsuffizienz wurde die Albumin-Kreatinin-



**Abbildung 3.5:** Darstellung der Einzelwerte der ACR von WT- und KO-Mäusen

Ratio (ACR) bei beiden Gruppen herangezogen. Die Bestimmung der ACR gilt als verlässlicher Parameter zur Abschätzung der Albuminurie. Der Effekt des Urinvolumens und einer damit verbundenen Verdünnung bis eventuell Polyurie kann durch die ACR vermieden werden.

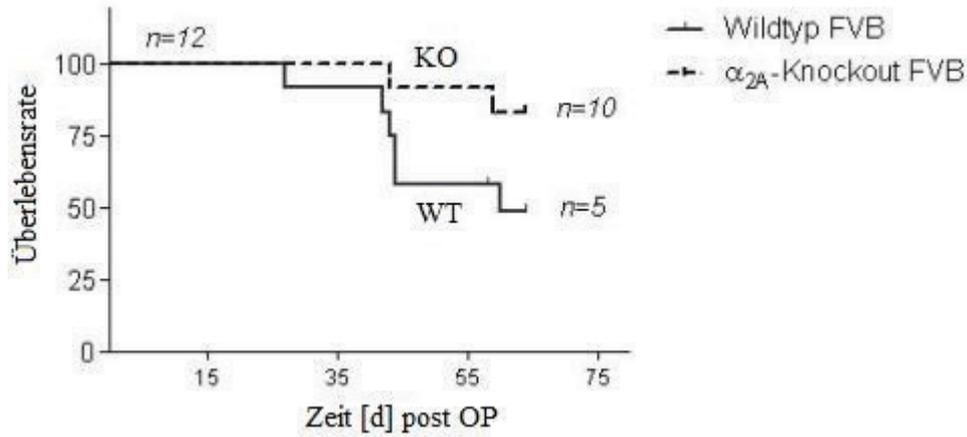
Die engmaschigen Kontrollen führten zu dem Ergebnis, dass die Wildtyp-FVB-Maus im Vergleich zu der  $\alpha_{2A}$ -KO-Maus von einer ausgeprägteren Mikroalbuminurie betroffen war (Abbildung 3.4). 17, 24 und 31 Tage nach subtotaler Nephrektomie unterschied sich die Albumin-Kreatinin-Ratio des Wildtyps signifikant von der der Knockout-Maus. Der Abfall der Mikroalbuminurie nach 30 Tagen bei der nephrektomierten Wildtyp-Maus ergab sich durch Präselektion durch eine hohe Mortalität (siehe Abbildung 3.6). So überlebten nur die Tiere mit der initial geringeren Albuminurie. Die Albumin-Kreatinin-Ratio der  $\alpha_{2A}$ -KO-Maus stieg nach 40d zunehmend an und somit kommt es zu einer Annäherung der beiden Kurven im weiteren Verlauf.

Eine detaillierte Übersicht der individuellen postoperativen Verläufe von Wildtyp- und  $\alpha_{2A}$ -Knockout-Tieren gibt Abbildung 3.5.

#### 3.3.2 Postoperative Überlebensanalyse

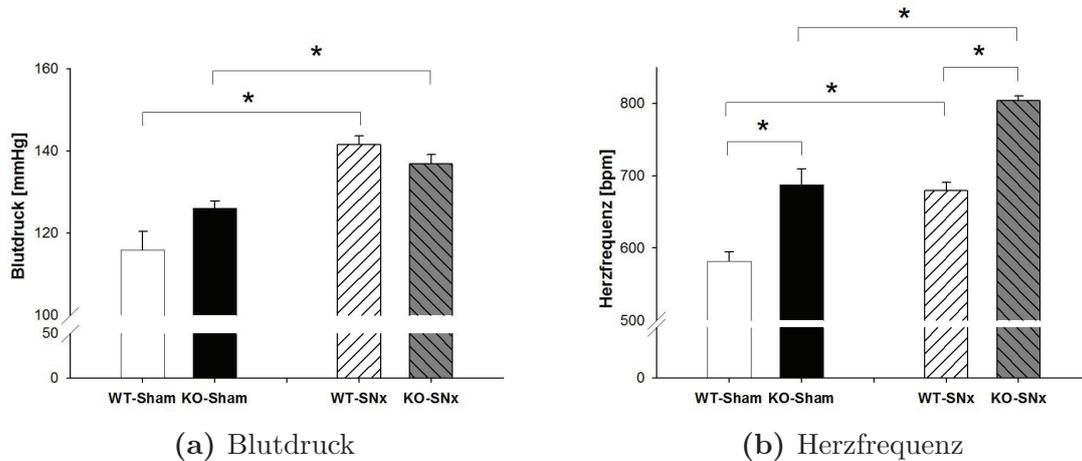
Verglichen wurde die postoperative Überlebensrate subtotal nephrektomierter Wildtyp- und Knockout-Mäuse in einem Untersuchungszeitraum von 60 Tagen. Bei einer anfänglichen Gruppenstärke von jeweils  $n=12$  Mäusen ergab sich das in der Abbildung 3.6 ersichtliche Diagramm. Der ausgeprägteren Mikroalbuminurie entsprechend war der

Wildtyp auch von einer höheren Mortalität betroffen. Bis 60 Tage nach der subtotalen Nephrektomie hatte sich die Gruppenstärke des Wildtyps bis auf n=5 reduziert, wohingegen die Gruppenstärke der KO-Maus noch n=10 betrug.



**Abbildung 3.6:** Überlebensanalyse nephrektomierter WT- und  $\alpha_{2A}$ -KO-Mäuse Tag 1-60

### 3.3.3 Einfluss der subtotalen Nephrektomie auf Blutdruck und Puls



**Abbildung 3.7:** Einfluss des  $\alpha_{2A}$ -KOs und der subtotalen Nephrektomie auf den Blutdruck (a). Einfluss des  $\alpha_{2A}$ -KOs und der subtotalen Nephrektomie auf die Herzfrequenz (b). WT-Sham/KO-Sham jeweils n=5, WT-OP/KO-OP jeweils n=12 (a)+(b).

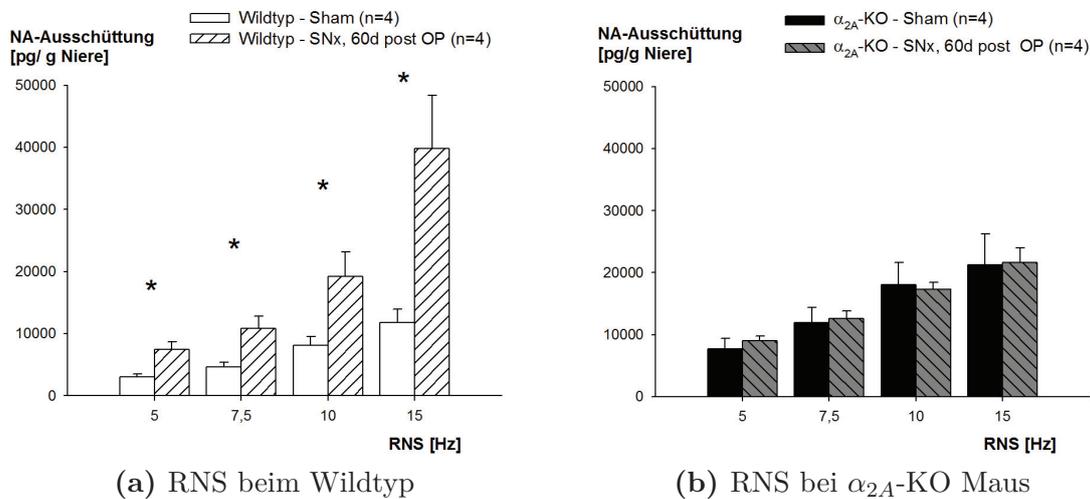
Der systolische Basisblutdruck in der KO-Maus unterschied sich geringfügig, jedoch nicht signifikant von dem der WT-Maus (WT,  $116 \pm 10.1 \text{ min}^{-1}$ ; KO,  $128 \pm 4.1$

min<sup>-1</sup>), die Herzfrequenz hingegen war in dem KO-Tier signifikant höher. Als Folge der subtotalen Nephrektomie WT- und KO-Maus entwickelten beide einen erhöhten Blutdruck (WT, 142 ± 7.3 min<sup>-1</sup>; KO, 137 ± 8.0 min<sup>-1</sup>). Auch die Herzfrequenz stieg nach SNx bei WT- und KO-Mäusen signifikant an, wobei sie auch nach Nephrektomie in der KO-Maus signifikant höher war.

### 3.4 Präsynaptische Neurotransmission nach subtotaler Nephrektomie

Eine zentrale Frage dieser Experimente war, welchen Einfluss die subtotale Nephrektomie auf die neuronale Transmitterfreisetzung hat.

Die vorliegenden Ergebnisse von Stimulationsversuchen mit subtotal nephrektomierten Mäusenieren zeigen, dass die SNx eine hohe Auswirkung auf die renale Neurotransmission im Wildtyp hatte. Wie Abbildung 3.7 (a) zeigt, ist die Noradrenalinfreisetzung aus der sympathischen Nervenendigung 60 Tage postoperativ gegenüber dem Wildtyp (Sham) bei allen Stimulationsfrequenzen signifikant erhöht.

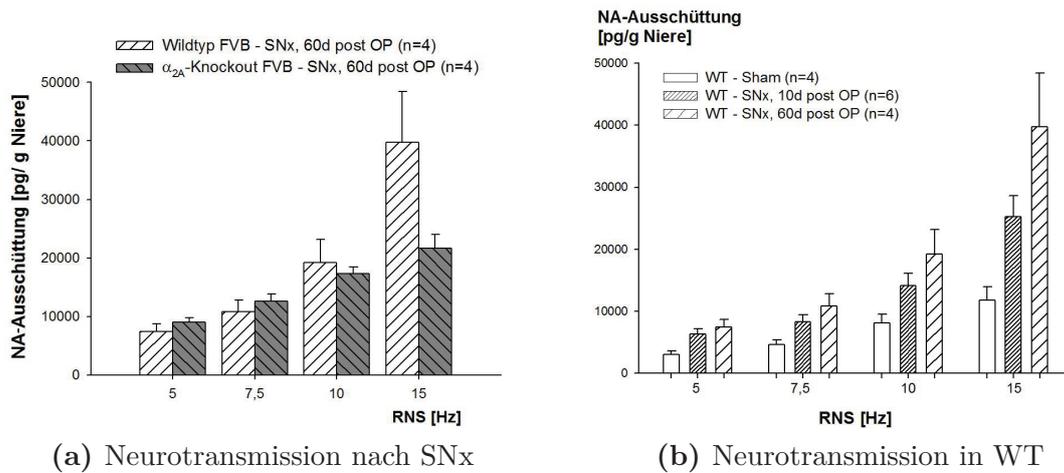


**Abbildung 3.8:** Elektrisch durch RNS induzierte NA-Ausschüttung, mittels HPLC gemessen und in pg/g Niere angegeben (a/b). Gegenüberstellung von Wildtyp-Sham und Wildtyp-SNx (a). Gegenüberstellung von KO-Sham und KO-SNx (b). \*P<0.05 zeigt einen signifikanten Unterschied

Überraschenderweise war der Unterschied in der Neurotransmission nach RNS

zwischen scheinoperierten und 5/6 nephrektomierten Knockout Mäusen hingegen unwesentlich (Abbildung 3.7 (b)). Die subtotaler Nephrektomie scheint keinen Einfluss auf die renale Noradrenalinfreisetzung nach RNS in der  $\alpha_{2A}$ -KO Maus zu haben.

60 Tage postoperativ zeigte sich, dass der Wildtyp sich der Knockout Maus bei den Stimulationsfrequenzen 5, 7.5 und 10 Hz angeglichen hatte und nach einer RNS von 15 Hz deutlich mehr NA freisetzte. Die renale Neurotransmission in der  $\alpha_{2A}$ -KO-Maus war gegenüber dem Wildtyp nicht mehr signifikant erhöht (Abbildung 3.8 (a)).



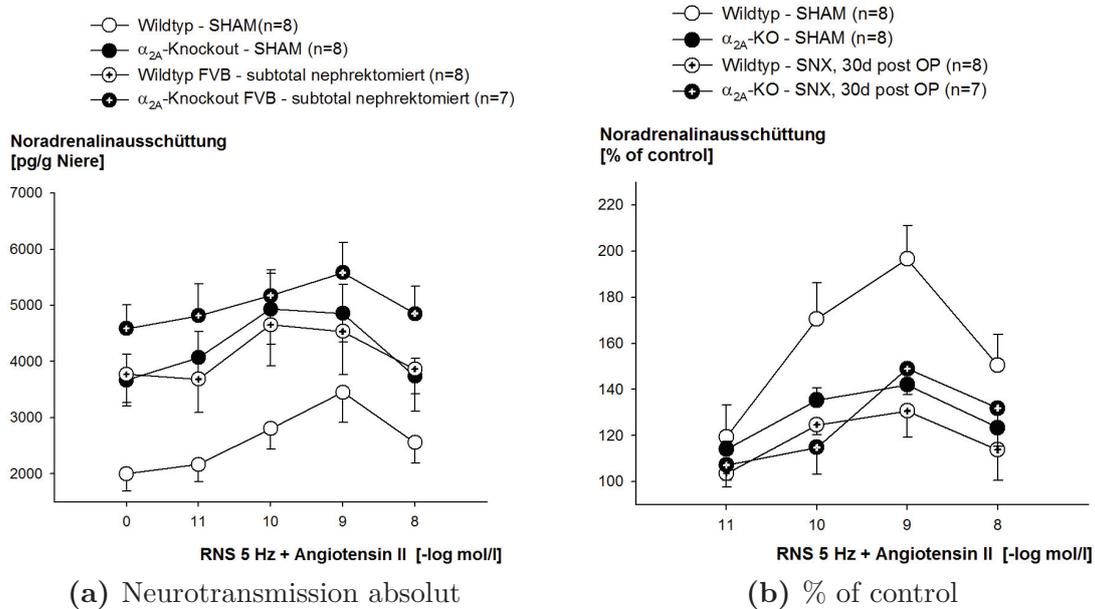
**Abbildung 3.9:** Elektrisch durch RNS induzierte NA-Ausschüttung bei WT-SNx und KO-SNx 60d postoperativ (a), bei Wildtyp-Sham, -SNx 10d postoperativ und -SNx 30d postoperativ (b). NA-Ausschüttung wurde mittels HPLC gemessen und in pg/g Niere angegeben.

### 3.4.1 Neurotransmission im Wildtyp 10 Tage postoperativ

Wie zuvor erwähnt führte die subtotaler Nephrektomie bei FVB-Wildtyp-Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der neuronalen Transmitterfreisetzung und es stellte sich die Frage, wann es nach SNx zu dieser „Aktivierung“ in der WT-Maus kommt. Versuche 10 Tage postoperativ zeigten, dass eine Erhöhung der Sympathikusaktivität bereits nach kurzer Zeit einsetzte (Abbildung 3.8 (b)).

### 3.5 Interaktionen mit RAAS

Es ist bekannt, dass Angiotensin (Ang) II die Noradrenalinfreisetzung aus terminalen Nervenendigungen bzw. Sympathikusfasern in der Niere über einen direkten positiven präsynaptischen Effekt über den Angiotensin-II-Subtyp-1 ( $AT_1$ )-Rezeptor steigert [31].



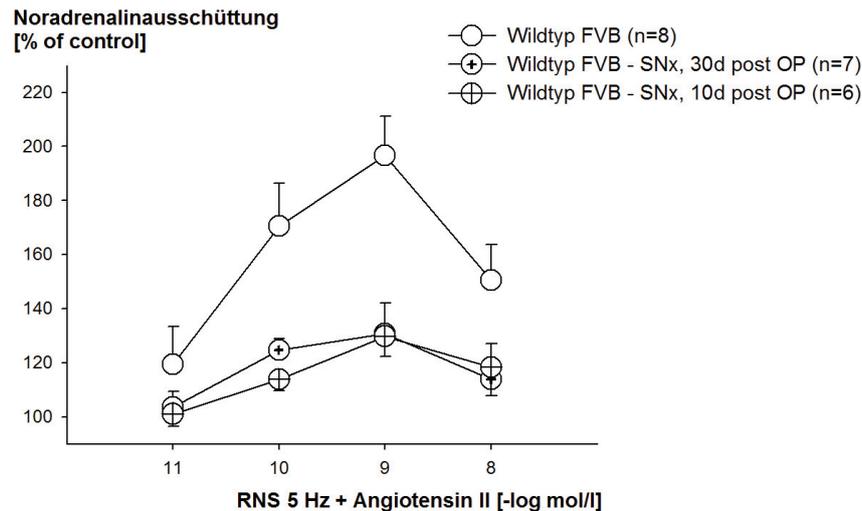
**Abbildung 3.10:** Nieren von WT-Sham, -SNx, KO-Sham und -SNx wurden in der Anwesenheit von Angiotensin II fünfmal in Reihe mit 5 Hz elektrisch stimuliert (RNS) ( $S_0$ - $S_4$ ). Die Gabe von Angiotensin II - Perfusionsintervall betrug 5 min bevor bis eine 1 min nach RNS - erfolgte in aufsteigender Konzentration (11, 10, 9 und 8 -log mol/l). NA-Ausschüttung wurde mit HPLC gemessen (a/b). Angabe der NA-Ausschüttung bei ( $S_0$ - $S_4$ ) in pg/g Niere (a). Steigerung der NA-Ausschüttung durch Ang II bezogen auf  $S_0$  ( $S_n/S_0$ ) unter Berücksichtigung der Kontrollstimulationen  $S_{Kontrolle}$  (b).

#### 3.5.1 Ang II-Einfluss auf Neurotransmission

Genau dieser Effekt konnte an isoliert perfundierten Nieren scheinoperierter Wildtyp-Mäuse beobachtet werden. Nieren wurden in der Anwesenheit von Ang II in aufsteigender Konzentration (11, 10, 9 und 8 -log mol/l) fünfmal in Reihe mit 5 Hz elektrisch stimuliert (RNS) ( $S_0$ - $S_4$ ). Die maximale durch Ang II induzierte Steigerung der NA-Ausschüttung nach RNS wurde bei einer Konzentration von 9 -log mol/l erreicht und betrug  $197.6 \pm 13.3$  % Kontrolle (Abbildung 3.9 (b)). Auch bei Knockout-Tieren

fürte die Ang II-Applikation zu einem Anstieg der renalen Noradrenalinfreisetzung, allerdings war der maximale Einfluss von Ang II bei  $\alpha_{2A}$ -KO-Mäusen nur sehr gering ( $141.9 \pm 14.5$  % Kontrolle). Bei der Konzentration von  $9$   $-\log$  mol/l war der Effekt von Ang II auf die renale NA-Freisetzung in der WT-Sham- signifikant höher als in der KO-Sham-Maus.

### 3.5.2 Ang II-Einfluss auf Neurotransmission nach SNx

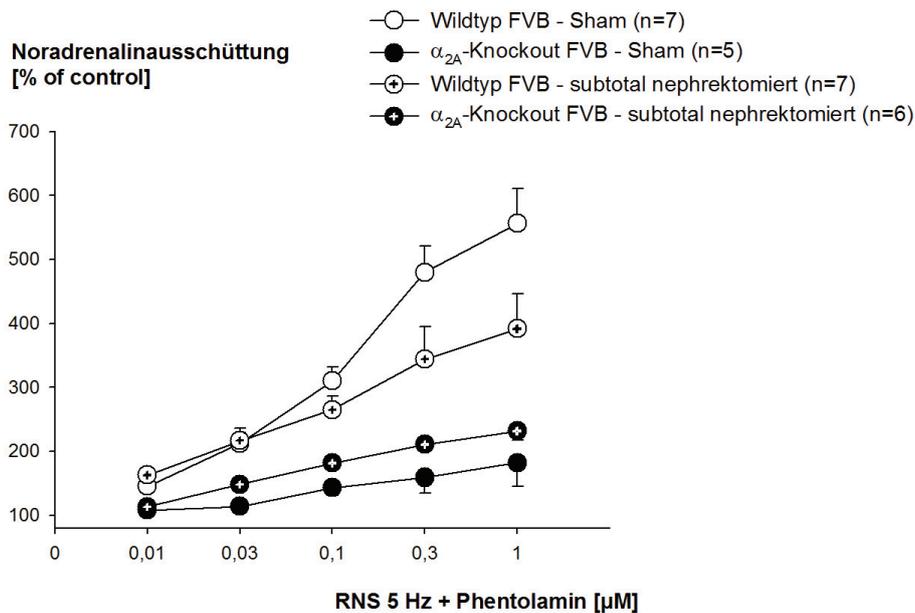


**Abbildung 3.11:** Steigerung der NA-Ausschüttung durch Ang II in WT-Sham, -SNx 10d postoperativ und -SNx 30d postoperativ, bezogen auf  $S_0$  ( $S_n/S_0$ ) unter Berücksichtigung der Kontrollstimulationen  $S_{Kontrolle}$ .

Wie die Ergebnisse zeigen, war der positive präsynaptische Effekt von Ang II auf die Noradrenalinfreisetzung 30 Tage nach subtotaler Nephrektomie bei der Wildtyp-Maus so weit abgeschwächt, dass er sich nicht mehr von dem der scheinoperierten Knockout-Maus unterschied (Abbildung 3.9 (b)). Untersuchungen folgten, die aufdeckten, dass Ang II seinen Effekt auf die NA-Freisetzung anscheinend schon kurze Zeit postoperativ, also mit Beginn der sympathischen Aktivierung, verliert. Denn 10 Tage nach subtotaler Nephrektomie war die steigernde Ang II-Wirkung schon aufgehoben (Abbildung 3.11).

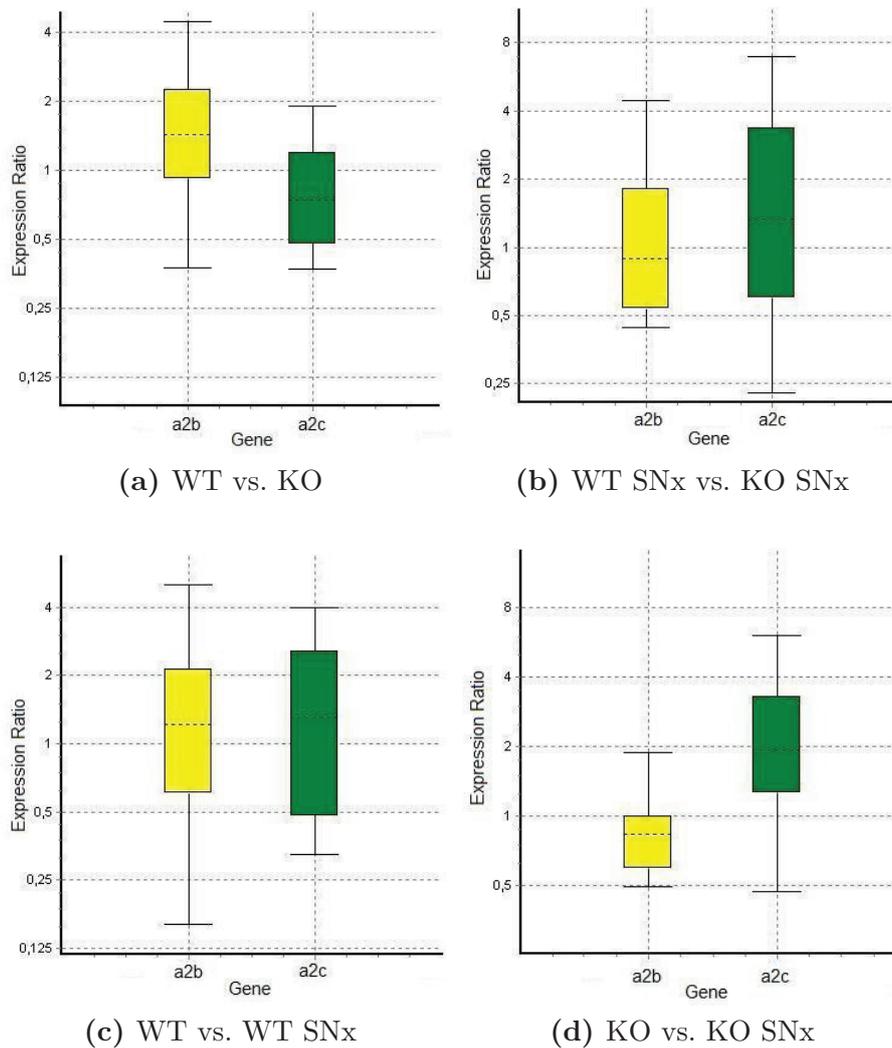
### 3.6 Präsynaptische NA Autoinhibition nach SNx

Abbildung 3.12 zeigt den Effekt der  $\alpha_2$ -Adrenozeptorblockade auf die renale Noradrenalinfreisetzung in subtotal nephrektomierten Wildtyp- und Knockout-Mäusen im Vergleich zu scheinoperierten WT- und KO-Tieren. Dieser war bei der Wildtyp-FVB-Maus nach SNx signifikant abgeschwächt. Bei der nephrektomierten Knockout-Maus ließ sich nach  $\alpha_2$ -Adrenozeptorblockade mit Phentolamin eine geringfügige Steigerung der Transmitterfreisetzung verzeichnen.



**Abbildung 3.12:** Einfluss von SNx auf  $\alpha_2$ -Adrenozeptor. Nieren von  $\alpha_{2A}$ -KO- und Wildtyp-Mäusen, jeweils Sham und SNx, wurden in Anwesenheit von Phentolamin in Reihe ( $S_0$ - $S_5$ ) mit 5 Hz elektrisch stimuliert (RNS). Die Gabe des unselektiven  $\alpha$ -Adrenozeptorblockers erfolgte in aufsteigender Konzentration (0-1  $\mu\text{M}$ ). Steigerung der NA-Ausschüttung bezogen auf  $S_0$  (0  $\mu\text{M}$  Phentolamin) unter Berücksichtigung der Kontrolle (sechs renale Nervenstimulationen in Folge ohne Anwesenheit von Phentolamin) ( $(S_n/S_0)/S_{\text{Kontrolle}} \cdot 100$ ). NA-Ausschüttung wurde mittels HPLC gemessen und in % Kontrolle angegeben.

Zur Abklärung, ob der Rezeptor-Knockout oder die subtotale Nephrektomie zu einer Veränderung der Rezeptordichte der verschiedenen  $\alpha_2$ -Rezeptorsubtypen geführt hat, wurden RTq-PCRs zur Quantifizierung der mRNA-Expression im Nierengewebe von scheinoperierten und subtotal nephrektomierten Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3.13).



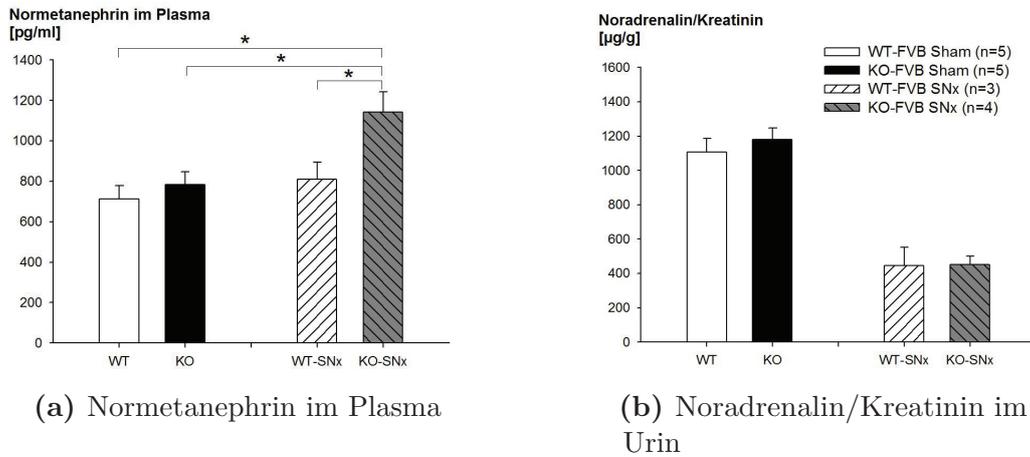
**Abbildung 3.13:** Quantifizierung der mRNA-Expression der verschiedenen  $\alpha_2$ -Rezeptorsubtypen.

### 3.7 Katecholaminkonzentration in Blutplasma und Gewebe

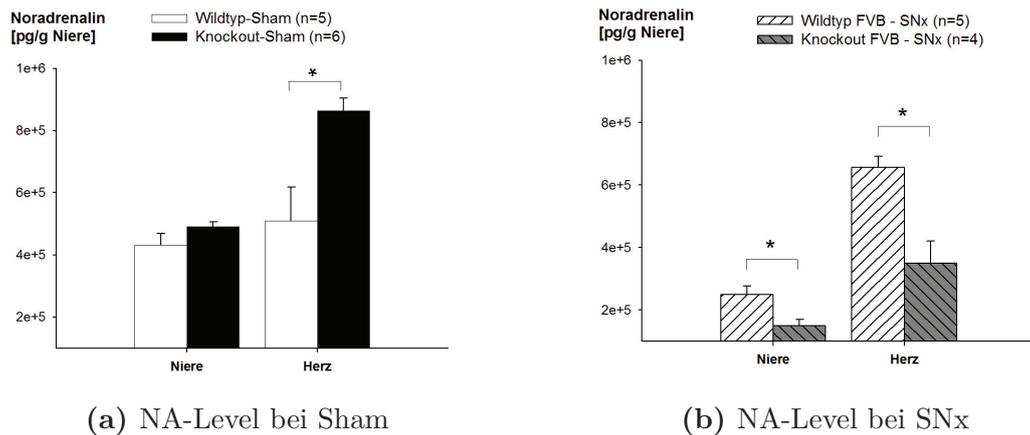
Die Plasmaspiegel der Katecholamine werden durch die Freisetzung aus den Nebennieren bzw. den Synapsen und Organen („spillover“), den Abbau und die Ausscheidung bestimmt und sind daher schwer zu interpretieren.

Die erhöhte Herzfrequenz und Noradrenalinfreisetzung aus der sympathischen Nervenendigung nach renaler Nervenstimulation in der  $\alpha_{2A}$ -Knockout- (Sham-) Maus ließen vermuten, dass auch in vivo die zirkulierende Menge an Noradrenalin gesteigert

ist.



**Abbildung 3.14:** Überblick über Katecholaminkonzentrationen im Plasma und Urin. \*P<0.05 zeigt signifikanten Unterschied.



**Abbildung 3.15:** Noradrenalinlevel in Nieren- und Herzgewebe. NA-Level wurde mittels HPLC gemessen und in pg/g Niere angegeben. \*P<0.05 zeigt signifikanten Unterschied.

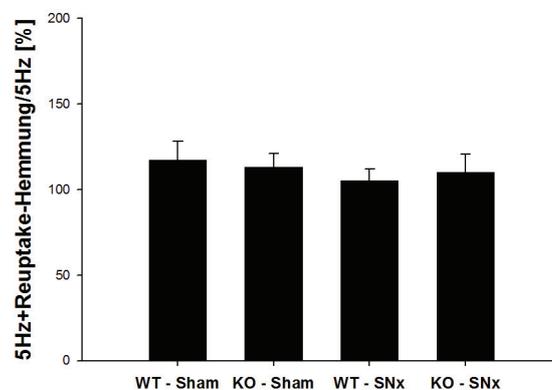
Um eine verlässliche Bestimmung des Noradrenalinpiegels im Plasma zu erzielen, wurde die Konzentration von Normetanephrin, ein direkter Metabolit des Katecholaminstoffwechsels, gemessen. Die Ergebnisse zeigten nur eine gering gesteigerte Normetanephrinkonzentration im Plasma bei scheinoperierten Knockout-Mäusen (Abbildung 3.14 (a)). Vielmehr war der Katecholamingehalt im Gewebe von KO-Tieren erhöht, im Herzen signifikant (Abbildung 3.15 (a)). Nach subtotaler Nephrektomie

hatte die Noradrenalin-Konzentration in Herz- und Nierengewebe der KO-Maus abgenommen, der Katecholamin-Plasmalevel war jetzt signifikant höher als bei der nephrektomierten WT-Maus (Abbildungen 13.14 (a), 13.15 (b)).

Abbildung 13.15 (b) stellt die Ausscheidung von Noradrenalin bezogen auf Kreatinin im Urin für Wildtyp- und Knockout-Tiere dar. Die Ausscheidung von WT- und KO-Tieren unterschieden sich vor und nach 5/6 Nephrektomie nicht signifikant. Die signifikant reduzierte renale NA-Ausscheidung nach Nephrektomie lässt sich auf das geringere absolute Nierengewebe zurückführen.

### 3.8 Noradrenalin-Reuptake

Erhöhte Plasmaspiegel von Katecholaminen, insbesondere von Noradrenalin, als Hinweis auf eine gesteigerte Sympathikusaktivität bei chronischer Niereninsuffizienz sind seit langem bekannt. Allerdings wurde dieser Befund nicht als Hinweis für eine efferent gesteigerte Sympathikusaktivität gewertet. Hierfür wurden eine verminderte renale Clearance und eine gestörte neuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin verantwortlich gemacht.

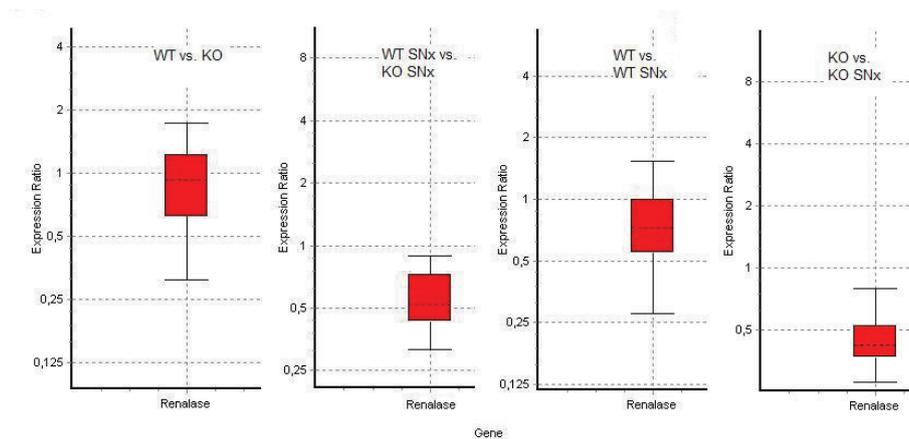


**Abbildung 3.16:** Einfluss des KOs und der SNx auf NA-Reuptake

Mit den Untersuchungen wurde die Steigerung der Noradrenalinfreisetzung durch Reuptake-Hemmung mit Kokain und Kortikosteron überprüft. Den Ergebnissen zufolge haben aber weder der  $\alpha_{2A}$ -Knockout noch die subtotale Nephrektomie [Sympathikusaktivierung] einen Einfluss auf den Reuptake von Noradrenalin in die sympathische Nervenendigung.

### 3.9 Renalase

Bestimmt wurde mit der Durchführung von RTq-PCRs die quantitative mRNA-Expression der Renalase, eine Monoaminoxidase, in Nierengeweben von Wildtyp- und Knockout-Mäusen (Abbildung 3.17).



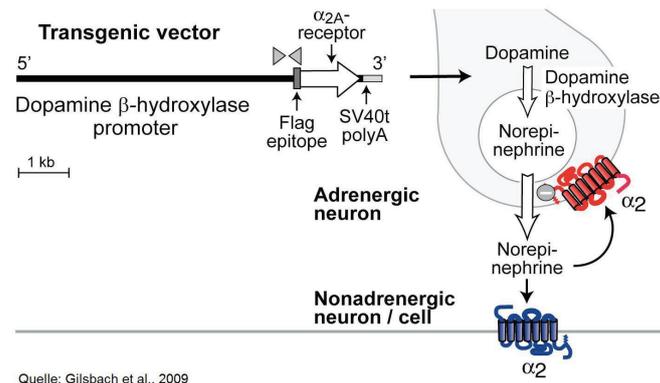
**Abbildung 3.17:** Quantifizierung der mRNA-Expression der Monoaminoxidase Renalase

Den Ergebnissen zufolge scheint die Renalase in subtotal nephrektomierten  $\alpha_{2A}$ -Knockout-Tieren reguliert zu sein, interessanterweise aber anders als erwartet. Wie Abbildung 3.17 zeigt, wird in der operierten Knockout-Maus weniger Renalase-mRNA exprimiert als in dem nephrektomierten Wildtyp, auch im Vergleich zum scheinoperierten Knockout-Tier.

### 3.10 Generierung der $dbh-\alpha_{2A}$ transgenen Knockout-Maus

Bis jetzt konnte nicht herausgefunden werden, was den Verlauf der  $\alpha_{2A}$ -KO-Maus nach subtotaler Nephrektomie begünstigt. Nicht der präsynaptische Anteil des  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors, sondern die postsynaptisch lokalisierten  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren scheinen in diesem Zusammenhang wichtig zu sein. Ein transgenes Mausmodell, bei dem nur die präsynaptischen Neuronen des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptors exprimiert werden, die postsynaptischen jedoch ausgespart bleiben, könnte bei dieser Fragestellung weiterhelfen.

Um ausschließlich die Expression von  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptoren in noradrenergen und adrenergen Zellen von transgenen Mäusen anzusteuern, kann der Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase (DBH) Promoter verwendet werden. Abbildung 3.18 zeigt den transgenen Vektor, bestehend aus einem 5,6-kb Abschnitt des menschlichen Dbh-Promoters, der codierten Sequenz des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptoren der Maus mit einem aminoterminalen Epitop-Tag und dem SV40 T-Intron mit einer Polyadenylierungsstelle [32].



**Abbildung 3.18:** Schematische Darstellung des transgenen  $\alpha_{2A}$ -AR-Vektors

Dbh- $\alpha_{2A}$  transgene Mäuse besitzen einen gemischten C57/Bl6/J- und 129SvEv-Hintergrund. Da sich der C57/Bl6-Stamm bekanntermaßen resistent bei der Entwicklung einer Glomerulosklerose zeigt [29] und daher schwer einzuschätzen ist, ob dieser gemischte Hintergrund auf die subtotale Nephrektomie reagiert, wird derzeit eine Rückzucht in 3 Generationen auf den sensiblen FVB-Stamm durchgeführt. Diese Dbh- $\alpha_{2A}$  transgenen Mäuse werden folgend mit  $\alpha_{2A}$ -Knockout-FVB Mäusen gekreuzt, um Linien zu generieren, die selektiv nur den präsynaptischen  $\alpha_{2A}$ -Autorezeptor exprimieren, der postsynaptisch allerdings fehlt.

## 4 Diskussion

### 4.1 $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout

Die Bedeutung des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptors für die renale präsynaptische Noradrenalinregulation ist mit einem  $\alpha_{2A}$ -Knockout-Modell auf dem Hintergrund von C57/Bl6-Mäusen dargestellt worden [27]. Hier nimmt der Rezeptor eine zentrale Stellung für die präsynaptische Autoinhibition der Noradrenalinfreisetzung in der Niere ein. Die gegenwärtigen Untersuchungen von  $\alpha_{2A}$ -Knockout-Mäusen auf dem Hintergrund des FVB-Stammes bestätigen die Resultate.

Elektrisch induzierte renale Stimulationen mit den Frequenzen 5, 7.5, 10 und 15 Hz zeigten, dass die präsynaptische Neurotransmission auch in der FVB-KO-Maus signifikant höher als im entsprechenden Wildtyp ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die zirkulierende NA-Menge in der KO-Maus tatsächlich von Geburt an erhöht ist, was einer gesteigerten Sympathikusaktivität in der Niere gleichkommen soll. Der Nachweis von einem gesteigerten Level an zirkulierenden Katecholaminen ist allerdings schwer zu erbringen. Die Bestimmung der Plasmakonzentration von Normetanephrin ergab keinen Unterschied, vielmehr zeigte sich eine NA-Level im Herzgewebe der KO-Sham-Maus. Die Herzfrequenz ist nach Knockout allerdings signifikant gesteigert, was als Indiz für eine gesteigerte Aktivität zu werten ist.

Experimente mit dem nichtselektiven Alphablocker Phentolamin identifizierten den  $\alpha_{2A}$ -Subtyp, wie schon zuvor beim C57/Bl6-Stamm, eindeutig als Hauptregulator für die präsynaptische Noradrenalinfreisetzung.  $\alpha$ -Adrenozeptorblockaden in aufsteigender Konzentration zeigten lediglich eine geringe entkoppelnde Wirkung auf die renale Neurotransmission bei der KO-Maus. Der leichte Zuwachs an Noradrenalinfreisetzung durch Phentolamin lässt sich vermutlich auf die Tatsache zurückführen, dass in der Mausniere des FVB-Stammes die  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptor-Subtypen den  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor in seiner Funktion geringfügig unterstützen. Diesem Ergebnis entsprechende Beobachtungen wurden bereits bei Untersuchungen an Gewebeproben

von Samenleitern, Arterien und Gehirn gemacht [16, 33–35]. Dabei konnte den zwei weiteren  $\alpha_2$ -Subtypen, insbesondere dem  $\alpha_{2C}$ -AR, ebenfalls eine Begleitfunktion in der präsynaptischen Regulation von Noradrenalin zugesprochen werden.

Erstaunlicherweise erreichte der Wildtyp bei Maximalblockade der präsynaptischen Autorezeptoren nicht nur das Niveau der KO-Maus, sondern die RNS induzierte NA-Ausschüttung war signifikant höher als die bei der KO-Maus bei gleicher Konzentration.

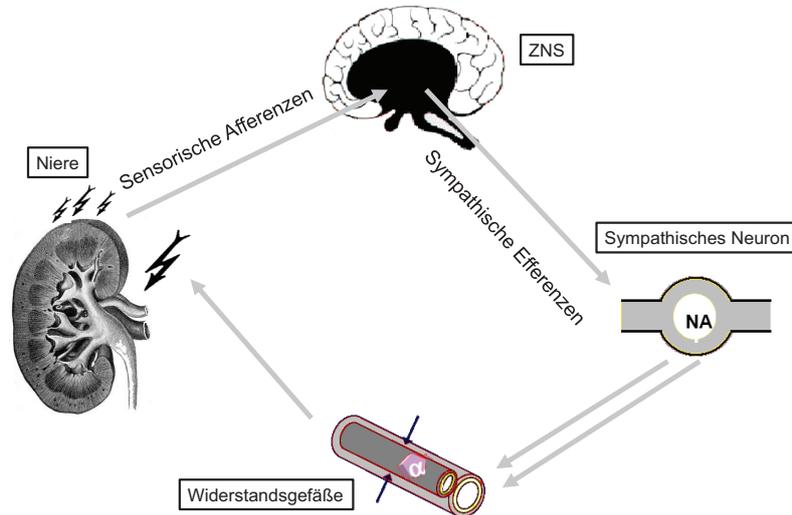
Schwierig zu beurteilen ist, wie sich das hohe NA-Angebot auf den Gefäßwiderstand auswirkt. Resultiert aus der hohen präsynaptischen NA-Ausschüttung auch tatsächlich eine höhere postsynaptische Wirkung? Versuche an isoliert perfundierten Mausnieren zeigten, dass keineswegs eine 1:1-Beziehung zwischen präsynaptischer Ausschüttung und postsynaptischem Effekt vorzuliegen scheint. Anders als bei den Untersuchungen an der  $\alpha_{2A}$ -Knockout C57/Bl6-Maus [27] ergab sich bei der KO-FVB Maus aus der renalen Mehrausschüttung an Noradrenalin keine signifikante Steigerung des renalen Widerstandes im Vergleich zum FVB-Wildtyp. Dementsprechend bedingte der Knockout auch keinen signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei der KO-Maus hier Mechanismen entgegenwirken.

## 4.2 Sympathikusaktivierung bei Niereninsuffizienz

Bei chronischer Niereninsuffizienz ist eine übermäßige Aktivierung des sympathischen Nervensystems festzustellen. Die Mechanismen, wie es zu der Aktivierung kommt und welche Konsequenzen sich dadurch im Einzelnen für die CNI ergeben, sind, wie eingangs bereits erwähnt, zum Teil noch unbekannt. Bekannt ist indessen, dass der erhöhte Sympathikotonus akzelerierend auf die Progression der chronischen Niereninsuffizienz wirkt.

Die subtotalen Nephrektomie macht es möglich, strukturelle und funktionelle Veränderungen durch experimentell induzierte Niereninsuffizienz zu untersuchen. Wie erwartet zeigte sich mit Hilfe dieses Modells bei der Wildtyp-FVB-Maus nach Nephrektomie ein deutlicher Anstieg des Blutdrucks. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer renoparenchymatösen Hypertonie, deren Pathomechanismus sehr komplex ist. Es ist nicht nur eine vermehrte Natriumretention und eine Aktivierung des RAAS, die einen Hypertonus bei CNI ausmachen, sondern auch die Sympathikusaktivierung ausgehend von der erkrankten Niere. Gesteigerte sensorische Afferenzen senden bei

Schädigung der Niere Signale an integrative sympathische Nuclei im ZNS und wirken sich so über sympathische Efferenzen auf den Blutdruck aus [36]. Zweifelsfrei trägt der Hypertonus einen großen Teil zur Progression der Niereninsuffizienz bei. Abbildung 4.1 gibt einen Überblick über den oben beschriebenen Zusammenhang.



**Abbildung 4.1:** nach Rump et al. NDT (2000) 15:1735-8

Auf ähnlichem Weg wird durch gesteigerte sympathische Entladungen auch die sympathische Neurotransmission auf lokaler Ebene im Nierengewebe gefördert, was zusätzlich die Progredienz der Niereninsuffizienz vorantreibt. Eindrucksvoll nahm die elektrisch induzierte Noradrenalinfreisetzung nach Nephrektomie in der Wildtyp-Maus zu und unterschied sich 60 Tage postoperativ signifikant von der Freisetzung in der scheinoperierten WT-Mausniere. Eine gestörte neuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin konnte für die gesteigerte Neurotransmission nicht ausgemacht werden, da der Noradrenalin-Reuptake nach SNx im Vergleich mit dem scheinoperierten Wildtyp nicht beeinträchtigt war. Interessanterweise war die sympathische Neurotransmission auch schon 10 Tage nach Nephrektomie gesteigert, also mit Beginn der Erkrankung.

Bekannt ist, dass NA und seine Ko-Neurotransmitter, ATP und Neuropeptid Y (NPY), renovaskuläre und mitogene Effekte vermitteln und so an glomerulosklerotischen Umbauprozessen beteiligt sind. Ein wesentlicher Teil der schädigenden Wirkung wird über  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren vermittelt [13, 37]. Neben den adrenerg-medierten zellulär-proliferativen Effekten konnten direkte Effekte der Katecholamine auf die

Podozytenfunktion nachgewiesen werden [12]. Auch scheinen NA und sein Kotransmitter ATP beide Effekte über spezifische G-Protein-gekoppelte P2-Purinozeptoren zu vermitteln, wie in Nager- und Menschennieren gezeigt werden konnte [13–15]. Dabei lässt sich das Ausmaß der Nierenschädigung mit Bestimmung der Mikroalbuminurie beurteilen.

Mit der  $\alpha_{2A}$ -KO Maus erhofften wir uns, die Bedeutung gesteigerter Neurotransmission und Sympathikusaktivität im Rahmen einer CNI besser abschätzen zu können und herauszufinden, inwiefern sich glomerulosklerotische Veränderungen an direkten NA-Effekten festmachen lassen.

## 4.3 Einwirkungen des $\alpha_{2A}$ -KOs auf die chronische Niereninsuffizienz

Der  $\alpha_{2A}$ -KO ist durch eine erhöhte präsynaptische Neurotransmission charakterisiert. Welche Bedeutung hat nun die erhöhte angeborene Sympathikusaktivität bei der transgenen Maus für die Progredienz der chronischen Niereninsuffizienz gegenüber dem Wildtyp? Die Vermutung liegt nahe, dass die gesteigerte Freisetzung vor allem der Transmitter NA und ATP durch den Rezeptor-Knockout die mitogenen Effekte auf die glomerulären und tubulären Strukturen potenziert und so zu einer Akzeleration der glomerulosklerotisch bedingten CNI bei der transgenen Maus führt. Eine ähnliche Fragestellung wurde bereits am Herzen untersucht. In diesem Kontext konnte eindeutig gezeigt werden, dass  $\alpha_{2A}$ -KO-Mäuse mit Linksherzinsuffizienz nach Druckbelastung durch „aortic-banding“ gegenüber dem herzinsuffizienten Wildtyp von einer signifikant höheren Mortalität betroffen waren. Gestützt auf diese Beobachtung erklärten Brede und Mitarbeiter, dass dem  $\alpha_{2A}$ -AR eine essentielle Funktion in der Prävention des weiteren Voranschreitens der Herzinsuffizienz zukomme [34]. Wir erwarteten nach Induktion einer chronischen Niereninsuffizienz einen ähnlichen Ausgang der Experimente. Die vorliegenden Ergebnisse stehen aber in einem deutlichen Kontrast zu den Beobachtungen von Brede und Kollegen. Albuminurie und Überlebensrate indizieren, dass die Knockout-Maus im Rahmen einer CNI durch die Deletion des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor überraschenderweise begünstigt ist.

Zwar kommt es nach SNx in der KO-Maus gleichermaßen wie beim Wildtyp zu einem Anstieg des Blutdrucks, allerdings scheint die Nephrektomie erstaunlicherweise keinen Einfluss auf die renale Neurotransmission in der Knockout-Maus zu haben.

Daher lässt sich annehmen, dass dem  $\alpha_{2A}$ -AR in der Regulation der sympathischen Neurotransmission eine ausschlaggebende Rolle zukommt.

Wie lässt sich erklären, dass sich der  $\alpha_{2A}$ -Knockout nachteilig auf die chronische Herzinsuffizienz auswirkt, aber das Outcome nach Induktion einer chronischen Niereninsuffizienz verbessert? Es ist denkbar, dass der Grund in der unterschiedlichen physiologischen Funktionsweise zu finden ist. Am Herzen führt eine Sympathikusaktivierung über eine gesteigerte Ionotropie zu einer enormen Druckbelastung; die Niere unterscheidet sich hingegen grundlegend in ihrer physiologischen Funktionsweise vom Herzen.

Auch ist es gut möglich, dass sympatho-adrenerge Ansatzpunkte in der Niere im Vordergrund stehen, die sich in der transgenen Maus an die gesteigerte Neurotransmission angepasst haben oder durch den strukturellen  $\alpha_{2A}$ -Knockout aufgehoben sind.

#### 4.4 Rescue-Mechanismus bei Knockout-Maus

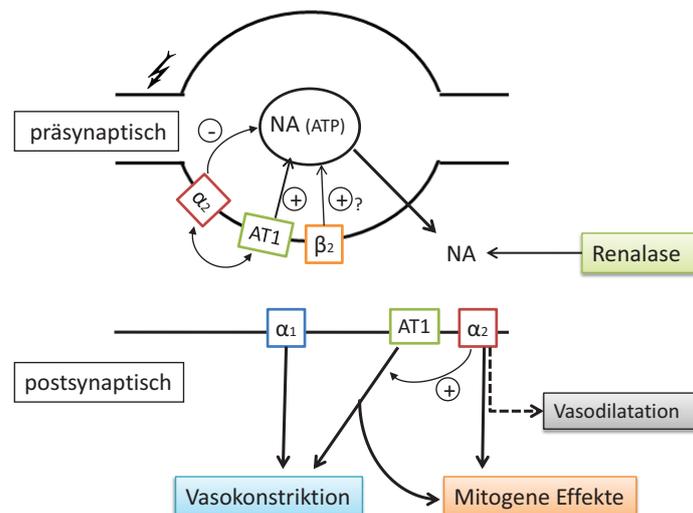


Abbildung 4.2: Überblick über sympatho-adrenerge Beziehungen

Ist dieses Modell der sympathischen Überaktivität fragwürdig, weil sich als Folge des hohen Angebotes an Noradrenalin Systeme bzw. Rezeptoren angeglichen haben und sich dadurch die transgene Maus einen Vorteil gegenüber dem Wildtyp in einer Stresssituation, die die subtotale Nephrektomie darstellt, verschafft hat? Blutdruck-regulierende Systeme wie das RAA- und NO-System oder prä- und postsynaptisch gelegene Rezeptoren kommen dabei in Frage. Oder sind durch den  $\alpha_{2A}$ -Knockout sich durch Kommunikation potenzierende Systeme unterbrochen worden und die KO-Maus profitiert davon? Welche Rolle spielt die kürzlich entdeckte Renalase? (Abbildung 4.2)

#### 4.4.1 Allgemein adaptiert

Die  $\alpha_{2A}$ -KO-Maus ist von Geburt an mit einem hohen NA-Angebot konfrontiert und daran gewöhnt. Möglicherweise bewirkt die subtotale Nephrektomie bei KO deshalb keine weitere Steigerung der renalen Neurotransmission.

#### 4.4.2 Präsynaptische Untersuchungen

**Präsynaptische Interaktion zwischen  $\alpha_{2A}$  und Angiotensin II:** Angiotensin (Ang) II fördert die präsynaptische Noradrenalinfreisetzung in vielen sympathisch innervierten Geweben, auch in der Niere [31, 35, 38–41]. Dabei ist der  $AT_1$ -Rezeptor für diesen Effekt hauptverantwortlich [31].

Unsere Untersuchungen bestätigten die Beobachtungen. Bei Experimenten mit isoliert perfundierten Mausnieren führte exogene Applikation von Ang II bei Nieren scheinoperierter Wildtyp-Mäuse zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Steigerung der Noradrenalinfreisetzung. Bei der KO-Maus ist zwar die präsynaptische Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation signifikant erhöht, aber die Ergebnisse zeigen, dass der fördernde Effekt von Ang II auf die Noradrenalinfreisetzung nur noch geringfügig vorhanden ist. Die Möglichkeit, dass die Noradrenalinfreisetzung durch  $\alpha_2$ -AR-Blockade schon maximal ist, was eine weitere Steigerung verhindert, ist unwahrscheinlich, da der  $\beta$ -Adrenozeptoragonist Isoprenalin eine Steigerung von Noradrenalin im gleichen Umfang mit oder ohne  $\alpha_2$ -Adrenozeptorblockade im Samenleiter der Ratte auslöste [42]. Hat die „gesteigerte Sympathikusaktivität“ bei der  $\alpha_{2A}$ -KO Maus die Sensibilität des  $AT_1$ -Rezeptors für Ang II kompensatorisch reduziert?

$AT_1$ -Rezeptoren sind an den  $G_{q/11}$  - Phospholipase C (PLC) - Proteinkinase C (PKC)

Transduktionsweg gekoppelt. Der fördernde Ang II-Effekt scheint immer eine simultane Aktivierung (d.h. im Fall des  $\alpha_2$ -AR eine funktionierende  $\alpha_2$ -Autoinhibition) von präsynaptischen  $G_{i/0}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor, zu benötigen [35, 40, 41, 43]. Die Sensibilität des  $AT_1$ -Rezeptors wird also nicht beeinflusst sein, vielmehr scheint hier ein Rezeptor-Crosstalk aufgehoben zu sein.

Trendelenburg und Mitarbeiter versuchten, gezielt einen dafür verantwortlichen Subtypen ausfindig zu machen. Sie behaupteten, dass es der  $\alpha_{2C}$ - und nicht der  $\alpha_{2A}$ -Subtyp sei, der mit dem  $AT_1$ -Rezeptor interagiere. Der  $\alpha_{2B}$ -Subtyp würde den Crosstalk unterstützen [35]. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge kommt dem  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor allerdings eine größere Bedeutung bei der präsynaptischen Interaktion zwischen  $AT_1$ - und  $\alpha_2$ -AR zu als bis jetzt vermutet, was auch in der Theorie nachvollziehbarer erscheint, da schon häufig gezeigt wurde, dass der  $AT_1$ -Rezeptor eine intakte Autoinhibition benötigt. Und für diese ist der  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor eben maßgeblich verantwortlich. Eine beeinträchtigte  $\alpha_{2A}$ -Autoinhibition durch strukturellen  $\alpha_{2A}$ -Knockout führte zum Ausbleiben der Wirkung von Ang II auf die NA-Ausschüttung.

Interessanterweise decken die Untersuchungen auch auf, dass beim Wildtyp nach subtotaler Nephrektomie und Sympathikusaktivierung der fördernde Effekt von Ang II auf die Noradrenalinfreisetzung stark abgeschwächt ist, und zwar schon früh postoperativ. Wenn man diese Resultate und die obigen Ausführungen zur Bedeutung einer funktionierenden NA-Autoinhibition für die Interaktion zwischen präsynaptischen  $AT_1$ - und  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren im Kontext betrachtet, lassen die Ergebnisse vermuten, dass CNS bzw. gesteigerte Sympathikusaktivität zu einer Beeinträchtigung der Autoinhibition der präsynaptischen Noradrenalinfreisetzung an der sympathischen Nervenendigung führt. Klein und Mitarbeiter fanden den konkreten Hinweis, dass die Autoinhibition der NA-Freisetzung im Hypothalamus von chronisch nierenerkrankten Ratten beeinträchtigt war [44].

Wie schon häufig beobachtet ist bei chronischer Niereninsuffizienz das Renin-Angiotensin-System in seiner Aktivität gesteigert und infolgedessen die Konzentration von Angiotensin II erhöht, was die Sympathikusaktivität zusätzlich triggert [37, 45, 46]. Im zentralen Nervensystem (ZNS) spielt Angiotensin II als Neurotransmitter dabei eine wesentliche Rolle. Dort kann Ang II die Aktivität des sympathischen Nervensystems über direkte Effekte auf das vasomotorische Zentrum im Hirnstamm stimulieren

[37].

Da präsynaptische Ang II-Effekte auf die Neurotransmission bei dem subtotal nephrektomierten Wildtyp mehr oder weniger aufgehoben sind, erscheint es aber unwahrscheinlich, dass bei bestehender Sympathikusüberaktivität eine zusätzliche Triggerung auch über präsynaptische  $AT_1$ -Rezeptoren erfolgt. Zumindest der Noradrenalin fördernde Effekt von Ang II ist abgeschwächt und trägt somit nicht zur Potenzierung bei. Neben den zentralen Mechanismen wird demnach der präsynaptischen Ang II-Wirkung in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle zukommen.

In der Interaktion zwischen präsynaptischen  $\alpha_2$ -AZ und präsynaptischen  $AT_1$ -Rezeptoren wird der Rescue-Mechanismus nicht zu finden sein. Bei beiden Gruppen, Wildtyp- und Knockout-Maus, ist der Ang II-Effekt auf präsynaptische Noradrenalin-freisetzung abgeschächt. Die Aufhebung der Wirkung ist zwar ursächlich jeweils verschieden (KO  $\rightarrow$  strukturelle Unterbrechung der Interaktion durch den  $\alpha_{2A}$ -Knockout; WT  $\rightarrow$  Unterbrechung der Interaktion durch beeinträchtigte Autoinhibition bei CNI), hat aber letztendlich die gleiche Auswirkung.

**Präsynaptische Bedeutung des  $\beta_2$ -Adrenozeptors:** Es gibt Hinweise, dass die präsynaptische Neurotransmission auch über Aktivierung des  $\beta_2$ -Adrenozeptors gesteigert werden kann. Möglicherweise ist dieser infolge erhöhter NA-Ausschüttung in der transgenen Maus desensibilisiert. Die physiologische Relevanz des  $\beta_2$ -Adrenozeptors wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert und ist letztendlich nicht eindeutig. Mit den  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Clenbuterol (selektiver  $\beta_2$ -AR-Agonist) und Isoproterenol (unselektiver  $\beta$ -AR-Agonist) ließ sich keine Steigerung der Noradrenalin-freisetzung nach renaler Nervenstimulation bei isoliert perfundierten Mausnieren von FVB-Wildtyp-Mäusen erzielen (Ergebnisse sind nicht aufgeführt) und deswegen auch nicht untersuchen, welchen Einfluss der  $\alpha_{2A}$ -Knockout auf die präsynaptische Funktion dieses Adenozeptors hat. Das mag darin begründet liegen, dass der fördernde Effekt von  $\beta$ -Rezeptor-Agonisten auf die sympathische Transmitterfreisetzung variabel und von verschiedenen Einflussgrößen abhängig erscheint [47].

**Expressionsmuster der  $\alpha_2$ -Subtypen:** Reguliert die KO-Maus über die übrigen  $\alpha_2$ -Subtypen nach SNx kompensatorisch, wodurch sie sich gegenüber dem Wildtyp einen

Vorteil verschafft? Bisherige Beobachtungen von anderen Arbeitsgruppen konnten bis jetzt keinen Beweis liefern, dass es durch den Knockout des  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors zu einer Hochregulierung der übrigen  $\alpha_2$ -Subtypen kommt [16].

Die Noradrenalinfreisetzung aus Nieren von subtotal nephrektomierten  $\alpha_{2A}$ -Knockout-Mäusen nach  $\alpha$ -Adrenozeptorblockade mit Phentolamin war bei den verschiedenen Konzentrationen jeweils geringfügig gesteigert im Vergleich zur Freisetzung aus Nieren von scheinoperierten KO-Mäusen, so dass die Möglichkeit in Betracht gezogen werden musste, dass der  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Subtyp nach SNx vermehrt exprimiert wird. RTq-PCRs zeigten aber, dass die Expression der  $\alpha_2$ -Subtypen nach subtotaler Nephrektomie nicht verändert ist. Somit scheint die subtotale Nephrektomie zumindest auf mRNA-Ebene keinen Einfluss auf die Expression von  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Subtypen zu haben.

#### 4.4.3 Postsynaptische Untersuchungen

Bis jetzt konnte die Frage nicht beantwortet werden, was den Verlauf der  $\alpha_{2A}$ -KO Maus nach SNx begünstigt. Möglicherweise spielen in diesem Zusammenhang postsynaptische Rezeptoren eine bedeutende Rolle oder dem  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor kommt eine größere postsynaptische Bedeutung als bisher angenommen zu.

**Desensibilisierung vasoaktiver Rezeptoren:** Es ist verwunderlich, dass die scheinoperierte Knockout-Maus sich im systolischen Blutdruck nicht wesentlich vom Wildtyp unterscheidet, obwohl der Rezeptor-Knockout zu einer vermeintlichen Sympathikus-überaktivität führt. Vielmehr scheint der Effekt des erhöhten Sympathikotonus in der KO-Maus auf den vaskulären Widerstand nur minimal zu sein. Andere Arbeitsgruppen haben vergleichbare Beobachtungen gemacht, dass sich blutdruckregulierende Systeme aufgrund des chronisch erhöhten Sympathikotonus bei der KO-Maus kompensatorisch angeglichen haben. Sie hielten es aber auch für möglich, dass eine Umverteilung des Blutes aufgrund verändertem Ansprechen vasoaktiver Adrenozeptoren auf die Neurotransmitter stattgefunden hat [21, 48].

Es konnte bereits bei Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass chronische Infusionen mit einem Agonisten zu einem verminderten Ansprechen der kardialen  $\beta$ -AR führt [49, 50]. Diese Beobachtung bestätigten Altmann und Mitarbeiter bei der  $\alpha_{2A}$ -Knockout-Maus auf dem Hintergrund des C57/BL6-Stammes. Sättigungsbindungsstudien belegten eine signifikante Reduzierung der Empfindlichkeit kardialer  $\beta$ -AR in der KO-Maus im Vergleich zum Wildtyp. Die Empfindlichkeit der

$\beta$ -AR war nachweislich bis zu 25% reduziert [21]. Die vorliegenden Experimente zur Bestimmung des renalen Gefäßwiderstandes nach elektrischer Stimulation (2-15 Hz) lassen ebenfalls daran denken, dass die vasokonstriktorischen Adrenozeptoren weniger empfindlich auf Noradrenalin reagieren. Interessant wäre es hier, in Folgeversuchen gezielt das Ansprechen der Rezeptoren auf exogen appliziertes Noradrenalin mit Hilfe isoliert perfundierter Nieren zu überprüfen.

Auch ist denkbar, dass vasoaktive Rezeptoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in ihrer Wirkungsintensität verändert sind. Der  $AT_1$  ist nicht nur präsynaptisch an der Modulation von Noradrenalin beteiligt, sondern beeinflusst auch postsynaptisch durch Vasokonstriktion den renalen Gefäßwiderstand [51]. Um die  $AT_1$ -Vasoaktivität zu überprüfen, wäre die Durchführung von Dosis-Wirkungskurven mit exogen appliziertem Ang II in aufsteigender Konzentration bei isoliert perfundierten Nieren von Wildtyp- und  $\alpha_{2A}$ -Knockout-Mäusen sinnvoll.

**Direkte Effekte des  $\alpha_{2A}$ -ARs:** Der direkte Einfluss des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptors auf den Tonus der Blutgefäße wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Zur Verfügung stehende pharmakologische Daten und Knockout Studien präsentieren Beweise für sowohl endotheliale Vasodilatation als auch Vasokonstriktion in verschiedenen Geweben [16, 19, 52–56]. In isoliert perfundierten Nieren von spontan hypertensiven Ratten (SHR) zeigte sich eine vasokonstriktorische Wirkung des  $\alpha_2$ -Rezeptors, nachdem die Niere mit niedrigen Konzentrationen an Ang II unterspült worden war [57]. Zuletzt konnten Shafaroudu und Mitarbeiter eindeutig eine relaxierende Wirkung des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptors im Endothel der Mausaorta nachweisen [58]. In unserem Modell zeigten Methoxamin, ein  $\alpha_1$ -AR-Agonist, und UK 14.304, ein  $\alpha_2$ -AR-Agonist, keinen direkten Einfluss auf den renovaskulären Widerstand (Daten nicht aufgeführt).

Der direkte Effekt auf den renalen Gefäßwiderstand ist letztendlich aber fraglich und fällt vermutlich eher gering aus.

Wenig Augenmerk wurde allerdings bis jetzt auf mitogene Effekte, also direkte Einflüsse auf glomeruläre und tubuläre Strukturen, ausgehend vom postsynaptischen  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor gelegt.

**Postsynaptische Interaktion zwischen  $\alpha_{2A}$ -AR und Angiotensin II:** Sympathisches Nervensystem und Renin-Angiotensin-System interagieren auf verschiedenen Ebenen, um

den Gefäßtonus und den arteriellen systolischen Blutdruck zu regulieren. Auch auf der postsynaptischen Seite bestehen derartige Wechselwirkungen (Abbildung 4.2). Der  $\alpha_{2A}$ -AR ist dabei involviert und es wurde gezeigt, dass er *indirekt* zur Steigerung der renovaskulären Resistance beiträgt.

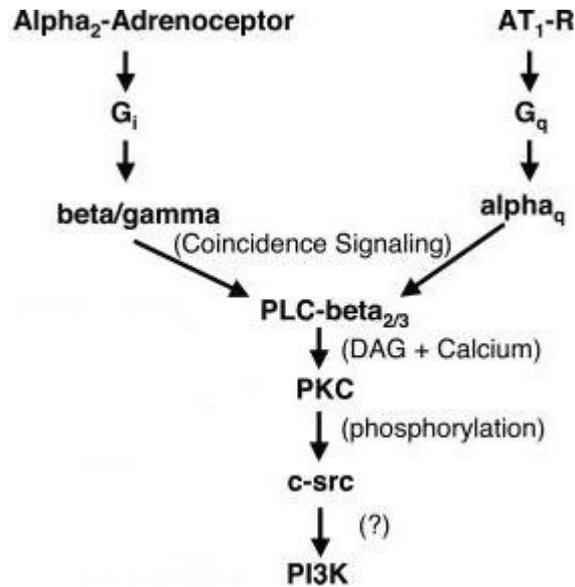


Abbildung 4.3: nach Jackson et al. 2005

Der renale  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor verstärkt, insbesondere in Tieren mit genetischer Hypertension, die Angiotensin II-induzierte renale Vasokonstriktion [59, 60]. Untersuchungen zeigten, dass eine ausgeprägte Interaktion auf Transduktionsebene (Abbildung 4.3) auf dem Level der Phospholipase C (PLC) besteht, die im Folgenden die Proteinkinase C (PKC) aktiviert [61]. NADPH-Oxidase/Superoxid und RhoA/Rho-Kinase sind involviert bei dem Mechanismus der Interaktion zwischen  $\alpha_2$ -Adrenozeptor und Ang II auf die renovaskuläre Resistance:  $PLC \rightarrow PKC \rightarrow c\text{-src} \rightarrow \text{NADPH-Oxidase/Superoxid} \rightarrow \text{RhoA/Rho-Kinase}$  [62].

Studien zeigten, dass die Fähigkeit des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors, die Ang II-induzierte Vasokonstriktion *in vivo* [59] und *in vitro* [60] zu verstärken, wesentlich ausgeprägter in Tieren mit genetischer Hypertension als in normotensiven Tieren, aber auch in Tieren mit nicht-genetisch bedingter (sekundärer) Hypertonie ist. Diese Untersuchungen stellen folglich in Frage, ob der Interaktion zwischen postsynaptischem  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor und  $\text{AT}_1$ -Rezeptor im Wildtyp nach Induktion der renoparenchymatosen Hypertonie tatsächlich eine besondere Bedeutung zukommt. Es bleibt also zu prüfen, inwieweit sich

der FVB-Wildtyp von der  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-Knockout-Maus, bei der die Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren unterbrochen ist, in der renovaskulären Resitance unterscheidet.

Ang II ist neben den gefäßwirksamen Wirkungen auch verantwortlich für  $AT_1$ -Rezeptor-vermittelte inflammatorische und fibrotische Antworten [63–65]. Angenommen, es besteht eine derartige postsynaptische Interaktion zwischen  $AT_1$ - und  $\alpha_{2A}$ -AR wie oben ausgeführt, wäre zu klären, ob der  $\alpha_{2A}$ -AR auch diesen Effekt potenziert.

#### 4.4.4 Renalase

Die Renalase, eine Monoamino-Oxidase, die zum größten Teil in der Niere, aber auch in geringeren Mengen in Herz, Skelettmuskel und Leber gebildet und ins Blut sezerniert wird, metabolisiert zirkulierende Katecholamine und ist im Plasma chronisch nierenerkrankter Patienten deutlich reduziert(, was die Theorie von erhöhten Leveln an Katecholaminen bei CNS unterstützt)[25]. Li und Mitarbeiter untersuchten mit dem Modell der 5/6 Nephrektomie den Effekt von CNI auf Renalase-Plasmalevel und ihre Regulation durch zirkulierende Katecholamine [66]. Die Resultate ihrer Experimente geben Hinweise darauf, dass die Renalase eine Schlüsselrolle in der Regulierung des Sympathikotonus und Blutdrucks durch Modulierung der Druckantwort des adrenergen Systems spielt.

Um Funktion und Bedeutung der Renalase besser zu verstehen, führten wir, wie im Ergebnisteil dargestellt, RTq-PCRs bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen durch. Anders als erwartet zeigte sich im Expressionsmuster der Renalase auf mRNA-Ebene kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Maus. Wir vermuteten hier eine gesteigerte Expression in Nieren von Knockout-Mäusen als Reaktion auf die gesteigerte sympathische Neurotransmission. In nephrektomierten Mäusen deutete sich zwar durch unsere Untersuchungen eine Regulation der Renalase auf mRNA-Ebene an, allerdings war die Expression bei WT- und KO-Mäusen eher vermindert.

Die bisherige Datenlage über die Renalase ist sehr einseitig und die Bedeutung für die Regulation des sympathischen Systems bleibt letztendlich unklar.

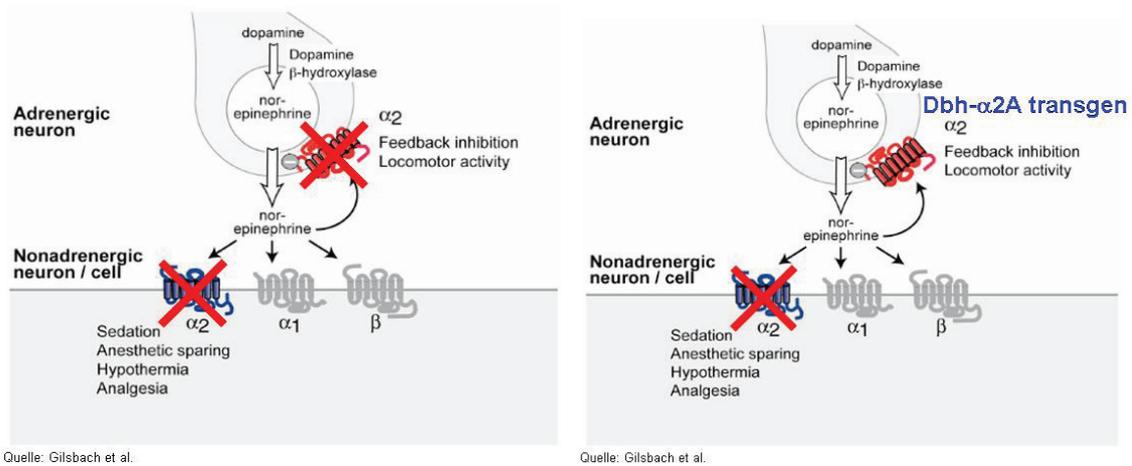
## 4.5 Schlussfolgerung

Dem  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor kommt eine wichtige Rolle bei der präsynaptischen Regulierung der Transmitterausschüttung zu. Die Hypothese, dass die gesteigerte Freisetzung von Noradrenalin und ATP zu einer beschleunigten Progression der chronischen Niereninsuffizienz führt, war allerdings nicht zu beobachten. Vielmehr scheinen Rescue-Mechanismen der KO-Maus die bei der Wildtyp-Maus beobachtete Steigerung der Transmitterfreisetzung nach SNx zu verhindern und aufgehobene postsynaptische Effekte ausgehend von  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren möglicherweise glomerulosklerotische Prozesse zu verlangsamen.

Trotz erheblichen Zuwachses an Wissen über Rezeptoren des adrenergen Systems ist es unbekannt, ob die weite Bandbreite an klinischen Wirkungen von  $\alpha_2$ -Agonisten tatsächlich durch den „klassischen“ präsynaptischen  $\alpha_2$ -Autorezeptor mediiert wird oder ob und zu welchem Grad non-adrenerge Zellen (postsynaptische Anteile) des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors involviert sind.

Den obigen Ausführungen zu Folge spricht sehr vieles dafür, dass postsynaptische sympatho-adrenerge und möglicherweise Ang II-mediierte Effekte ausgehend von non-adrenergen Zellen des  $\alpha_{2A}$ -ARs in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle spielen. Anscheinend ist die klinische Bedeutung des postsynaptischen  $\alpha_2$ -ARs als Anlaufstelle für das sympathische Nervensystem und somit auch für die Pharmakotherapie größer als bis jetzt angenommen. Weiterführende Untersuchungen der Signalwege geknüpft an die non-adrenergen Zellen des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors werden zu einem besseren Verständnis der Rezeptor-Subtypen und der funktionellen Vielfalt innerhalb des adrenergen Systems führen und können den Weg zu neuen therapeutischen Zugängen für effizientere Sympatholytika, wie  $\alpha_2$ -Pharmakons, mit weniger unerwünschten Nebenwirkungen bahnen; möglicherweise werden neue Erkenntnisse aber auch ein Umdenken bezüglich therapeutischer Strategien verlangen.

Ein transgenes Mausmodell, bei dem der Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase (DBH)-Promoter verwendet wird, um nur die adrenergen bzw. präsynaptischen Neuronen des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors zu exprimieren (Abbildung 4.4 (b)) [32], kann bei der Beantwortung der Frage, ob die Ursache des ungünstigeren Verlaufes der FVB-Wildtyp Maus nach subtotaler Nephrektomie in dem postsynaptischen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor zu suchen ist, weiterhelfen.



(a)  $\alpha_{2A}$ -Knockout Maus

(b)  $dbh-\alpha_{2A}$  transgene  $\alpha_{2A}$ -KO Maus

**Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung einer  $dbh-\alpha_{2A}$  transgenen  $\alpha_{2A}$ -KO-Maus im Vergleich zur  $\alpha_{2A}$ -Knockout-Maus. Verwendung des DBH-Promotors ermöglicht ein selektives Ablesen der Sequenzen, die für die adrenergen Anteile des  $\alpha_{2A}$ -AR codieren.

Falls postsynaptisch lokalisierte  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptoren den Rescue-Mechanismus liefern, ist zu erwarten, dass auch diese generierte transgene Knockout-Maus gegenüber dem Wildtyp nach subtotaler Nephrektomie begünstigt ist. Der Grund hierfür wird in den postsynaptischen Anteilen des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptors und in den von ihnen ausgehenden vaso- und mitogenen Effekten liegen, vor denen die  $dbh-\alpha_{2A}$  transgene Maus durch den Knockout gezielt geschützt ist.

## 5 Zusammenfassung

Die Mechanismen gesteigerter renaler Neurotransmission bei chronischer Niereninsuffizienz (CNI) sind nach wie vor unklar. Hierfür wurden die Auswirkungen experimentell induzierter Niereninsuffizienz auf die renale Neurotransmission in  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor Knockout-Mäusen (KO) untersucht. KO- und Wildtyp- (WT) Mäuse unterliefen entweder 5/6 Nephrektomie (SNx) oder einer Scheinoperation (Sham). Die Noradrenalin (NA) -Ausschüttung nach renaler Nervenstimulation (RNS) war in Sham KO- verglichen mit der WT-Maus signifikant gesteigert.  $\alpha_2$ -Adrenozeptorblockade erhöhte die RNS induzierte NA-Ausschüttung in WT, wohingegen kein Effekt bei der KO-Maus beobachtet werden konnte, was indiziert, dass keine anderen präsynaptischen  $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtypen entscheidend für Autoinhibition sind. Nach SNx entwickelten KO- und WT-Mäuse beide einen hohen Blutdruck. Überraschenderweise weist die WT-Maus nach SNx eine ausgeprägtere Mikroalbuminurie auf. Auch die Mortalitätsrate war beim Wildtyp höher als bei der KO-Maus. 60 Tage nach SNx war die RNS induzierte renale Neurotransmission bei der WT-Maus signifikant erhöht, bei der KO-Maus jedoch nicht. Der Effekt der  $\alpha_2$ -Adrenozeptorblockade auf die renale NA-Ausschüttung war nach SNx bei der WT-Maus allerdings abgeschwächt. Realtime-PCR zeigte, dass SNx keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ -Subtypen hat. Angiotensin (Ang) II verstärkte die RNS induzierte NA-Ausschüttung beim Sham-WT, aber nicht bei Sham-KO-Mäusen, was eine entscheidende Rolle des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptors in der Regulation der Ang II-induzierten Steigerung der renalen Neurotransmission indiziert. Der verstärkende Effekt von Ang II auf die renale NA-Ausschüttung war bereits 10 Tage postoperativ in der WT-Maus aufgehoben. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die renale sympathische Neurotransmission bei Niereninsuffizienz gesteigert ist. Da diese Effekte in der  $\alpha_{2A}$ -KO-Maus abgeschwächt waren, kann man spekulieren, dass dieser Rezeptor eine ausschlaggebende Rolle bei der Regulation der renalen sympathischen Neurotransmission spielt. Eine Bedeutung der Monoaminoxidase Renalase bei CNI konnte nicht bestätigt werden. Welche Mechanismen die  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-KO-Maus vor der beschleunigten Progression der CNI schützt, sind

noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise, dass postsynaptisch vermittelte Effekte hierfür verantwortlich sind. Experimente an einer transgenen Maus sind geplant, bei der lediglich die präsynaptischen Anteile des  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptors exprimiert werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] L.C. Rump and V. Oberhauser. [chronic renal failure–taming the sympathetic nervous system! new approach to delaying progression]. *MMW Fortschr Med*, 141 (46):39–41, 1999.
- [2] L.C. Rump, K. Amann, S. Orth, and E. Ritz. Sympathetic overactivity in renal disease: a window to understand progression and cardiovascular complications of uraemia? *Nephrol Dial Transplant*. 2000 Nov;15(11):1735-8, 15(11):1735–1738, 2000.
- [3] M. Hausberg, M. Kosch, P. Harmelink, M. Barenbrock, H. Hohage, K. Kisters, KH. Dietl, and K.H. Rahn. Sympathetic nerve activity in end-stage renal disease. *Circulation*, 106(15):1974–1979, 2002.
- [4] C. Zoccali, F. Mallamaci, S. Parlongo, S. Cutrupi, FA. Benedetto, G. Tripepi, G. Bonanno, F. Rapisarda, P. Fatuzzo, G. Seminara, A. Cataliotti, B. Stancanelli, and L.S. Malatino. Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease. *Circulation*, 105 (11):1354–1359, 2002.
- [5] O. Vonend, L.C. Rump, and E. Ritz. Sympathetic overactivity–the cinderella of cardiovascular risk factors in dialysis patients. *Semin Dial.*, 21(4)(4):326–330, 2008 Jul-Aug.
- [6] V.M. Campese, E. Kogosov, and M. Koss. Renal afferent denervation prevents the progression of renal disease in the renal ablation model of chronic renal failure in the rat. *Am J Kidney Dis*, 26(5):861–865, 1995.
- [7] R.L. Jr. Converse, T.N. Jacobsen, C.M. Toto, R.D. Jost, F. Cosentino, and R.G. Fouad-Tarazi, F. Victor. Sympathetic overactivity in patients with chronic renal failure. *N Engl J Med*, 327(27):1912–1928, 1992.

- [8] S. Ye, B. Ozgur, and V.M. Campese. Renal afferent impulses, the posterior hypothalamus, and hypertension in rats with chronic renal failure. *Kidney Int*, 51(3):722–777, 1997.
- [9] O. Vonend, T. Apel, K. Amann, L. Sellin, J. Stegbauer, E. Ritz, and L.C. Rump. Modulation of gene expression by moxonidine in rats with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 19(9):2217–2222, 2004.
- [10] V. Oberhauser, O. Vonend, and L.C. Rump. Neuropeptide y and atp interact to control renovascular resistance in the rat. *J Am Soc Nephrol*, 10(6):1179–1185, 1999.
- [11] O. Vonend, J. Stegbauer, J. Sojka, S. Habel, I. Quack, B. Robaye, J.M. Boeynaems, and L.C. Rump. Noradrenaline and extracellular nucleotide cotransmission involves activation of vasoconstrictive p2x(1,3)- and p2y6-like receptors in mouse perfused kidney. *Br J Pharmacol*, 145(1):66–74, 2005.
- [12] T.B. Huber, J. Gloy, A. Henger, P. Schollmeyer, R. Greger, P. Mundel, and H. Pavenstädt. Catecholamines modulate podocyte function. *J Am Soc Nephrol*, 9(3):335–345, 1998.
- [13] K. Amann, A. Koch, J. Hofstetter, M.L. Gross, C. Haas, S.R. Orth, H. Ehmke, Rump L.C., and E. Ritz. Glomerulosclerosis and progression: effect of subantihypertensive doses of alpha and beta blockers. *Kidney Int*, 60(4):1309–1323, 2001.
- [14] O. Vonend, V. Oberhauser, I. von Kügelgen, T.W. Apel, K. Amann, E. Ritz, and L.C. Rump. Atp release in human kidney cortex and its mitogenic effects in visceral glomerular epithelial cells. *Kidney Int*, 61(5):1617–1626, 2002.
- [15] O. Vonend, T. Grote, V. Oberhauser, I. von Kügelgen, and L.C. Rump. P2y-receptors stimulating the proliferation of human mesangial cells through the mapk42/44 pathway. *Br J Pharmacol*, 139(6):1119–1126, 2003.
- [16] L. Hein, J.D. Altman, and B.K. Kobilka. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*, 402(6578):181–184, 1999.

- [17] D.K. Vassilatis, J.G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J.E. Ranchalis, M.T. Mortrud, A. Brown, S.S. Rodriguez, J.R. Weller, A.C. Wright, J.E. Bergmann, and G.A. Gaitanaris. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8):4903–4908, 2003.
- [18] D.B. Bylund, D.C. Eikenberg, J.P. Hieble, S.Z. Langer, R.J. Lefkowitz, K.P. Minneman, P.B. Molinoff, R.R. Jr. Ruffolo, and A.U. Trendelenburg. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, 26(2):121–136, 1994.
- [19] S. Guimarães and D. Moura. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev*, 53(2):319–356, 2001.
- [20] L. Hein. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res*, 326(2):541–551, 2006.
- [21] J.D. Altman, A.U. Trendelenburg, L. MacMillan, D. Bernstein, L. Limbird, K. Starke, B.K. Kobilka, and L. Hein. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2a-adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*, 56(1):154–161, 1999.
- [22] P.A. van Zwieten and A. de Jonge. Interaction between the adrenergic and renin-angiotensin-aldosterone-systems. *Postgrad Med J*, 62(1):23–27, 1986.
- [23] S.R. Saxena. Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *J Cardiovasc Pharmacol*, 19(6):80–88, 1992.
- [24] G.F. DiBona. Peripheral and central interactions between the renin-angiotensin system and the renal sympathetic nerves in control of renal function. *Ann N Y Acad Sci*, 940:395–406, 2001.
- [25] J. Xu, G. Li, P. Wang, H. Velazquez, X. Yao, Y. Li, Y. Wu, A. Peixoto, S. Crowley, and G.V. Desir. Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure. *J Clin Invest*, 115(5):1275–1280, 2005.
- [26] M. Brede, G. Nagy, M. Philipp, J.B. Sorensen, M.J. Lohse, and L. Hein. Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Mol Endocrinol*, 17(8):1640–1646, 2003.

- [27] O. Vonend, S. Habel, J. Stegbauer, J. Roth, L. Hein, and L.C. Rump. alpha(2a)-adrenoceptors regulate sympathetic transmitter release in mice kidneys. *British Journal of Pharmacology*, 150:121–127, 2007.
- [28] B. Rumberger, O. Vonend, C. Kreutz, J. Wilpert, J. Donauer, K. Amann, J. Rohrbach, R. Timmer, G. Walz, and P. Gerke. cDNA microarray analysis of adaptive changes after renal ablation in a sclerosis-resistant mouse strain. *Kidney Blood Press Res*, 30(6):377–387, 2007.
- [29] L.J. Ma and A.B. Fogo. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int*, 64(1):350–355, 2003.
- [30] Lee M. Silver. *Mouse Genetics - Concepts and Applications*. Oxford University Press, 1995. Fig. 3.5.
- [31] J. Stegbauer, O. Vonend, S. Habel, I. Quack, L. Sellin, Volkmar. Gross, and L.C. Rump. Angiotensin ii modulates renal sympathetic neurotransmission through nitric oxide in at2 receptor knockout mice. *Journal of Hypertension*, 23:16911698, 2005.
- [32] R. Gilsbach, C. Röser, N. Beetz, M. Brede, K. Hadamek, M. Haubold, J. Leemhuis, M. Philipp, J. Schneider, M. Urbanski, B. Szabo, D. Weinschenker, and L. Hein. Genetic dissection of alpha2-adrenoceptor functions in adrenergic versus nonadrenergic cells. *Mol Pharmacol*, 75(5):1160–1170, 2009.
- [33] A.U. Trendelenburg, W. Klebroff, L. Hein, and K. Starke. A study of presynaptic alpha2-autoreceptors in alpha2a/d-, alpha2b- and alpha2c-adrenoceptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 364(2):117–130, 2001.
- [34] M. Brede, F. Wiesmann, R. Jahns, K. Hadamek, C. Arnolt, S. Neubauer, M.J. Lohse, and L. Hein. Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. *Circulation*, 106:2491–2496, 2002.
- [35] A.U. Trendelenburg, A. Meyer, W. Klebroff, S. Guimarães, and K. Starke. Crosstalk between presynaptic angiotensin receptors, bradykinin receptors and alpha2-autoreceptors in sympathetic neurons: a study in alpha2-adrenoceptor-deficient mice. *British Journal of Pharmacology*, 138:13891402, 2003.

- [36] V.M. Campese. Neurogenic factors and hypertension in renal disease. *Kidney Int*, 57(75):2–6, 2000.
- [37] H.A. Koomans, P.J. Blankestijn, and J.A. Joles. Sympathetic hyperactivity in chronic renal failure: a wake-up call. *J Am Soc Nephrol*, 14(3):524–537, 2004.
- [38] K. Starke and H.J. Schümann. Interactions of angiotensin, phenoxybenzamine and propranolol on noradrenaline release during sympathetic nerve stimulation. *Eur J Pharmacol*. 1972 Apr;18(1):27-30., 18(1):27–30, 1972.
- [39] H. Brasch, L. Sieroslowski, N. Bergmann, and P. Dominiak. In field-stimulated guinea-pig atria an at1-receptor mediated increase of noradrenaline release by angiotensin ii is seen only in the presence of prejunctional autoinhibition. *Adv Exp Med Biol*, 377:293–298, 1995.
- [40] S.L. Cox, V. Schelb, A.U. Trendelenburg, and K. Starke. Enhancement of noradrenaline release by angiotensin ii and bradykinin in mouse atria: evidence for cross-talk between g(q/11) protein- and g(i/o) protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*, 129(6):1095–1102, 2000.
- [41] C. Talaia, G. Queiroz, H. Pinheiro, D. Moura, and J. Gonçalves. Involvement of g-protein betagamma subunits on the influence of inhibitory alpha2-autoreceptors on the angiotensin at1-receptor modulation of noradrenaline release in the rat vas deferens. *Neurochem Int*, 49(7):698–707, 2006.
- [42] C. Talaia, G. Queiroz, C. Quintas, and J. Gonçalves. Interaction between adenosine a 2b-receptors and alpha2-adrenoceptors on the modulation of noradrenaline release in the rat vas deferens: possible involvement of a group 2 adenylyl cyclase isoform. *Neurochem Int*, 47(6):418–429, 2005.
- [43] A. Mota and S. Guimarães. Influence of alpha2-autoreceptor stimulation on the facilitation by angiotensin ii and bradykinin of noradrenaline release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 386(6):443–447, 2003.
- [44] K. Klein, M. Daschner, M. Vogel, J. Oh, T.J. Feuerstein, and F. Schaefer. Impaired autofeedback regulation of hypothalamic norepinephrine release in experimental uremia. *J Am Soc Nephrol*, 16(7):2081–2087, 2005.

- [45] J.A. Joles and H.A. Koomans. Causes and consequences of increased sympathetic activity in renal disease. *Hypertension*, 43(4):699–706, 2004.
- [46] P. Kotanko. Cause and consequences of sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease. *Blood Purif*, 24(1):95–99, 2006.
- [47] S. Boehm and H. Kubista. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev*, 54(1):43–99, 2002.
- [48] A. Cavalli, A.L. Lattion, E. Hummler, M. Nenniger, T Pedrazzini, J.F. Aubert, M.C. Michel, M. Yang, G. Lembo, C. Vecchione, M. Mostardini, A. Schmidt, F. Beermann, and S. Cotecchia. Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(21):11589–11594, 1997.
- [49] H.Y. Chang, R.M. Klein, and G. Kunos. Selective desensitization of cardiac beta adrenoceptors by prolonged in vivo infusion of catecholamines in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 221(3):784–789, 1982.
- [50] C. Nanoff, M. Freissmuth, E. Tuisl, and W. Schütz. A different desensitization pattern of cardiac beta-adrenoceptor subtypes by prolonged in vivo infusion of isoprenaline. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989 Feb;13(2):198-203., 13(2):198–203, 1989.
- [51] J. Stegbauer, V. Oberhauser, O. Vonend, and L.C. Rump. Angiotensin-(1-7) modulates vascular resistance and sympathetic neurotransmission in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, 61(2):352–359, 2004.
- [52] C.S Bockman, I. Gonzalez-Cabrera, and P.W. Abel. Alpha-2 adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 278(3):1235–1243, 1996.
- [53] R.E. Link, K Desai, L. Hein, M.E. Stevens, A. Chruscinski, D. Bernstein, G.S. Barsh, and B.K. Kobilka. Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science*, 273(5276):803–805, 1996.

- [54] G.P. McCafferty, D.P. Naselsky, and J.P. Hieble. Characterization of postjunctional alpha-adrenoceptors in the pithed mouse. *Gen Pharmacol*, 33(1):99–105, 1999.
- [55] M.A. Chotani, S. Flavahan, S. Mitra, D. Daunt, and N.A. Flavahan. Silent alpha(2c)-adrenergic receptors enable cold-induced vasoconstriction in cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(4):1075–1083, 2000.
- [56] P.M. Vanhoutte. Endothelial adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol*, 38(5):796–808, 2001.
- [57] C. Bohmann, W. Rist, P. Schollmeyer, and L.C. Rump. Low concentrations of angiotensin ii unmask vasoconstrictory alpha 2-adrenoceptors in isolated perfused kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, 30(6):857–865, 1995.
- [58] M.M. Shafaroudi, M. McBride, C. Deighan, A. Wokoma, J. Macmillan, C.J. Daly, and J.C. McGrath. Two "knockout" mouse models demonstrate that aortic vasodilatation is mediated via alpha2a-adrenoceptors located on the endothelium. *J Pharmacol Exp Ther*, 314(2):804–810, 2005.
- [59] E.K. Jackson, W.A. Herzer, C.K. Jr. Kost, and S.J. Vyas. Enhanced interaction between renovascular alpha(2)-adrenoceptors and angiotensin ii receptors in genetic hypertension. *Hypertension*, 38(3):353–360, 2001.
- [60] L. Gao, C. Zhu, and E.K. Jackson. alpha 2-adrenoceptors potentiate angiotensin ii- and vasopressin-induced renal vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 305(2):581–586, 2003.
- [61] E.K. Jackson, L. Gao, and C. Zhu. Mechanism of the vascular angiotensin ii/alpha2-adrenoceptor interaction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Sep;314(3):1109-16, 314(3):1109–1116, 2005.
- [62] E.K. Jackson, D.G. Gillespie, C. Zhu, J. Ren, L.C. Zacharia, and Z. Mi. Alpha2-adrenoceptors enhance angiotensin ii-induced renal vasoconstriction: role for nadph oxidase and rhoa. *Hypertension*, 51(3):719–726, 2008.
- [63] M. Rupérez, E. Sánchez-López, LM. Blanco-Colio, V. Esteban, J. Rodríguez-Vita, J.J. Plaza, J. Egido, and M. Ruiz-Ortega. The rho-kinase pathway regulates

- angiotensin ii-induced renal damage. *Kidney Int Suppl.* 2005 Dec;(99):S39-45., 99:39–45, 2005.
- [64] M. Ruiz-Ortega, V. Esteban, M. Rupérez, E. Sánchez-López, J. Rodríguez-Vita, G. Carvajal, and J. Egido. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin ii. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 15(2):159–166, 2006.
- [65] M. Ruiz-Ortega, M. Rupérez, V. Esteban, J. Rodríguez-Vita, E. Sánchez-López, G. Carvajal, and J. Egido. Angiotensin ii: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*, 21(1):16–20, 2006.
- [66] G. Li, J. Xu, P. Wang, H. Velazquez, Y. Li, Y. Wu, and G.V. Desir. Catecholamines regulate the activity, secretion, and synthesis of renalase. *Circulation*, 117(10): 1277–1282, 2008.

# A Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Lars Christian Rump für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe der experimentellen Nephrologie.

Einen besonderen Dank gilt meinem Betreuer Herrn Privatdozent Dr. Oliver Vonend, der mir das spannende Thema der Dissertation überlassen hat und zur ständigen Hilfestellung bereit war. Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Johannes Stegbauer, der mir mit seiner Erfahrung bei den Versuchen und der Erstellung der Arbeit hilfreich zur Seite stand.

Im Weiteren möchte ich Frau Blanka Duvnjak (MTA) für ihre Hilfe in Fragen der Labortechnik und Versuche danken. Auch bedanke ich mich bei Frau Dr. Sina Habel und Frau Yvonne Kuczka, die mich mit den Versuchsabläufen vertraut gemacht haben.

Ich danke meinen Mitdoktoranden Sebastian Friedrich, Maike Baranski, Johannes Wagenhäuser und Seena Sebastian für eine unvergessliche Zeit im Labor.

Ein zusätzliches Dankeschön gilt Herrn Dr. Ivo Quack, Herrn Thomas Scholtysik, Frau Silvia Seubert und Frau Dr. Stefanie Gaupp.

Natürlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung.

## B Beruflicher Werdegang

### Studium

- 2003 **Aufnahme des Medizinstudiums**, Ruhr-Universität, Bochum.
- 2003-2005 **Vorklinik**, Ruhr-Universität, Bochum.
- 2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2005-2009 **Klinik**, Ruhr-Universität, Bochum.  
Praktisches Jahr:  
Tertial Innere Medizin an der Nepean Clinical School in Sydney und St.Josefs-Hospital in Bochum.  
Tertial Chirurgie am Kantonsspital Münsterlingen in der Schweiz.  
Tertial Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde im St.Elisabeth-Hospital in Bochum.
- 2009 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Beruf

- ab Januar 2010 **Assistenzarzt an der Klinik für Nephrologie**, Universitätsklinikum Düsseldorf, Deutschland.

### Veröffentlichungen

- Dezember 2010 **Regulation of renal sympathetic neurotransmission by  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors is impaired in chronic renal failure**, Henning Hoch, Johannes Stegbauer, Sebastian A. Potthoff, Ivo Quack, Lutz Hein, Lars Christian Rump und Oliver Vonend, British Journal of Pharmacology.