

Aus der Klinik für Nephrologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lars-Christian Rump

Bedeutung des α_{2A} -Adrenozeptors
für renale Immunzellinfiltration und Fibrose

Dissertation

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

Vorgelegt von

Annika Reil

2021

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Johannes Stegbauer

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. Miriam Cortese-Krott

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hering L, Rahman M, Hoch H, Markó L, Yang G, **Reil A**, Yakoub M, Gupta V, Potthoff S, Vonend O, Ralph D, Gurley S, McDonough A, Rump L, Stegbauer J, (2020), α 2A-Adrenoceptors Modulate Renal Sympathetic Neurotransmission and Protect against Hypertensive Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, (Vol. 31), p. 783–798.

Zusammenfassung

Die Prävalenz der chronischen Nierenkrankheit (CKD) liegt bei ca. 10-15 % der Allgemeinbevölkerung weltweit. Es besteht eine hohe kardiovaskuläre Mortalität und eine Nierenersatztherapie wird unabhängig von der Grunderkrankung oft benötigt. Das progressive und terminale Nierenversagen ist bedingt durch überschießende Entzündungsprozesse, die histologisch zu einer tubulointerstitiellen Fibrose führen. Dabei sind die genauen Mechanismen, die dazu beitragen, weitestgehend unverstanden. Patienten mit CKD haben eine gesteigerte sympathische Aktivität, welche durch eine erhöhte Noradrenalin-Freisetzung gekennzeichnet ist. Noradrenalin vermittelt als wichtigster sympathischer Neurotransmitter diese Effekte über Aktivierung von α - und β -Adrenozeptoren (AR). Die α_{2A} -AR in adrenergen Zellen regulieren den Sympathikotonus durch Kontrolle der Noradrenalin-Freisetzung aus adrenergen Zellen mithilfe einer *Feedback Inhibition*. Zusätzlich befinden sich α_{2A} -AR auch auf non-adrenergen Nierenepithel- und Immunzellen. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurde in α_{2A} -AR-Knockout Mäusen (KO Mäuse) durch den Wegfall der Autoinhibition über präsynaptische α_{2A} -AR eine gesteigerte Noradrenalin-Freisetzung beobachtet, dennoch zeigte sich unerwartet an Mausmodellen der CKD eine signifikante Abschwächung der renalen Fibrose und ein verlängertes Überleben der Tiere. Diese Befunde legen nahe, dass die α_{2A} -AR auf non-adrenergen Zellen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der CKD spielen. Ziel dieser Arbeit war es, zwischen den Effekten der α_{2A} -AR auf adrenergen und non-adrenergen Zellen zu differenzieren und zu untersuchen, ob die Aktivierung von α_{2A} -AR auf non-adrenergen Zellen der Niere und des Immunsystems eine renale Entzündungsreaktion bewirkt. Aus diesem Grund wurde eine Maus generiert, die durch den Dopamin- β -Hydroxylase-Promotor (Dbh) nur über die α_{2A} -AR in adrenergen Zellen verfügt. Nach Induktion einer chronischen Nierenschädigung durch eine unilaterale Ureter-Obstruktion (UUO) wurden in den drei Mausstämmen das Ausmaß der CKD und die Rolle des α_{2A} -AR auf non-adrenergen Zellen bei der Entstehung von renaler Inflammation und Fibrose untersucht. Die renale Noradrenalin-Freisetzung war in den KO Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp (WT) und Dbh Mäusen signifikant gesteigert. In den Dbh Mäusen lag sie wiederum auf dem Niveau der WT Mäuse. Dies zeigt, dass das Dbh Mausmodell funktioniert. Die renale Makrophageninfiltration, erfasst durch F4/80 Färbung, und Fibrose, analysiert durch Kollagen 1 Expression, war in den KO Mäusen signifikant reduziert. Die Dbh Mäuse lagen mit ihrem Ausmaß an Makrophageninfiltration und Fibrose höher als die der KO und geringer als die der WT Mäuse. Als mögliche Erklärung dieser Beobachtungen konnte eine Hochregulation des α_{2A} -AR nach UUO in den Nieren der WT Mäuse festgestellt werden. Zudem zeigten die Knochenmarksmakrophagen der WT Mäuse eine signifikant stärkere Expression von proinflammatorischen M1-Markern, wohingegen die KO Mäuse eine signifikant vermehrte Expression von immunsuppressiven M2-Markern aufwiesen. Der α_{2A} -AR wurde auf Makrophagen, isoliert aus Nierengewebe, nachgewiesen. Des Weiteren konnte die Expression des α_{2A} -AR auf T-Lymphozyten und Sammelrohrzellen der Niere gezeigt werden. Weitergehende Forschungen zu diesen Rezeptoren könnten zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für Patienten mit CKD beitragen.

Abstract

The prevalence of chronic kidney disease (CKD) is about 10-15 % in the general population. These patients have a high cardiovascular mortality and renal replacement therapy becomes often necessary regardless of the underlying disease. CKD is caused by excessive inflammatory processes, which histologically lead to tubulointerstitial fibrosis. The exact mechanisms triggering this pathway are unknown. In patients with CKD, sympathetic nerve activity is significantly increased, which is characterized by an increased release of norepinephrine. Norepinephrine, the most important sympathetic neurotransmitter, mediates these effects by activating α - and β -adrenoreceptors (AR). Alpha_{2A}-AR in adrenergic cells regulate the sympathetic activity by controlling the release of norepinephrine from adrenergic cells with the help of a feedback inhibition. The α_{2A} -ARs are also expressed on non-adrenergic kidney epithelial and immune cells. Preliminary data from our group showed an increased release of norepinephrine in α_{2A} -AR knockout (KO) mice due to the elimination of autoinhibition via presynaptic α_{2A} -AR. Unexpectedly, we observed a significant attenuation of renal fibrosis as well as prolonged survival in KO mice in two different models of experimental CKD. These findings support the hypothesis that α_{2A} -AR on non-adrenergic cells play an important role in the development of CKD. The aim of this work was to differentiate between the effects of α_{2A} -AR on adrenergic and non-adrenergic cells and to investigate whether the activation of α_{2A} -AR on non-adrenergic cells of the kidneys and the immune system causes a renal inflammatory reaction and fibrosis. For this reason, we used α_{2A} -AR KO mice in which presynaptic α_{2A} -ARs are restored in adrenergic cells under the control of the dopamine β -hydroxylase (Dbh) promoter. After induction of chronic kidney damage through unilateral ureteral obstruction (UUO), the extent of CKD and the role of the α_{2A} -AR on non-adrenergic cells in the development of renal inflammation were investigated in the three mouse strains. Renal norepinephrine release induced after renal nerve stimulation (RNS) was significantly increased in the KO mice compared to the wildtype (WT) and Dbh mice. In Dbh mice, RNS-induced renal sympathetic norepinephrine release was comparable to WT mice. This shows that the Dbh mice model is working. Macrophage infiltration, assessed by F4 / 80 staining, and fibrosis, analyzed by collagen 1 expression, were significantly reduced in the KO mice. The extent of macrophage infiltration and fibrosis in Dbh mice was higher than that of KO mice and lower than that of WT mice. A possible explanation for these observations was an upregulation of α_{2A} -ARs after UUO in the kidneys of WT mice. In addition, macrophages derived from the bone marrow of WT mice showed a significantly higher expression of proinflammatory M1-markers, whereas KO mice showed a significantly increased expression of immunosuppressive M2-markers. The α_{2A} -AR could be detected on macrophages isolated from kidney tissue. In addition, the expression of α_{2A} -AR on T-cells and collecting duct cells of the kidneys could be detected as well. Further research on these receptors could contribute to the development of new therapeutic approaches for patients with CKD.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APS	<i>Ammonium persulfate solution</i>
Arg	Arginase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CKD	chronische Nierenkrankheit
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DAB	Diaminbenzol
Dbh	Dopamin-β-Hydroxylase
DHBA	Dihydroxybenzylamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
g	Gramm
G	Gauge
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hz	Hertz
IL	Interleukin
IL-1R1	Interleukin-1-Rezeptor Typ 1
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kb	Kilo-Basenpaare
kg	Kilogramm

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KIM1	<i>Kidney injury molecule 1</i>
KO	Knockout
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
mA	Milliampere
MCP1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
Mrc1	Mannoserezeptor Typ 1
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
ms	Millisekunde
NA	Noradrenalin
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ SO ₃	Natriumsulfit
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
nm	Nanometer
Ø	Durchmesser
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pg	Pikogramm
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Renale Nervenstimulation
RTq-PCR	<i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SMA	Smooth muscle actin
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF-β1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i>
U	<i>Units</i>

USA	<i>United States of America</i>
UUO	Unilaterale Ureter Obstruktion
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben
α	alpha
γ	gamma

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Niereninsuffizienz	1
1.2 Das sympathische Nervensystem	2
1.3 Der α_{2A} -Adrenozeptor	3
1.4 Bedeutung des α_{2A} -Adrenozeptors bei chronischer Nierenkrankheit	4
1.5 Der α_{2A} -Adrenozeptor und renale Inflammation	5
1.6 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit	7
2. Material und Methoden	9
2.1 Versuchstiere	9
2.2 Narkose	11
2.3 Isoliert perfundierte Mausniere	11
2.3.1 Präparation der Nieren	12
2.4 Quantitative Bestimmung von Noradrenalin	14
2.4.1 Versuchsablauf	14
2.4.2 Probenaufbereitung	15
2.4.3 Auswertung der Noradrenalin-Freisetzung	17
2.5 Unilaterale Ureter-Obstruktion	18
2.5.1 Organentnahme nach unilateraler Ureter-Obstruktion	18
2.6 Isolation von murinen Makrophagen	20
2.6.1 Isolation von peritonealen Makrophagen	20
2.6.2 Stimulation der peritonealen Makrophagen	22
2.6.3 Färbung der Makrophagen	22
2.6.4 Isolation von Makrophagen aus der Niere	23
2.6.5 Isolation von Makrophagen aus dem Knochenmark	23
2.7 Isolation von murinen T-Lymphozyten	24
2.8 Isolation von murinen Sammelrohrzellen	25
2.9 Semi-quantitative <i>Real-Time</i> PCR	25
2.10 Histologische und immunhistochemische Techniken	28
2.10.1 Histologische Fixierung der Gewebe	28
2.10.2 Allgemeine Schritte bei histologischen Färbungen	29
2.10.3 Makrophagenfärbung mittels F4/80-Antigen	29
2.10.4 Kollagenfärbung mittels Sirius Red / Fast Green	31

2.11	Kollagenexpression mittels Western Blot	31
2.11.1	Proteinisolierung	31
2.11.2	Proteinbestimmung	32
2.11.3	Herstellung der Gele	32
2.11.4	Gelelektrophorese und Western Blot	33
2.12	Statistik	34
3.	Ergebnisse	34
3.1	Charakterisierung des Genotyps	34
3.2	Isoliert perfundierte Mausniere	36
3.2.1	Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation	36
3.3	Vergleich von Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen nach unilateraler Ureter-Obstruktion	37
3.3.1	Makrophageninfiltration als Parameter für renale Inflammation	37
3.3.2	Kollagenexpression als Parameter für renale Fibrose	39
3.3.3	Renale Expression von Zytokinen und Biomarkern	43
3.3.4	Regulation des α_{2A} -Adrenozeptors nach UUO	44
3.4	Einfluss von Makrophagen auf renale Fibrose und Inflammation	45
3.4.1	Differenzierung der murinen Makrophagen in M1- und M2-Makrophagen	48
3.5	Expression des α_{2A} -Adrenozeptors auf anderen Zelltypen	50
4.	Diskussion	52
4.1	Erfolgreiche Generierung der Dbh- α_{2A} -transgenen Maus	52
4.2	Renale Neurotransmission in der Dbh- α_{2A} -transgenen Maus im Vergleich zur α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Maus	53
4.3	Beurteilung der renalen Inflammation und Fibrose	54
4.4	Hochregulation des α_{2A} -Adrenozeptors in CKD	58
4.5	Unterschiede bei der Differenzierung der murinen Makrophagen in M1- und M2-Makrophagen	59
4.5	Charakterisierung der verantwortlichen Zellart	59
4.5.1	Makrophagen	59
4.5.2	T-Lymphozyten	61
4.5.3	Das Tubulussystem der Niere	62
4.6	Schlussfolgerung	63
	Literaturverzeichnis	65

1. Einleitung

1.1 Niereninsuffizienz

Inzidenz und Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz nahmen in den letzten Jahrzehnten sowohl in den USA als auch in Westeuropa zu. Laut Zahlen des *US Renal Data System 2019 Annual Data Report* stieg die allgemeine Prävalenz chronischen Nierenleidens in den USA von 2000 bis 2017 von 2,5 auf 14,5 % an. 2017 gab es 124.500 neue Fälle von terminaler Niereninsuffizienz und insgesamt 746.557 Patienten, die aufgrund von terminaler Niereninsuffizienz behandelt wurden. Zudem stellt dies auch eine wirtschaftliche Belastung dar. Über 84 Milliarden Dollar wurden im Jahr 2017 für die medizinische Versorgung aller Stadien von Nierenerkrankungen ausgegeben. [2]

Ähnliche Daten wurden für die Bundesrepublik Deutschland erhoben. Nach dem letzten Bericht der QuaSi-Niere gGmbH für die Jahre 2006/2007 erhielten am Ende des Jahres 2006 66.508 Patienten eine Dialysetherapie und 25.210 Patienten befanden sich in der Nachsorge nach Nierentransplantation. [3] Im Jahr 2019 wurden nach Angaben der Deutschen Stiftung Organtransplantation 2.799 Patienten zur Nierentransplantation angemeldet und 2.132 Patienten Nieren transplantiert. [4]

Chronische und terminale Niereninsuffizienz sind zwei der bedeutendsten unabhängigen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität. [5] Die chronische Nierenkrankheit ist durch eine fortschreitende Fibrose gekennzeichnet. Diese ist das Ergebnis der unzureichenden Auflösung einer Entzündung, die aufgrund von inadäquatem Organumbau oder einer Organschädigung entstanden ist. [6] Renale Fibrogenese und Inflammation führen somit schlussendlich zu chronischer Nierenschädigung. [7] Jedoch sind die genauen Pathomechanismen, die dies auslösen, unvollständig verstanden. Bekannt ist jedoch, dass eine erhöhte sympathische Aktivität bei der Progression der Erkrankung und bei der Entstehung von kardiovaskulären Komplikationen eine wesentliche Rolle spielt. [8] Dabei korreliert die sympathische Aktivität eng mit der Konzentration an Noradrenalin im Plasma [9]. Welche Rolle die sympathischen Neurotransmitter bei der Progression der

Niereninsuffizienz genau spielen, ist noch unbekannt. Beobachtet wurden bisher zum einen eine Erhöhung des renovaskulären Widerstandes [10, 11] sowie direkte Effekte der Katecholamine und ihrer Metabolite auf die Podozytenfunktion sowie renovaskuläre und mitogene Effekte. [12-15] Zum Beispiel führt die adrenerge Stimulation des humanen Nierenkortex zur Freisetzung von ATP, welches mitogene Effekte auf glomeruläre Epithelzellen hat und somit womöglich zur Progression chronischer Nierenerkrankungen beiträgt. [13] Des Weiteren wurden Noradrenalin pro-fibrotische Effekte zugeschrieben, indem es unter anderem zur Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten beiträgt. Es kam in renalen Tubuluszellen durch Hinzugabe von Noradrenalin zu einer Freisetzung von TGF- β 1 und CTGF, die zentrale Mediatoren für den Organumbau und die Fibrogenese darstellen. [7] Zudem wurden sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte des Noradrenalins auf die Niere diskutiert. [16]

1.2 Das sympathische Nervensystem

Das sympathische Nervensystem und sein Gegenspieler, der Parasympathikus, bilden gemeinsam das vegetative Nervensystem. Der Sympathikus spielt bei der Regulation des Blutdrucks, der kardiovaskulären und auch der Nierenfunktionen eine wesentliche Rolle. Es gibt verschiedene sympathische Neurotransmitter wie z.B. Adrenalin, Noradrenalin, ATP und Neuropeptid Y. Dabei ist der wichtigste jedoch das Noradrenalin, welches seine Effekte über Adrenozeptoren vermittelt. [17] Dazu gehören die α_1 -, α_2 - und β_{1-3} -Adrenozeptoren. Es handelt sich dabei um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. [18] Diese bestehen aus Untereinheiten mit sieben transmembranären Helixstrukturen, die durch jeweils drei extra- und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Von jeder Rezeptorgruppe gibt es verschiedene Subtypen. So unterscheidet man bei den α_1 -Adrenozeptoren die Subtypen α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} Bei den α_2 -Adrenozeptoren unterscheidet man die Subtypen α_{2A} (Mensch)/D(Maus), α_{2B} sowie α_{2C} . Die β -Adrenozeptoren werden in β_1 , β_2 und β_3 unterteilt. [19]

Die Verteilung der Rezeptoren im Gewebe ist unterschiedlich. So finden sich zum Beispiel in der Niere und im Splanchnikus-Gebiet überwiegend α -Adrenozeptoren, in der Skelettmuskulatur vor allem β_2 -Adrenozeptoren. [20, 21] Auch die vermittelten Effekte und die Affinität für ihre Transmitter unterscheiden sich innerhalb der Rezeptortypen. Der α_1 -Adrenozeptor vermittelt vor allem Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion und Natriumrückresorption und verstärkt somit die Progression von Hypertonie und chronischer

Niereninsuffizienz. Dahingegen führt die Aktivierung von präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptoren zu einer Reduktion der sympathischen Transmittermenge. Dies geschieht durch die verminderte Freisetzung von Noradrenalin und trägt somit zu einer verminderten Progression von chronischen Nierenschäden bei. [22] Zudem gibt es α_{2A} -Adrenozeptoren auch auf nicht-adrenergen Zellen, deren Aktivierung unter anderem Bradykardie und Hypotonie induziert und Immunreaktionen vermittelt. [28, 29]. Der β_1 -Adrenozeptor ist hauptsächlich für die positive Inotropie, Chronotropie, Dromotropie und Bathmotropie am Herzen und die Renin-Freisetzung in der Niere verantwortlich. Vaso- und Bronchodilatation werden durch den β_2 -Adrenozeptor und die Lipolyse im braunen Fettgewebe durch den β_3 -Adrenozeptor vermittelt. Adrenalin wirkt auf alle Adrenozeptoren, wohingegen Noradrenalin vor allem starke Wirkung auf die α -Adrenozeptoren und wenig Wirkung auf β_2 -Adrenozeptoren hat. [19, 23]

1.3 Der α_{2A} -Adrenozeptor

In der Gruppe der α_2 -Adrenozeptoren existieren drei Subtypen - α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} [19]. Ihre Funktion und Lokalisation sind unterschiedlich. [19, 24] α_2 -Adrenozeptoren sind sich bei Maus und Mensch qualitativ sehr ähnlich, der α_{2A} -Subtyp in der Maus wird auch als α_{2D} -Subtyp bezeichnet. Der α_{2B} -Adrenozeptor spielt eine Rolle bei der Entwicklung der Plazenta und der Lunge [25, 26], wohingegen der α_{2C} -Adrenozeptor die Noradrenalin-Freisetzung aus dem Nebennierenmark [27, 28] reguliert. Der α_{2A} -Adrenozeptor ist für die meisten physiologischen und pharmakologischen Funktionen verantwortlich und spielt somit eine entscheidende Rolle im kardiovaskulären System. [29] Es gibt sowohl präsynaptische als auch postsynaptische α_{2A} -Adrenozeptoren. Die präsynaptischen Rezeptoren sind in präsynaptischen Endigungen lokalisiert und dienen dort als Autorezeptoren. Autorezeptoren sind nur empfindlich gegenüber Neurotransmittern, die aus der Zelle ausgeschüttet werden, auf welcher der Rezeptor sitzt. Kommt das vom terminalen Axon ausgeschüttete Noradrenalin in Kontakt mit dem präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptor auf dem Axonende, wird die weitere Noradrenalin-Freisetzung gehemmt. Hierbei spricht man von *Feedback Inhibition*. [30] Die postsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptoren dienen als Heterorezeptoren. Heterorezeptoren sind empfindlich gegenüber Neurotransmittern, die von der Zelle, auf der der Rezeptor sitzt, nicht freigesetzt werden. Die postsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptoren befinden sich auf nicht-adrenergen Zellen und ihre Aktivierung induziert unter anderem

Bradykardie, Hypotonie und vermittelt Immunreaktionen (Abbildung 1.1). Im zentralen Nervensystem spielen sie zusätzlich bei der Analgesie und Sedierung eine Rolle. [31, 32]

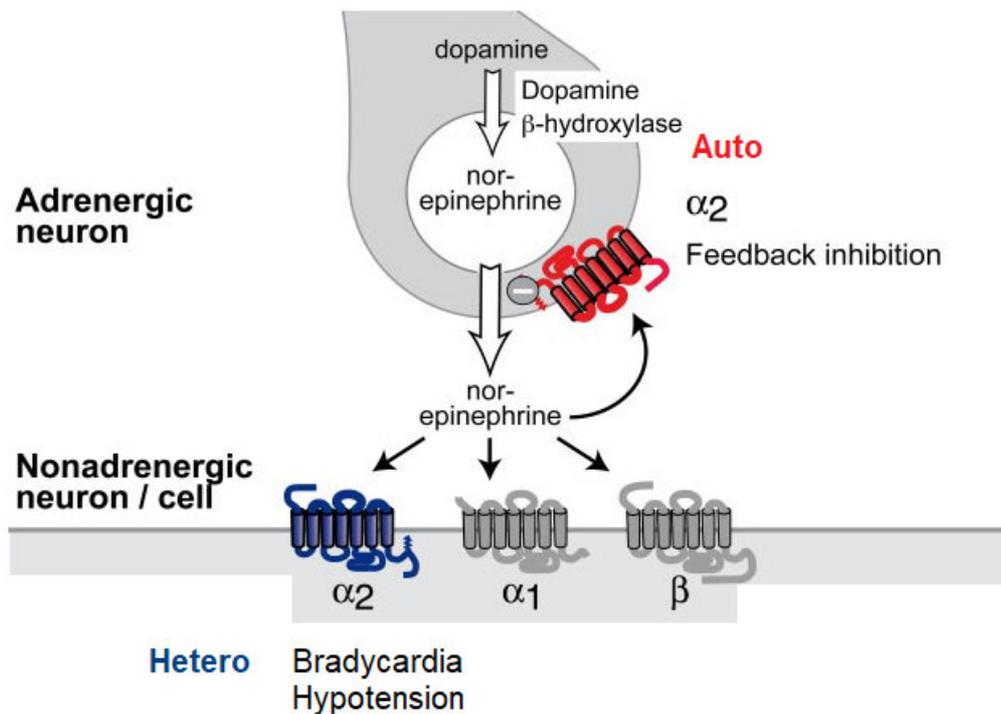


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der α_{2A} -Adrenozeptoren und ihrer Lokalisation. α_{2A} -Adrenozeptoren in nicht-adrenergen Zellen vermitteln unter anderem Bradykardie und Hypotonie. Präsynaptische α_{2A} -Adrenozeptoren inhibieren die präsynaptische Freisetzung von Noradrenalin. Adaptiert nach [30]

1.4 Bedeutung des α_{2A} -Adrenozeptors bei chronischer Nierenkrankheit

Aufgrund der Physiologie des α_{2A} -Adrenozeptors besteht die Möglichkeit, gezielt die α_{2A} -Adrenozeptoren mittels eines Gen-Knockouts zu eliminieren. So wurde eine α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Maus generiert, die nicht über α_{2A} -Adrenozeptoren verfügt. [33] Untersuchungen von Brede et. al und Altman et. al konnten bei diesen Mäusen eine erhöhte Noradrenalin-Konzentration im Plasma und somit eine erhöhte sympathische Aktivität, im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nachweisen. [28, 34] Dies lässt sich durch die fehlende Autoinhibition der Noradrenalin-Freisetzung erklären. Die erhöhte sympathische Aktivität nach Deletion des α_{2A} -Adrenozeptors macht sich ebenso durch eine Tachykardie in Ruhe bemerkbar. [34]

Brede et. al konnten zeigen, dass α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse anfälliger für kardiale Hypertrophie und Herzversagen als Reaktion auf eine chronische Druckbelastung sind. Dies limitiert ihr Überleben im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. [27]

Hoch et. al zeigten, dass die Neurotransmission von Noradrenalin in der Niere nach renaler Nervenstimulation in den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen signifikant erhöht ist. Dies weist auf eine gesteigerte sympathische Aktivität hin. Nach subtotaler Nephrektomie, als ein experimentelles Modell von CKD, zeigten die Wildtyp Mäuse nach renaler Nervenstimulation eine erhöhte Noradrenalin-Freisetzung. In Wildtyp Mäusen induzierte die renale Nervenstimulation nach Applikation des α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin eine Noradrenalin-Freisetzung, die konzentrationsabhängig anstieg. Dahingegen führte die Applikation des Antagonisten in den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen nicht zu einem Anstieg der Noradrenalin-Freisetzung. [35] Es wurde dennoch überraschenderweise ein verlängertes Überleben der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse und eine Reduktion von Albuminurie nach subtotaler Nephrektomie, ein experimentelles Modell zur Induktion von chronischem Nierenversagen, beobachtet. [36]

Somit zeigt sich zum einen eine gesteigerte sympathische Aktivität bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen, jedoch ein verlängertes Überleben nach experimenteller Induktion einer CKD.

1.5 Der α_{2A} -Adrenozeptor und renale Inflammation

Anhand dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, welcher Zelltyp für die beobachteten Effekte in der Niere verantwortlich sein könnte.

Die Progression von Nierenerkrankungen beinhaltet eine Interaktion zwischen infiltrierenden T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen. Inadäquate T-Zell-Reaktionen verursachen Immunreaktionen, die die Niere beeinflussen und somit Glomerulopathien verursachen können. T-Zellen sezernieren Zytokine, aktivieren Makrophagen und stimulieren diese dazu, pro-inflammatorische Mediatoren zu produzieren. [37] Makrophagen und ihre zirkulierenden Vorstufen, die Monozyten, sind vorwiegend verantwortlich für Fibrogenese und progressive fibrotische Narbenbildung. [38]

Die Entfernung von Makrophagen führte zu einer deutlichen Verringerung der Fibrose. Albuminurie blieb aus und es kam zu einer Reduktion von Glomerulosklerose. [39] Makrophagen haben in der Niere je nach Subtyp zwei konträre Funktionen. Nach Infiltration der Niere sezernieren M1-Makrophagen pro-inflammatorische Zytokine, die Gewebeschäden durch verstärkte Inflammation und letztendlich Fibrose begünstigen. Auf der anderen Seite sezernieren die M2-Makrophagen immunsuppressive Mediatoren, begünstigen Angiogenese, Zellproliferation und Wundheilung. [38, 40] Bei einer renalen Schädigung und ihrer Reparatur herrscht eine Balance zwischen Zellverlust und Zellproliferation sowie zwischen Makrophagen-abhängiger Akkumulation der interstitiellen Matrix und ihrem Umbau. [38] Flierl et. al identifizierten Phagozyten als Promotor für pulmonale Inflammation und Fibrose, wohingegen sie den T-Zellen bei diesem Prozess keine wesentliche Rolle zuschrieben. [41]

Tubulointerstitielle Schädigung ist bei allen chronischen progressiven Nierenerkrankungen häufig zu beobachten. Sie ist durch die Infiltration von inflammatorischen Zellen, Verlust von peritubulären Kapillaren, Tubulusatrophie und interstitielle Vernarbung gekennzeichnet. [42, 43] Die Sammelrohre der Niere, der letzte Teil, in dem der Elektrolyt- und Wasserhaushalt beeinflusst wird, scheinen an der Progression von tubulointerstitieller Inflammation und Fibrose beteiligt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die Sammelrohre eine zentrale Rolle bei der Reaktion auf renale Schädigung spielen. Dies geschieht, indem sie inflammatorische Monozyten rekrutieren, die das Fortschreiten der tubulointerstitiellen Inflammation, die Differenzierung von epithelialen Sammelrohrzellen in mesenchymale Fibroblasten und die Differenzierung von Monozyten in M1- oder M2-Makrophagen beeinflussen. [42, 44]

Die Elimination renaler sympathischer Nervenfasern durch renale Denervierung in Mäusen nach unilateraler Ureter-Obstruktion verhinderte Fibrogenese und Inflammation in den Nieren und reduzierte die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen. [7] In Ratten verbesserte renale Denervierung Albuminurie, Collagen IV Deposition und die Akkumulation von Makrophagen in den Nieren nach experimenteller Glomerulonephritis. [45] In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde die Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren und somit die Reduktion der sympathischen Aktivität als eine Therapie von chronischen Nierenerkrankungen in experimentellen [22] und klinischen [46] Studien beschrieben. Das Sympathikolytikum Moxonidin führte zu einer Verzögerung der renalen Progression in Ratten mit einer chronischen Niereninsuffizienz,

herbeigeführt durch subtotale Nephrektomie [22] oder unilaterale Ureter-Obstruktion [47]. In einer nicht blutdruckwirksamen Konzentration senkte Moxonidin nach subtotaler Nephrektomie die Albuminurie und verminderte die Entwicklung von Glomerulosklerose. [22] Nach unilateraler Ureter-Obstruktion waren tubuläre und glomeruläre Schäden, tubuläre Dilatation, Apoptosen und die Kollagenexpression in Ratten, die mit Moxonidin behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert. [47] Außerdem profitierten Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz von einer Therapie mit niedrig dosiertem Moxonidin. Diese klinische Studie zeigte, dass die Therapie die sympathische Hyperaktivität verbesserte, jedoch ohne eine hämodynamische Beeinträchtigung herbeizuführen. [46]

Im Gegensatz dazu konnten Kim et al. jedoch zeigen, dass die Inhibition von α_2 -Adrenozeptoren in Mäusen nach unilateraler Ureter-Obstruktion zu einer Reduktion von Fibrose führt. Dies geschah durch Modulierung der inflammatorischen Reaktion in Nieren nach unilateraler Ureter-Obstruktion. Sie zeigten, dass sich die Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren ungünstig auf die Progression von renaler Schädigung, Inflammation und Fibrogenese auswirkt. [7] Ähnliche Ergebnisse zeigten Studien bezüglich experimenteller Lungenschädigung. Die Blockierung von α_2 -Adrenozeptoren auf Makrophagen suppressierte die Inflammation in der Lunge, wohingegen die Aktivierung der Rezeptoren die Inflammation verschlimmerte. [41]

Daher scheinen die α_2 -Adrenozeptoren auf adrenergen oder nicht-adrenergen Zellen, z.B. Immunzellen, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von renaler Inflammation und Fibrose zu spielen. Ihre unterschiedliche zelluläre Lokalisation ist möglicherweise der Grund für diese kontroversen Beobachtungen.

1.6 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit, ist den Einfluss des α_{2A} -Adrenozeptors auf renale Inflammation und Fibrose zu untersuchen. Dafür gilt es zwischen den Effekten der präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptoren in adrenergen Zellen und der α_{2A} -Adrenozeptoren in nicht-adrenergen Immunzellen und renalen Epithelzellen auf die Regulation von renaler Fibrose, Immzellinfiltration und Inflammation zu differenzieren.

Um zu überprüfen, ob α_{2A} -Adrenozeptoren auf nicht-adrenergen Zellen renale Inflammation und Fibrose vermitteln, wurde eine transgene Maus generiert, der allein die α_{2A} -Adrenozeptoren auf nicht-adrenergen Zellen fehlen und die somit nur über α_{2A} -Adrenozeptoren in adrenergen Zellen verfügt. Dies konnte durch Einführen der Sequenz des murinen α_{2A} -Adrenozeptors in eine α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout FVB-Maus, unter Nutzen des humanen Enzyms Dopamin- β -Hydroxylase, erreicht werden. [30] Die *Re-Expression* des α_{2A} -Adrenozeptors in präsynaptischen adrenergen Zellen verhinderte in Untersuchungen von Gilsbach et. al den Anstieg des Plasma-Noradrenalin-Spiegels, die kardiale Hypertrophie und Fibrose, die in α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen beobachtet wurden. Dies weist darauf hin, dass die sympathische Überaktivität in Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen vermindert ist. [48]

Somit wurden zwei verschiedene Mausmodelle angewandt: Zum einen die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse, um sympathische Überaktivität zu demonstrieren, da die *Feedback Inhibition* von Noradrenalin fehlt, zum anderen die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse mit selektiver *Re-Expression* von präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptoren, um die Rolle des α_{2A} -Adrenozeptors in Immunzellen und renalen Epithelzellen zu definieren. Die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse, die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse und die Wildtyp Mäuse werden im Hinblick auf die renale Neurotransmission, die renale Fibrose und Immzellinfiltration untersucht und verglichen. Besonders interessant ist, wie sich die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse im Vergleich zu den anderen beiden Maustypen verhalten. Zeigen sie vergleichbare Vorteile gegenüber der Entwicklung von Fibrose und Inflammation wie die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse? Oder entsprechen sie in der Neurotransmission und Entwicklung von Fibrose und Inflammation den Eigenschaften der Wildtyp Mäuse?

Außerdem soll die Zellart, die für die Effekte des α_2 -Adrenozeptors auf renale Inflammation und Fibrose verantwortlich ist, untersucht werden. Dabei konzentriert sich diese Arbeit auf Makrophagen, da ihnen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von renaler Fibrose und Inflammation zugeschrieben wurde. [38, 49, 50]

Mit diesen Ansätzen besteht die Möglichkeit, die klinische Relevanz des α_{2A} -Adrenozeptors auf nicht-adrenergen Zellen zu verdeutlichen, da die Ergebnisse möglicherweise den klinisch beobachteten fehlenden Nutzen von zentral wirksamen α_2 -Adrenozeptor Agonisten erklären könnten. Es ist denkbar, dass die Ergebnisse dieser Arbeit dabei helfen, Ansätze für neue therapeutische Methoden für Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen zu finden.

2. Material und Methoden

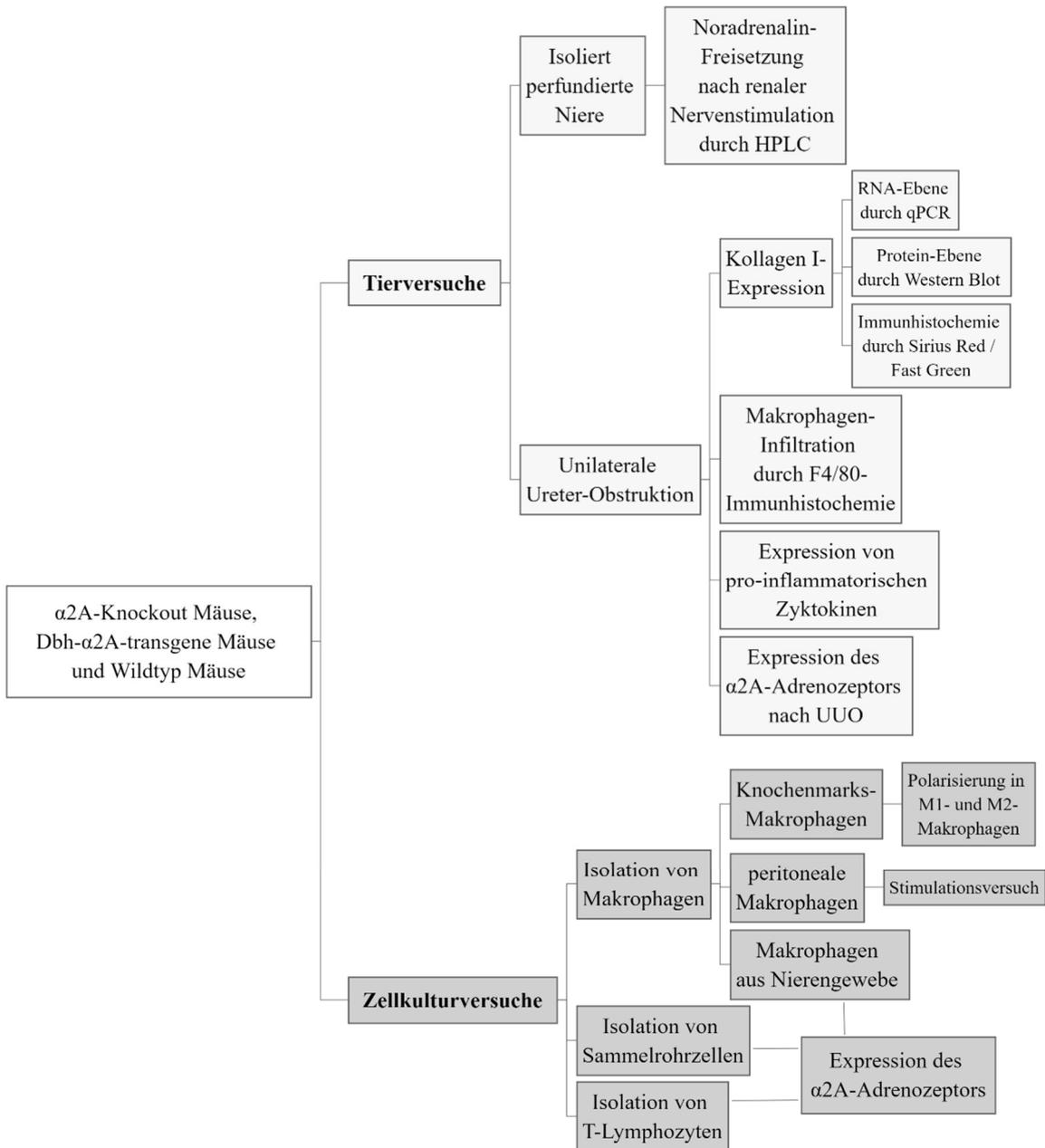


Abbildung 2.1: Übersicht der verwendeten Methoden.

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden die Männchen der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout FVB-Mäuse, die Männchen der transgenen Dbh- α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout FVB-Mäuse und als Vergleichsgruppe männliche Wildtyp (WT) FVB-Mäuse verwendet. Die Knockout (KO)

Mäuse stammen aus einer Kreuzung des α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout C57BL/6 Mausstammes auf den Hintergrund des FVB-Stammes (Labormaus-Inzuchtlinie von Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Bei den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen handelt es sich um α_{2A} -Adrenozeptor-defiziente Mäuse mit selektiver Expression von präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptoren in adrenergen Neuronen mithilfe des humanen Dopamin- β -Hydroxylase (Dbh)-Promotors. [30] Die folgende Abbildung 2.2 zeigt den transgenen Vektor, der aus einem 5,6-kb Abschnitt des humanen Dbh-Promotors, der codierten Sequenz des murinen α_{2A} -Adrenozeptors mit einem aminoterminalen *Epitop-Tag* und dem SV40 T-Intron mit einer Polyadenylierungsstelle besteht. [30]

Die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse haben ebenfalls den Hintergrund des FVB-Stammes. Die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse wurden dann mit α_{2A} -Knockout Mäusen verpaart und gezüchtet. Dies führte zu Generierung von Mäusen, die selektiv nur den präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptor exprimieren.

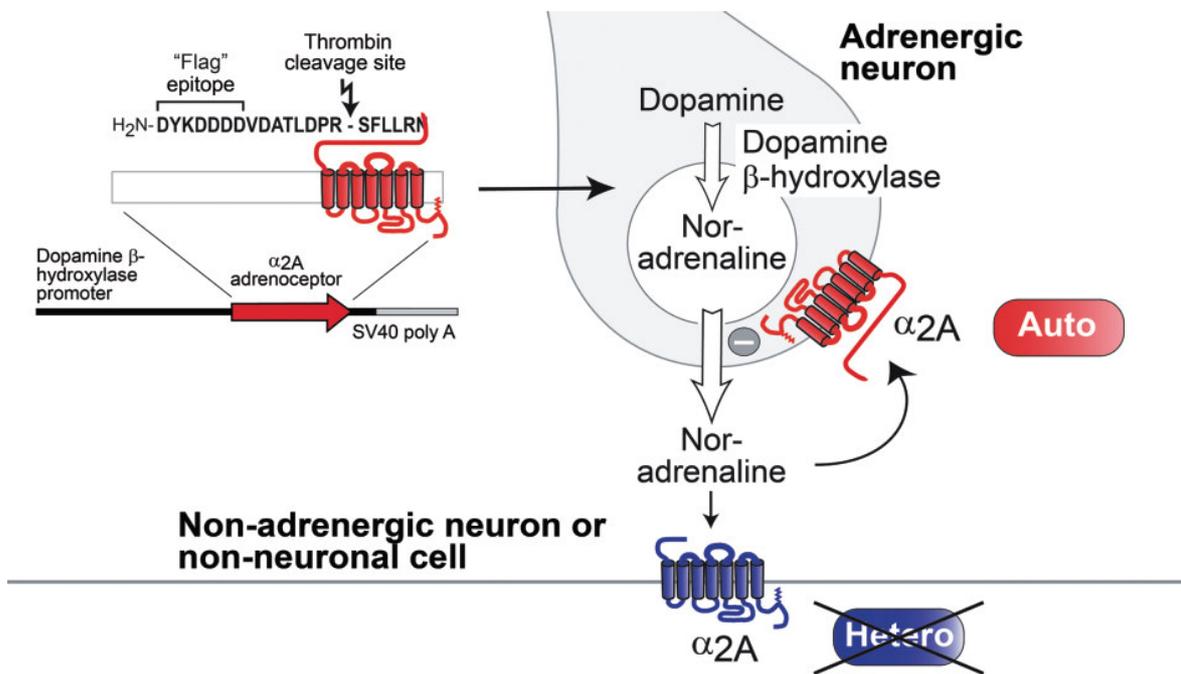


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des transgenen Dbh- α_{2A} -Vektors. Die *Re-Expression* von präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptoren in adrenergen Neuronen wurde durch Einfügen des murinen α_{2A} -Adrenozeptors über den Dopamin- β -Hydroxylase-Promotor in α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse erreicht. [29]

Die Tiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und hatten stets freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Versuche wurden durch Tierversuchs-Genehmigungen des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen bewilligt. Die Aktenzeichen der genehmigten Tierversuchsanträge lauten AZ 84-02.04.2011-A268 und AZ 84-02.04.2016.A510. Die Tötungsversuche und *ex vivo* Versuche wurden unter der Ordnungsnummer O68/08 der ZETT der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch mich durchgeführt. Die *in vivo* Versuche wurden von PD Dr. med. Johannes Stegbauer, Dr. med. Henning Hoch und Dr. rer. nat. Lydia Hering durchgeführt. Für die Durchführung der Dissertation erwarb ich den Fachkundenachweises gem. §9 des geltenden Tierschutzgesetzes.

2.2 Narkose

Die Narkose der Mäuse erfolgte mit Isofluran (Actavis, Morpeth, UK) 1,5-2 % mit Sauerstoff 1L/Minute in Kombination mit Buprenorphin (Buprenovet, Animalcare Ltd, York, UK) 0,05 mg/kg Körpergewicht. Die Isoflurannarkose wurde in einer Induktionsbox eingeleitet und über eine Isoflurananlage mit Verdampfer per Gesichtsmaske aufrechterhalten. Die Dosis wurde bei Bedarf an die Atemfrequenz angepasst. Die suffiziente Narkosetiefe wurde mittels des Flexorreflexes überprüft. Dabei wurden die Zehen mittels einer Pinzette fest gedrückt. Kam es zum Ausfall des Flexorreflexes, so war eine ausreichende Narkosetiefe gegeben.

2.3 Isoliert perfundierte Mausniere

Das Modell der isoliert perfundierten Mausniere ist eine Möglichkeit, *in vitro* Mausnieren zu perfundieren und dabei die Druckantwort der renalen Gefäße zu erfassen sowie das Perfundat der Niere zu sammeln. Das Nierenperfundat wird anschließend zur chromatographischen Bestimmung des Noradrenalin-Gehalts genutzt.

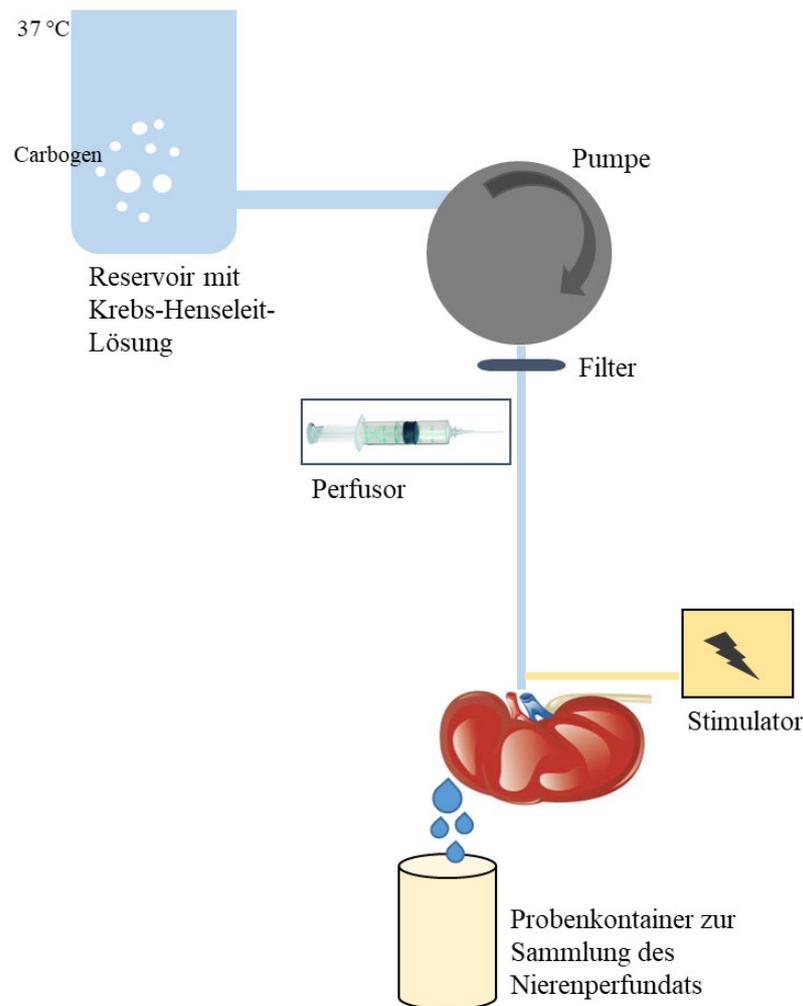


Abbildung 2.3: Versuchsaufbau der isoliert perfundierten Niere. Mit Carbogen angereicherte, auf 37 °C erwärmte Krebs-Henseleit-Lösung wurde über eine Pumpe mit einer konstanten Perfusionsrate gefördert. Nach Passage eines Filters wurde zu Beginn einmalig über einen Perfusor KCl appliziert. Die Niere war an eine bipolare Platinelektrode angebracht und wurde über einen Stimulator stimuliert. Das Nierenperfundat wurde in Probenkontainern gesammelt und darin der Noradrenalin-Gehalt mittels HPLC bestimmt.

2.3.1 Präparation der Nieren

Die Präparation der Nieren erfolgte freundlicherweise in Kooperation mit Dr. med. Henning Hoch. Nachdem die Maus durch Exartikulation im Okzipitalgelenk euthanasiert wurde, mussten die folgenden Schritte rasch durchgeführt werden, um eine adäquate Perfusion der Nieren zu gewährleisten. Die Maus wurde sie zunächst auf den Rücken gelegt und an allen vier Extremitäten durch Klebeband (Leukosilk, BSN medical, Hamburg, D) fixiert. Die Haut

des Abdomens wurde mit 70-prozentigem Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, D) desinfiziert und anschließend eine mediane Laparotomie durchgeführt. Dabei wurde mittels einer feinen Schere (gerade, 11,5 cm, KLS Martin, Freiburg, D) zunächst die Haut eröffnet und abpräpariert und daraufhin das Peritoneum durch einen Längsschnitt eröffnet. Nachdem zwei Entlastungsschnitte im Bereich des rechten und linken Peritoneums durchgeführt wurden, wurde das Peritoneum mit vier gebogenen Mosquitoklemmen (12,5 cm, KLS Martin) fixiert und aufgespannt. Die Darmschlingen wurden mit einem Tupfer (MaiMed, Neuenkirchen, D) zur Seite geschoben. Dadurch ergab sich eine gute Sicht auf das Retroperitoneum der Maus. Die nachfolgenden Schritte wurden unter einem Motic SMZ-168 Stereomikroskop (Motic, Wetzlar, D) durchgeführt. Eine Ligatur der Bauchaorta wurde an dem apikalen Anteil der *Aorta* unterhalb des Zwerchfells vorbereitet, die für die Umkehrung des Kreislaufs genutzt wurde. Es erfolgte die Darstellung der *Aorta*, der *Vena cava inferior* sowie die Freipräparation der *Aorta*. Die Gefäße wurden an zwei Stellen abgeklemmt, kurz vor der Aortenbifurkation mit einer gebogenen Mosquitoklemme und unterhalb des Abgangs der *Arteria renalis sinistra* mit einem Mini-Gefäßclip (nach Biemer, 9 mm, KLS Martin). Dadurch kam es zu einer Blutleere innerhalb dieses Gefäßabschnittes. Die *Aorta* oberhalb der Bifurkation wurde mittels einer Strabismus-Federschere (gerade, 11,5 cm, KLS Martin) inzidiert und konnte nachfolgend mit einem Polyethylenschlauch (Außen-Ø 0,61 mm, Innen-Ø 0,28 mm, Portex, smiths medical, Minnesota, USA) kanüliert werden. Der Schlauch wurde mittels einer Ligatur (Seraflex, Seide 5-0, Serag Wiessner, Naila, D) befestigt. Dieser Zugang diente der *in-situ* Perfusion der Nieren mit Krebs-Henseleit-Lösung, bestehend aus 118 mM NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, D), 4,7 mM KCl (Merck KGaA), 0,45 mM MgSO₄ 7H₂O (Merck KGaA), 25 mM NaHCO₃ (Merck KGaA), 1,03 mM KH₂PO₄ (Merck KGaA), 11,1 mM D(+)Glucose (Appllichem, Darmstadt, D), 2,5 mM CaCl₂ 2H₂O (Merck KGaA), 0,067 mM EDTA-Dinatriumdihydrat (Merck KGaA), und 0,07 mM L(+)Ascorbinsäure (Honeywell Riedel-de Haen, Seelze, D). Diese wurde auf 37°C erwärmt (Umwälzthermostat, Modell UC-5B, Julabo, Seelbach, D) und mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂, Linde Gas, Dublin, Irland) begast. Eine Pumpe mit Planetengetriebe (Abimed, Gilson, Minipuls 2, Langenfeld, D) betrieb die Perfusion mit einer konstanten Perfusionsrate von 7,25 ml/min pro Gramm Niere. Das Nierengewicht wurde über eine lineare Regression aus dem Verhältnis des Körpergewichts zum Nierengewicht abgeschätzt. Die Krebs-Henseleit-Lösung passierte vor Erreichen der Nieren einen 0,45 µm Filter (Filtropur S, Sarsted, Nümbrecht, D). Der Mini-Gefäßclip der *Aorta* wurde gelöst, die vorbereitete Ligatur um die *Aorta* kurz unterhalb des Zwerchfells

zugezogen und die *Vena renalis sinistra* eröffnet, um den Abfluss zu ermöglichen. Nachdem sich beide Nieren entfärbt hatten, konnten die Nierenkapseln mithilfe von anatomischen Pinzetten (fein, gebogen, 10,5 cm, KLS Martin) von den Nieren entfernt werden. Daraufhin folgte die Darstellung und Freipräparation der *Aorta*, der *Arteriae renales* und des Nierenbeckens vom umliegenden Fettgewebe und den Venen. Der Ureter wurde dicht am Nierenhilus abgetrennt. Es wurde eine Ligatur zwischen den Abgängen der rechten und linken Nierenarterie gesetzt. Anschließend erfolgte die Kanülierung der *Arteria renalis dextra* über die Aorta mit einem Polyethylenschlauch (Außen-Ø 0,61 mm, Innen-Ø 0,28 mm, Portex, smiths medical). Der Schlauch wurde durch eine Ligatur befestigt. Daraufhin wurde die rechte Niere unter vorsichtigem Lösen und Abtrennen des restlichen umliegenden Gewebes entnommen und an einer bipolaren Platinelektrode (Sandvik, Stockholm, Schweden) befestigt, die an einen Stimulator (Typ 215/2, Hugo Sachs Elektronik, March, D) angeschlossen war. Die Niere wurde weiterhin über den eingeführten Polyethylenschlauch mit Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert und in eine beheizte, 37°C warme Glaskammer gehängt. Anschließend wurde die linke Niere auf dieselbe Art und Weise kanüliert, der Schlauch mit einer Ligatur befestigt, die Niere aus dem Situs entfernt, ebenfalls an einer bipolaren Platinelektrode angeschlossen und in eine beheizte Glaskammer eingehängt.

2.4 Quantitative Bestimmung von Noradrenalin

Durch das Modell der isoliert perfundierten Niere konnte das Nierenperfundat aufgefangen und im Hinblick auf die vorhandene Menge des Neurotransmitters Noradrenalin untersucht werden. Die Noradrenalin-Freisetzung wurde durch renale nervale Stimulation induziert. Die quantitative Bestimmung erfolgt dann durch die *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC).

2.4.1 Versuchsablauf

Nachdem die Nieren erfolgreich an den bipolaren Platinelektroden angebracht wurden, benötigte es ungefähr 15 Minuten, bis die Druckantwort-Kurven aneinander angeglichen waren. Daraufhin wurde zunächst ein Nierenfunktionstest durchgeführt, der aus einer

Probestimulation mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, Stromstärke 40 mA), Einhalten einer 15-minütigen Pause und aus einer Injektion von 60 mM Kaliumchlorid (Merck KGaA) über eine Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, Holliston, USA) mit der Perfusionsrate 0,158 ml/min bestand. Nachdem die durch KCl induzierte Maximalkontraktion der Gefäße erreicht war, wurde die Spritzenpumpe gestoppt. Daraufhin erfolgte erneut eine 15-minütige Pause zur Stabilisierung des Systems. Anschließend wurden 10 µM Kokain (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), zuvor gelöst in H₂O, und 20 µM Kortikosteron (Sigma Aldrich), zuvor gelöst in Ethanol (Ethanol 99,8 % AnalaR NORMAPUR, VWR, Darmstadt, D) in die Perfusionslösung gegeben. Diese dienten als *Reuptake*-Hemmer, verhinderten also die Wiederaufnahme von freigesetztem Noradrenalin. Anschließend folgte eine Einlaufzeit der neuen Perfusionslösung von 15 Minuten. Dann konnte mit der renalen Nervenstimulation begonnen werden. Es erfolgten renale Nervenstimulationen (RNS) mit den Frequenzen 2, 5, 7,5, 10 und 15 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, Stromstärke 40 mA) in aufsteigender Reihenfolge. Nach jeder Stimulation wurde für drei Minuten das Nierenperfundat in kleinen Probenkontainern gesammelt und daraufhin eine Pause von zwölf Minuten bis zur nächsten Stimulation eingehalten. Vor der Sammlung des Perfundats wurden den Probenkontainern ein Säuregemisch aus 125 µl HCl 1 M (Merck KGaA), 10 µl EDTA-Dinatriumdihydrat 0,067 M (Merck KGaA) und 2,5 µl Na₂SO₃ 1 M (J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, USA) hinzugegeben. Dies diente der Stabilisierung von Noradrenalin. Während der dreiminütigen Sammlung des Perfundats wurden diesem 100 µl Interner Standard (DHBA 12 pg/µl, Chromsystems, Gräfelfing, D) hinzugegeben. Dies ist für die spätere Analyse notwendig. Nach der Stimulation mit der höchsten Frequenz und nach Beendigung der Sammlung des Nierenperfundats wurden die Nieren von der Elektrode und dem System abgetrennt und gewogen. Die Ergebnisse der Messungen wurden in pg Noradrenalin/g Nierengewicht angegeben.

2.4.2 Probenaufbereitung

Das Eluat wurde mit einem Tris-Puffer 1M, pH 10 (Carl Roth) versetzt und dadurch auf einen pH-Wert von 8,4 angehoben. Es erfolgte die Zugabe von 30 mg Aluminiumoxid (Al₂O₃, ClinRep, Recipe Chemicals, München, D). Die Proben wurden für 35 Minuten in einem Überkopf-Schüttler (Heidolph Instruments, Schwabach, D) geschüttelt, um das Noradrenalin an das Aluminiumoxid zu binden. Nach dieser Zeit wurden die Proben

zentrifugiert, der flüssige Überstand abgesaugt und verworfen. Nach Zugabe von 1 ml H₂O wurde das Gemisch in mit Filterpapieren (MN GF-1 Ø 10 mm, Macherey-Nagel, Düren, D) vorbereitete Glasröhrchen überführt. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Röhrchen. Das Aluminiumoxid wurde noch zwei Mal mit je 1 ml H₂O gewaschen und die Röhrchen danach zentrifugiert. Das Wasser wurde verworfen. Das Noradrenalin wurde schließlich mit 0,1 M Perchlorsäure (Merck Millipore, Billerica, USA) vom Aluminiumoxid gelöst. Es wurden zunächst 150 µl Perchlorsäure auf das Aluminiumoxid gegeben, die Röhrchen zentrifugiert, dann 100 µl Perchlorsäure zugegeben und die Röhrchen erneut zentrifugiert. Die 250 µl Perchlorsäure enthielten somit das Noradrenalin. Das Gemisch wurde luftblasenfrei in *Micro Inserts* (Polypropylen, mit Feder, Wicom, Heppenheim, D) gefüllt, welche in *Autosampler Vials* (Klarglas, 1ml Volumen, Wicom) gesetzt und mit zugehörigem Stopfen versehen wurde. Diese Vials konnten dann in das HPLC-System eingesetzt werden, aus den Vials wurden 125 µl computergesteuert auf eine HPLC-Säule injiziert und somit das enthaltene Noradrenalin detektiert. Das HPLC-System bestand aus einem Autoinjektor (Waters 717 plus Autosampler, Eschborn, D), einer Pumpe (Waters 510 HPLC Pump), einem Detektor mit einem Arbeitspotenzial von 0,4 V (Waters 460 Electrochemical Detector), einer Vorsäule (Waters Guard-Pack, Reslove™ C18), um Verunreinigungen der Trennsäule zu mindern, und einer Säule (Prontosil 120-5-C18-AQ, 5 µm, Wicom), siehe Abbildung 2.4. Das System wurde mit einer mobilen Phase betrieben. Diese wurde vor jedem Probendurchlauf entgast, filtriert und mit einer Flussrate von 1 ml/min durch das System gepumpt. Die mobile Phase enthielt 15 mM Na₂HPO₄ 12H₂O (Merck KGaA), 30 mM Citronensäure-1-Hydrat (Merck KGaA), 2 mM EDTA-Dinatriumdihydrat (Merck KGaA), 2,77 mM 1-Octansulfonsäure Natriumsalz (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und Methanol 12 % (V/V, für HPLC, HiPerSolv CHROMANORM, VWR). Gelöst wurden die Chemikalien in H₂O für die HPLC (HiPerSolv CHROMANORM, VWR). Die mobile Phase wurde mit 10 M NaOH (J.T. Baker) auf einen pH von 6,5 eingestellt.

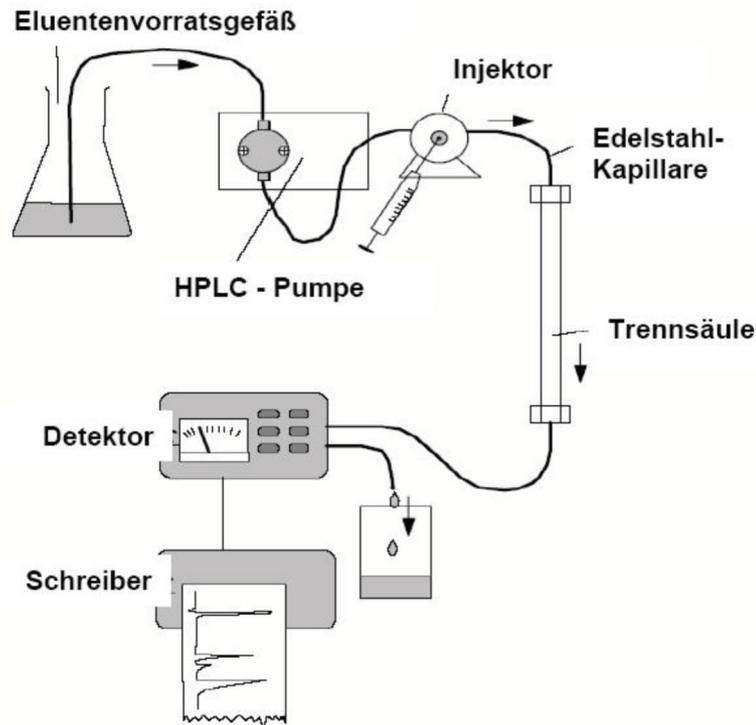


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau einer HPLC. Die mobile Phase befand sich in einem speziellen Vorratsgefäß und wurde über eine Pumpe zu einem Injektor gefördert. Dieser leitete 125 µl der Probe über eine Trennsäule. Vor der Trennsäule war eine Vorsäule (hier nicht dargestellt) vorgeschaltet, um Verunreinigungen der Trennsäule zu mindern. Mit einem Detektor wurde die Noradrenalin-Konzentration gemessen und mittels eines Schreibers dargestellt. [36]

2.4.3 Auswertung der Noradrenalin-Freisetzung

Die quantitative Auswertung der Noradrenalin-Freisetzung wurde freundlicherweise durch Dr. med. Henning Hoch durchgeführt. Die Noradrenalin-Freisetzung wurde anhand einer Noradrenalin-Standardreihe (0; 37,5; 75; 187,5; 375; 750 pg Noradrenalin (Sigma Aldrich) / 125 µl Perchlorsäure und jeweils 600 pg DHBA / 125 µl Perchlorsäure) berechnet. Die Standardreihe wurde für jeden Probendurchlauf neu erstellt und jede Probe auf den internen Standard bezogen. Dadurch wurden Schwankungen, die bei der Probenaufbereitung auftreten können, ausgeglichen. Schlussendlich wurde die Menge an Noradrenalin auf das Nierenfeuchtgewicht bezogen und in pg/g Niere angegeben.

2.5 Unilaterale Ureter-Obstruktion

Die unilaterale Ureter-Obstruktion ermöglicht die experimentelle Induktion der chronischen Nierenkrankheit durch Induktion einer Nierenfibrose. Dabei wird der linke Ureter ligiert und durchtrennt, was zu einer Hydronephrose führt. Das Alter der α_{2A} -Knockout Mäuse, der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse und der Wildtyp Mäuse betrug zum Zeitpunkt der Operation acht bis zehn Wochen. Die Mäuse wurden bis zum Zeitpunkt der Operation unter standardisierten Bedingungen in der ZETT gehalten.

Die Mäuse wurden zunächst narkotisiert, die ausreichende Narkosetiefe wurde überprüft und daraufhin die Augen zum Schutz mit Augensalbe (Bepanthen, Bayer Vital, Leverkusen, D) behandelt. Die narkotisierte Maus wurde auf die rechte Seite gelegt, die Haut der linken Flanke wurde mit 70-prozentigem Isopropanol (Carl Roth) desinfiziert. An dieser Stelle wurde ein Scheitel gebildet, der parallel zum Rippenbogen verlief und sich ca. ein fingerbreit unterhalb des Rippenbogens befand. Dort wurde nun der Flankenschnitt durchgeführt, indem mit einer feinen Schere (gerade, 11,5 cm, KLS Martin) eine Hautinzision und ein ca. 1 cm langer Schnitt durchgeführt wurden. Anschließend erfolgten die Ablösung der Haut von der Muskulatur und die Durchtrennung dieser. Nun wurden die linke Niere und der Abgang des Ureters mithilfe von Pinzetten (KLS Martin) dargestellt. Mittels einer gebogenen Pinzette (KLS Martin) wurde ein ca. 2 cm langer Faden (Perma-hand Seide, 4-0, nicht resorbierbar, Ethicon, Somerville, USA) unterhalb des Ureters, ca. 2 mm distal des Nierenhilus, hindurchgeführt und mit drei Knoten ligiert. Eine weitere Ligatur wurde ca. 5 mm weiter distal gesetzt. Zwischen den beiden Ligaturen wurde der Ureter mit einer feinen Schere durchtrennt. Die Bauchmuskulatur wurde mit einer U-Naht und die Haut mit drei Einzelknopfnähten verschlossen. Die Wunde wurde postoperativ desinfiziert, die Mäuse wurden einzeln gesetzt und regelmäßig kontrolliert. Bei Bedarf erhielten die Mäuse zur Analgesie Buprenorphin subkutan (0,05–1 mg/kg Körpergewicht). Die nicht obstruierte Niere wird nachfolgend als kontralaterale Niere bezeichnet.

2.5.1 Organentnahme nach unilateraler Ureter-Obstruktion

Sieben oder 14 Tage nach UUO wurden die Mäuse euthanasiert und ihre Organe zur weiteren Verarbeitung entnommen. Die Maus wurde ausreichend narkotisiert, durch Dekapitation

euthanasiert und anschließend auf den Rücken gelegt und an allen vier Extremitäten durch Klebeband (Leukosilk, BSN medical) fixiert. Die Haut des Abdomens wurde mit 70-prozentigem Isopropanol (Carl Roth) desinfiziert und dann eine mediane Laparotomie durchgeführt. Dabei wurde mittels einer feinen Schere zunächst die Haut eröffnet und gelöst und anschließend das Peritoneum durch einen Längsschnitt eröffnet. Nachdem zwei Entlastungsschnitte im Bereich des rechten und linken Peritoneums durchgeführt wurden, wurde das Peritoneum mit vier Mosquitoklemmen (gebogen, 12,5 cm, KLS Martin) fixiert und aufgespannt. Die Darmschlingen wurden mittels eines Tupfers (MaiMed) zur Seite geschoben. Dadurch ergab sich eine gute Sicht auf das Retroperitoneum der Maus. Die nachfolgenden Schritte wurden unter einem Motic SMZ-168 Stereomikroskop (Motic) durchgeführt. Die linke Niere, die *Aorta abdominalis* und die *Vena cava inferior* wurden mittels Tupfer und Pinzetten freipräpariert. Daraufhin wurde die *Aorta abdominalis* cranial der Bifurkation mit einer Strabismus-Federschere (gerade, 11,5 cm, KLS Martin) inzidiert und mit einem Polyethylenschlauch (Außen-Ø 0,61 mm, Innen-Ø 0,28 mm, Portex, smiths medical) kanüliert. Der Schlauch wurde durch eine Ligatur (Seraflex, Seide 5-0, Serag Wiessner) befestigt. Über diesen Zugang konnten die Organe nun mit sterilem PBS (Dulbeccos PBS, ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} , Biochrom, Berlin, D) in situ perfundiert werden. Dies geschah mittels einer Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, Holliston, USA) mit einer Perfusionsrate von 1,5 ml/min. Dafür wurde der Polyethylenschlauch auf eine Kanüle (23Gx1“, Braun, Melsungen, D) und diese Kanüle auf eine 10 ml-Spritze (Braun) gesteckt, die mit PBS befüllt war. Dies wurde dann an die Spritzenpumpe angeschlossen. Um den Abfluss der Niere zu gewährleisten, wurde die *Vena renalis sinistra* inzidiert. Nachdem sich beide Nieren entfärbt hatten, konnten die Nierenkapseln mithilfe von anatomischen Pinzetten (fein, gebogen, 10,5 cm, KLS Martin) von den Nieren getrennt und die Nieren am Hilus durch eine Strabismus-Federschere abgetrennt werden. Die Nieren wurden dann aus dem Situs entnommen.

Von den Nieren wurden durch ein Skalpell (Feather disposable scalpel 11, Osaka, Japan) die Pole abgetrennt. Das Mittelstück wurde für die Histologie in Histologie Kassetten (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Tokyo, Japan) verpackt und dann in 10-prozentigem, neutral gepuffertem Formalin (Thermoscientific, Waltham, USA) fixiert. Die Pole wurden in gleichmäßig große Stücke à ca. 30 mg zerteilt und die Hälfte in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) in 300 µl *RNA-later* (Qiagen, Hilden, D) für die RNA-Gewinnung gelagert. Die andere Hälfte der Stücke wurde in einem

1,5 ml-Reaktionsgefäß in 300 µl *Allprotect Tissue Reagent* (Qiagen) für die Proteinbestimmung gelagert. Zunächst wurden die Proben über Nacht im Kühlschrank gelagert, um eine Durchdringung der Nierenstücke mit *RNA-later* und *Allprotect Tissue Reagent* zu erreichen. Die Aufbewahrung der Proben bis zur Weiterverarbeitung, falls notwendig, geschah dann bei -80 °C.

2.6 Isolation von murinen Makrophagen

Um herauszufinden auf welcher Zellart der α_{2A} -Adrenozeptor vorhanden ist und welche Rolle er bei der renalen Fibrose und Inflammation spielt, wurden Makrophagen aus dem Peritoneum der Mäuse, aus Nierengewebe und aus dem Knochenmark gewonnen und untersucht.

2.6.1 Isolation von peritonealen Makrophagen

Es wurden Peritonealzellen der Mäuse isoliert und selektiert. Das ergab eine Zellpopulation, die zu über 90 % aus peritonealen Makrophagen bestand [51], die dann Stimulationsversuchen unterzogen wurden. Dieser Versuch wurde mit den Wildtyp Mäusen, den α_{2A} -Knockout Mäusen und den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Extraktion der Peritonealzellen musste zunächst eine Inflammation des Peritoneums der Mäuse herbeigeführt werden. Dafür wurde den Mäusen 3 ml einer 3-prozentigen Thioglykolat-Lösung (Thioglykolat Bouillon, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) langsam intraperitoneal injiziert. Die Thioglykolat-Lösung wurde mit destilliertem H₂O hergestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Nach der Injektion wurden die Mäuse für die nächsten drei Tage in Einzelkäfigen gehalten.

Am dritten Tag nach der Injektion des Thioglykolats wurde die Extraktion der Peritonealzellen durchgeführt. Die Maus wurde durch Exartikulation im Okzipitalgelenk euthanasiert, anschließend auf den Rücken gelegt und an allen vier Extremitäten mithilfe von Klebeband (Leukosilk, BSN medical) fixiert. Die Haut des Abdomens wurde mit 70-prozentigem Isopropanol (Carl Roth) desinfiziert und dann wurde vorsichtig und ohne Verletzung des Peritoneums eine mediane Eröffnung der Haut mit einer feinen Schere

(gerade, 11,5 cm, KLS Martin) durchgeführt. Die Haut wurde mit zwei Pinzetten (KLS Martin) vom Peritoneum abgezogen. So ergab sich die Sicht auf das geschlossene und unverletzte Peritoneum der Maus. Nun wurden 10 ml einer 11,6-prozentigen Sucrose-Lösung (Sigma-Aldrich) zügig in das Peritoneum der Maus injiziert. Die Sucrose-Lösung wurde zuvor mit destilliertem H₂O hergestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert und dient der Auftrennung und Isolation mononukleärer Blutzellen. Während des Experiments wurde die Sucrose-Lösung auf Eis gekühlt. Das Peritoneum der Maus war nun prall gefüllt. Das Abdomen der Maus wurde seitlich mit den Fingern massiert, um die Sucrose-Lösung zu verteilen und das Lösen der Peritonealzellen zu verstärken. Daraufhin folgte die Extraktion der Sucrose-Lösung mit einer 10 ml Spritze (Braun) aus dem Peritoneum, ohne die Organe zu beschädigen. Es konnten ca. 9 ml der zuvor injizierten Menge entnommen werden.

Die folgenden Schritte wurden unter einer Sterilbank (Herasafe, Thermo Scientific) durchgeführt. Um die gewonnen Peritonealzellen aufzureinigen und Makrophagen magnetisch zu selektionieren, wurde das OctoMACS Starting Kit mit MS-Columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) und CD11b MicroBeads (mouse/human, Miltenyi Biotec) entsprechend des Beipackzettels verwendet.

Die gewonnenen Zellen der Suspension wurden mittels einer Zählkammer (nach Neubauer, Brand, Wertheim, D) gezählt und dann in eine *Six-Well*-Platte (3506, Corning, New York, USA) ausgesät. Es wurden ca. 170.000 Zellen/*Well* in 2 ml Zellmedium ausgesät. Das Zellmedium bestand aus VLE-RPMI 1640 Flüssigmedium (mit Glutamin, Biochrom), 10 % (V/V) *Fetal Bovine Serum* (Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom). Zudem wurde ein Tropfen der Zellsuspension auf einem Objektträger (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, D) ausgestrichen für eine spätere Färbung (siehe 2.6.3) zur Bestimmung der Reinheit der Zellpopulation. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank (Heracell 150, Thermo Scientific) wurden nicht-adhärenente Zellen im Rahmen eines Mediumwechsels vorsichtig entfernt.

2.6.2 Stimulation der peritonealen Makrophagen

Nachdem die Makrophagen in den *Six-Well*-Patten für drei Stunden inkubierten und mit Medium gewaschen wurden, erhielten die Makrophagen 2 ml frisches Medium. Dazu wurden dann die Stimulanzen α_{2A} -Adrenozeptor-Agonist UK 14.304 (Sigma Aldrich) in der Konzentration 0,1 μ M, gelöst anhand Herstellerangaben in DMSO (Sigma Aldrich) und als Positiv-Kontrolle LPS aus *E.coli* (Sigma Aldrich), gelöst in sterilem PBS (Dulbeccos PBS, ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} , Biochrom), in der Konzentration 10 ng/ml hinzugegeben. Zwei *Wells* erhielten als Stimulanz UK 14.304, zwei *Wells* erhielten LPS und zwei *Wells* erhielten als Negativ-Kontrolle DMSO. Die Stimulation erfolgte für drei Stunden.

Anschließend wurde zunächst 1 ml des Überstandes abgenommen und in 2 Aliquots à 500 μ l überführt. Dies wurde später für einen TNF α -ELISA (Mouse TNF α Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet. Daraufhin konnten die Zellen geerntet werden. Dies geschah durch Absaugen des restlichen Mediums, Waschen mit sterilem PBS (Dulbeccos PBS, ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} , Biochrom), Zugabe von 350 μ l RLT-Puffer zur Zelllyse (mit β -Mercaptoethanol, aus dem RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) und Lösen der Zellen mit einem Zellspachtel (99010, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz).

Die Durchführung des TNF α -ELISAs erfolgte laut Kit-Protokoll. Die photometrische Messung wurde bei 450 nm mittels eines Plattenlesers (Multimode Detector DTX 880; Beckman Coulter, Brea, USA) durchgeführt.

2.6.3 Färbung der Makrophagen

Während der Isolation und Weiterverarbeitung der Peritonealzellen, wurde jeweils ein Tropfen der Zellsuspension auf einem Objektträger (Marienfeld Superior) ausgestrichen, um den Anteil der Makrophagen an den Peritonealzellen zu erfassen. Diese Objektträger wurden nun zur besseren Beurteilung der vorhandenen Zellen mit der Hemacolor Schnellfärbung (111661, Merck Millipore) gefärbt. Die Färbung erfolgte laut Beipackzettel des Produktes. Die Makrophagen stellten sich dann mit taubenblauem Zytoplasma und violetten Zellkernen dar. Die Zellen wurden mit dem Mikroskop Olympus BX40 (Olympus, Tokio, Japan) mikroskopiert, ausgezählt und beurteilt. Außerdem wurden Beispielfotos mit

der Kamera Nikon D7000 (Nikon, Tokio, Japan) in 40-facher und 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.6.4 Isolation von Makrophagen aus der Niere

Die Maus wurde durch Exartikulation im Okzipitalgelenk euthanasiert und die Nieren wurden wie unter 2.5.1 beschrieben aus dem Situs der Maus entnommen. Die Nieren wurden dann mit einem Skalpell zerkleinert. Die Nierenstücke wurden in 1 ml Collagenase-Lösung, bestehend aus 1,5 mg Collagenase A (#10103578001, Roche diagnostics, Basel, Schweiz) auf 1 ml DMEM Flüssigmedium (Biochrom), überführt und für 40 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um die Zellen weiter zu vereinzeln, wurde der Verdau in der Collagenase-Lösung über einen 100 µm Filter (Merck Millipore) gegeben. Mit mehreren Millilitern DMEM, supplementiert mit 10 % *Fetal Bovine* Serum (Biochrom), wurde der Verdau gestoppt. Das gewonnene Homogenisat wurde anschließend für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet aus Nierenzellen wurde wie unter 2.6.1 beschrieben dem CD11b MACS Kit zugeführt. Isolierte Makrophagen wurden in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen) lysiert und der RNA-Isolierung zugeführt.

2.6.5 Isolation von Makrophagen aus dem Knochenmark

Die Isolation der Makrophagen aus dem Knochenmark wurde freundlicherweise durch Frau Dr. rer. nat. Lydia Hering durchgeführt. Die Maus wurde durch Exartikulation im Okzipitalgelenk euthanasiert. Mithilfe einer feinen Schere und Pinzette wurden die untere Extremität freipräpariert, Tibia und Femur aus den Gelenken gelöst und entnommen. Diese wurden zur Reinigung in 80-prozentigen Ethanol überführt und anschließend mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Die folgenden Schritte wurden aufgrund der benötigten Sterilität unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Enden der Knochen wurden mit einer Schere abgetrennt. An einem Ende wurde die Spitze einer Kanüle (26 G, Braun) angesetzt und das Knochenmark mit Zellmedium ausgespült und in einer Petrischale gesammelt. Das Zellmedium bestand aus VLE-RPMI 1640 Flüssigmedium (mit Glutamin, Biochrom), 10 % (V/V) *Fetal Bovine* Serum (Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom). Das Knochenmark im Zellmedium wurde über einen 70 µm Filter (Corning cell strainer, Sigma) in ein 15 ml Gefäß gefüllt. Dieses wurde für zehn Minuten

bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt. Um eine Lyse der roten Blutzellen zu erreichen, wurden die Knochenmarkszellen für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit *Red Blood Cell* Lysepuffer (10 x, BioLegend, San Diego, USA) inkubiert. Der zehnfach-konzentrierte Lysepuffer wurde zuvor bis zum Erreichen der einfachen Konzentration mit sterilem Wasser verdünnt. Die Lyse wurde durch Zugabe von 20 ml Zellmedium beendet, das Gefäß zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in Medium aufgenommen. Die Zellen der Suspension wurden mittels einer Zählkammer (nach Neubauer, Brand) gezählt und dann in eine Six-Well-Platte (3506, Corning) ausgesät. Die Zellzahl lag bei ca. 600.000 Zellen/Well in 3 ml Zellmedium. Um die Differenzierung in Makrophagen zu unterstützen, war das Medium mit 10 ng/ml Monozytenkolonien-stimulierendem Faktor (Recombinant Mouse M-CSF, BioLegend) versetzt. Die Zellen inkubierten dann über acht Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank (Heracell 150, Thermo Scientific). Der erste Medium- und Stimulantienwechsel wurde nach zwei Tagen und daraufhin regelmäßig alle drei Tage durchgeführt. Nach acht Tagen wurden die Zellen zur Polarisierung in M1- und M2-Makrophagen für zwei Tage in Zellmedium mit Interferon γ (10 ng/ml, Roche) und TNF α (100 ng/ml, Sigma) für die M1-Polarisierung und mit IL4 (20 ng/ml, BioLegend) und IL13 (20 ng/ml, BioLegend) für die M2-Polarisierung stimuliert. Nach zwei Tagen konnten die Zellen geerntet werden. Dies geschah durch Absaugen des restlichen Mediums, Waschen mit PBS, Zugabe von 350 μ l RLT-Puffer zur Zellyse (mit β -Mercaptoethanol, aus dem RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) und Lösen der Zellen mit einem Zellspachtel (99010, Techno Plastic Products).

2.7 Isolation von murinen T-Lymphozyten

Nach Euthanasie der Maus durch Exartikulation im Okzipitalgelenk, Eröffnung des Abdomens der Maus und Perfusion der Organe mit PBS wie unter 2.5.1 beschrieben wurde die Milz mit einer feinen Schere am Hilus abgetrennt und aus dem Situs der Maus entnommen. Die Milz wurde dann mit einem Skalpell zerkleinert und über einen 100 μ m Filter (Merck Millipore) gegeben und mithilfe von Spritzenstempeln (Braun) durch den Filter gerieben, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Das gewonnene Homogenisat wurde anschließend für fünf Minuten bei 4 °C pelletiert. Das erhaltene Pellet aus Milzzellen wurde dann dem Pan T Cell Isolation Kit II von Miltenyi (130-095-130, Miltenyi Biotec) zugeführt. Die Isolation der T-Lymphozyten wurde mit dem QuadroMACS und LS-Säulen

(Miltenyi) laut Beipackzettel des Pan T Cell Isolation Kit II durchgeführt. Das Kit enthält Antikörper gegen CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b(DX5), CD105, Anti-MHC Class II, Ter-119. Die T-Lymphozyten wurden dadurch negativ selektioniert, somit waren die unmarkierten Zellen am Ende des Protokolls die T-Lymphozyten. Die Suspension, die die T-Lymphozyten enthielt, wurde zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml RLT-Puffer (mit β -Mercaptoethanol, aus dem RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) für die Isolation von RNA aufgenommen.

2.8 Isolation von murinen Sammelrohrzellen

Die Isolation der Sammelrohrzellen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe der Pharmakologie und Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum durch die dortigen Kollegen durchgeführt (Ruhr-Universität Bochum, Pharmakologie und Toxikologie). Dies wurde nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe der Nephrologie der Duke University Durham durchgeführt. [52]

Dafür wurden drei Mäuse narkotisiert, ihre Nieren entnommen und das innere Nierenmark seziiert und zerkleinert. Dies wurde dann mit einer enzymatischen Lösung, bestehend aus 0,2-prozentiger Collagenase (#C0130, Sigma Aldrich), 0,2-prozentiger Hyaluronidase (#H3884, Sigma Aldrich) und 100 U/ml DNase (#D5025, Sigma Aldrich), versetzt. Dies geschah in einem Puffer mit einer ähnlichen Osmolarität wie die des inneren Nierenmarks von 650 mOsm/kg, bestehend aus PBS versetzt mit NaCl, Urea, L-Glutamin, D-Glucose und BSA. Das innere Nierenmark wurde für 40 Minuten bei 37°C mit der enzymatischen Lösung inkubiert, wobei die Lösung alle zehn Minuten durchgemischt wurde. Die Suspension wurde dann über einen 75 μ m Filter gegeben, dieser zweimalig gespült und die Suspension anschließend zentrifugiert. Als nächstes wurden die Zellen in 350 μ l RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol aufgenommen zur anschließenden RNA-Extraktion.

2.9 Semi-quantitative *Real-Time* PCR

RNA wurde aus Nierengewebe und murinen Makrophagen von Wildtyp Mäusen, α_{2A} -Knockout Mäusen und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) entsprechend des Kit-Protokolls isoliert. Die Menge und Qualität der gewonnenen

RNA wurde mit dem Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) erfasst. 750 ng RNA wurde mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) anhand des Kit-Protokolls in cDNA umgeschrieben. Für die RTq-PCR kam ein 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) zum Einsatz.

Verwendet wurde der *Power Sybr Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), spezifische Primer (siehe Tabelle 2.1) und H₂O. Der PCR-Mix inklusive der Probe wurde in 96-Well-PCR-Platten (semi skirted, StarLab, Hamburg, D) gegeben, mit einer optischen Folie (Opti-Seal Optical Disposable Adhesive, Bioplastics, Landgraaf, Niederlande) verschlossen und durch das Real Time PCR System analysiert. Das PCR-Gemisch pro *Well* mit einem jeweiligen Volumen von 20 µl setzte sich wie folgt zusammen: 10 µl Power Sybr Green, 9 µl Primer + H₂O und 1 µl cDNA. Für jede Probe wurden Doppelwerte pipettiert. Zudem wurden für jeden Primer Negativ-Kontrollen, sogenannte *No Template Controls*, pipettiert, die das PCR-Gemisch ohne cDNA enthalten. Dies diente als Kontrolle für eine Kontamination mit anderen Nukleinsäuren und als Kontrolle für eine Bildung von Primer-Dimeren. Teilweise wurden nach der Amplifikation 9 µl des Reaktionsproduktes auf ein 2-prozentiges Ethidiumbromid-haltigem (Carl Roth) Agarosegel (Carl Roth) aufgetragen und analysiert.

Folgendes Amplifikationsprotokoll wurde durchgeführt:

- 1.) Initialdenaturierung: 15 Minuten bei 95 °C, 1 Zyklus
- 2.) DNA-Denaturierung: 15 Sekunden bei 95 °C, 40 Zyklen
- 3.) Primer-*Annealing*: 30 Sekunden bei primerspezifischer Temperatur, 40 Zyklen
- 4.) Elongation: 30 Sekunden bei 73 °C, 40 Zyklen
- 5.) Aufnahme: 34 Sekunden bei primerspezifischer Temperatur, 40 Zyklen
- 6.) Dissoziation:
 - 15 Sekunden bei 95 °C, 1 Zyklus
 - 1 Minute bei 60 °C, 1 Zyklus
 - 15 Sekunden bei 95 °C, 1 Zyklus
 - 15 Sekunden bei 60 °C, 1 Zyklus

Folgende Primer wurden verwendet:

- Maus-18s: QuantiTect Mm_Rps18_1_SG (QT00324940, Qiagen)

- Maus-GAPDH: QuantiTect Mm_Gapdh_3_SG (QT01658692, Qiagen)
- Maus- α_{2A} -Rezeptor: QuantiTect Mm_Adra2A_1_SG(QT00287063, Qiagen)
- Maus- α_{2B} -Rezeptor: QuantiTect Mm_Adra2b_1_SG (QT00311675, Qiagen)
- Maus- α_{2C} -Rezeptor: QuantiTect Mm_Adra2c_1_SG (QT01543458, Qiagen)
- Maus-Dbh: QuantiTect Mm_Dbh_1_SG (QT00154392, Qiagen)

Die *Annealing*-Temperatur der oben genannten Primer lag bei 55 °C, die Aufnahme-Temperatur lag bei 72 °C.

Gen	Sense	Antisense	bp	Annealing	Aufnahme
α_{2A} -Rez.	5'-CAACGAGGTTATGGGTTACTGG-3'	5'-AGTAGCGGTCAAGGCTGATG-3'	122	60°C	79°C
Koll1	5'-CTGGTCCACAAGGTTTCCAAG-3'	5'-AGCTTCCCCATCATCTCCATT-3'	119	58°C	78°C
TNF α	5'-ATGTCTCAGCCTCTTCTCATT-3'	5'-GTCTGGGCCATAGAAGTATGA-3'	138	58°C	77°C
NGAL	5'-GCCCAGGACTCAACTCAGAAC-3'	5'-CAGGCCCAACAACGTACCAC-3'	111	58°C	78°C
KIM1	5'-GGAGATTCTGGATGGTTAATG-3'	5'-AGCTGTGGGCCTGTAGTTGT-3'	109	58°C	76°C
MCP1	5'-CTTCTGGGCCTGCTGTCA-3'	5'-CCAGCCTACTCATTGGGATC-3'	127	58°C	78°C

Tabelle 2.1: Primer-Sequenzen der Real Time PCR-Analyse mit Größen der Amplifikationsprodukte in Basenpaaren (bp) und *Annealing*- und Aufnahme-Temperatur der Primer von α_{2A} -Rezeptor-, Kollagen1-, TNF α -, NGAL-, KIM1- und MCP1-mRNA. Hersteller der Primer ist Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D).

Zudem wurde der *TaqMan Gene Expression Mastermix* (Applied Biosystems) und folgende Primer: iNOS, CCL2, IL-1 β , IL-1R1, IL-6, TNF α und IL-12b als M1-Marker und Arg, MgCl₂, Mrc1, Ym1, Fizz1 und Slamf1 als M2-Marker (Applied Biosystems) und GAPDH (*Mouse GAPDH*, Applied Biosystems) als *Housekeeper* verwendet. Das Reaktionsgemisch bestand aus: 10 μ l Mastermix (Applied Biosystems), 1 μ l Primer (Applied Biosystems), 8 μ l H₂O und 1 μ l cDNA. Die PCR wurde entsprechend des Assay-Protokolls mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

- 1.) Aktivierung der Taq-Polymerase: 10 Minuten bei 95 °C, 1 Zyklus
- 2.) DNA-Denaturierung: 15 Sekunden bei 95 °C, 40 Zyklen
- 3.) Primer-*Annealing*: 1 Minute bei 60 °C, 40 Zyklen.

Das Ergebnis der PCR wurde am Ende als mittlerer Zyklusschwellenwert (Ct-Wert) angegeben. Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte jeweils mit der Delta-Delta-Ct-Methode. Es erfolgte eine relative Quantifizierung, bei der die Expression des zu untersuchenden Genes mit der eines *housekeeping* Genes normalisiert wird. Die Expression des untersuchten Genes wird so auf ein konstitutiv exprimiertes Gen bezogen.

2.10 Histologische und immunhistochemische Techniken

2.10.1 Histologische Fixierung der Gewebe

Von den obstruierten und den kontralateralen Nieren der Mäuse nach UUO-Versuch wurde eine ca. 3 mm große, scharf abgetrennte Scheibe aus dem Mittelstück der Nieren herausgeschnitten, in Histologie-Kassetten (Tissue-Tek, Sakura Finetek) gelegt und dann für 24 Stunden in 10-prozentigem, neutral gepuffertem Formalin (Thermo Scientific) fixiert. Danach wurden die Organe in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70-, 80-, 96- und 100-prozentigem Ethanol (Ethanol 99,8 %, AnalaR NORMAPUR, VWR) für je eine Stunde pro Konzentration entwässert. Darauf folgte die Entfernung des Alkohols, indem die Organe zwei Mal für eine Stunde in 100-prozentigem Xylol (AnalaR NORMAPUR, VWR) gelagert wurden. Im nächsten Schritt wurden die Organe in den Kassetten zwei Mal für eine Stunde in flüssiges Paraffin (erwärmte Paraffin Pastillen, Merck Millipore) getaucht. Anschließend wurden die Nieren unter Verwendung einer Paraffineinbetteneinheit (Leica EG 1120, Leica Biosystems, Wetzlar, D) zunächst in die richtige Position gebracht, mit flüssigem Paraffin infiltriert und bis zur Erhärtung, zuerst auf einer Kälteplatte und dann bei Raumtemperatur, stehen gelassen. Von den Paraffinblöcken wurden mittels eines Mikrotoms (Leica Jung Histoslide 2000, Leica Biosystems) ca. 2 µm dicke Schnitte angefertigt, in einem 40°C warmen Wasserbad (1000, Pfm medical, Köln, D) auf Objektträger (Menzel-Gläser, Superfrost-Plus, Thermo Scientific) aufgezogen und dann für 24 Stunden bei 37°C luftgetrocknet.

2.10.2 Allgemeine Schritte bei histologischen Färbungen

Vor dem Färbeprotokoll mussten die Schnitte auf den Objektträgern zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Dies erfolgte durch zweimaliges Eintauchen der Objektträger für fünf Minuten in 100-prozentigem Xylol, zweimalig für drei Minuten in 100-prozentigem Ethanol und jeweils für drei Minuten nachfolgend in 96-, 80- und 70-prozentigem Ethanol. Danach folgte ein Waschschrift, wobei die Schnitte zweimal für drei Minuten in zur Färbung zugehörigem Waschpuffer eingetaucht wurden.

2.10.3 Makrophagenfärbung mittels F4/80-Antigen

Nachdem die Schnitte entparaffiniert und rehydriert waren (siehe 2.10.2), wurden sie zwei Mal für drei Minuten mit Waschpuffer (aus Envision+ Kit, K4007 HRP. Mouse DAB+, Dako products, Agilent, Santa Clara, USA) gewaschen. Der 20-fach-konzentrierte Waschpuffer wurde zuvor bis zum Erreichen der einfachen Konzentration mit destilliertem Wasser verdünnt. Darauf folgten die weiteren Schritte, die in einer feuchten Kammer (GT Labortechnik, Arnstein, D) bei Raumtemperatur durchgeführt wurden:

1. Vorbehandlung mit Proteinase K (ready-to-use, S3020, Dako), um einen proteolytischen Verdau zu erzielen, Inkubation für drei Minuten, 2x Waschen mit Waschpuffer
2. Inkubation für zehn Minuten mit Peroxidase-Block (Envision+ Kit, Dako), um Wechselwirkungen zwischen dem Enzym Peroxidase und der Färbung des Zielantigens zu vermeiden, 2x Waschen mit Waschpuffer
3. Inkubation für zehn Minuten mit Avidin Solution (Biotin Blocking System, X0590, Dako), um endogenes Avidin zu blockieren und somit eine unspezifische Färbung zu verhindern, 2x Waschen mit Waschpuffer
4. Inkubation für zehn Minuten mit Biotin Solution (Biotin Blocking System, X0590, Dako), um endogenes Biotin zu blockieren und somit eine unspezifische Färbung zu verhindern, 2x Waschen mit Waschpuffer
5. Inkubation für eine Stunde mit Protein Block *Serum-Free* (ready-to-use, X0909, Dako), dadurch weitere Verminderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch Proteinblockierung, Flüssigkeit abkippen

6. Inkubation mit dem Primärantikörper: F4/80 Antikörper (MCA497RT, Klon CI:A3-1, AbDSerotec, Düsseldorf, D), Verhältnis 1:100 in *Antibody Diluent* (S0809, Dako), über Nacht bei 4°C, 2x Waschen mit Waschpuffer
7. Inkubation für 30 Minuten mit Sekundärantikörper: Ziege IgG anti-Ratte IgG, biotiniliert (112-065-003, Dianova, Hamburg, D), Verhältnis 1:1000 in *Antibody Diluent* (S0809, Dako), 2x Waschen mit Waschpuffer
8. Inkubation für 30 Minuten mit Streptavidin-*Horseradish*-Peroxidase (HRP, 016-030-084, Dianova), Verhältnis 1:1000 in *Antibody Diluent* (S0809, Dako), bindet an biotinilierten Sekundärantikörper und dient der Oxidation des darauffolgenden Chromogens DAB, 2x Waschen mit Waschpuffer
9. Diaminobenzidin (DAB)-Färbung anfertigen aus 1 Tropfen DAB+ Chromogen (Envision+ Kit, Dako) und 1 ml DAB+ Substratpuffer (Envision+Kit, Dako), Inkubation für 3,5 Minuten, Oxidation des DABs durch die HRP resultiert in brauner Färbung der F4/80-positiven Zellen, Spülen mit H₂O
10. Gegenfärbung durch Eintauchen für 35 Sekunden in Hämalaulösung (Merck KGaA), dadurch bläuliche Färbung des restlichen Nierengewebes, Spülen mit H₂O für 15 Minuten
11. Bedeckung der Objektträger mit Deckgläsern (Menzel-Gläser, Thermo Scientific) unter der Verwendung von Glycergel *Mounting Medium* (C0563, Dako), Lufttrocknen für 24 Stunden

Die gefärbten Nierenschnitte wurden mit dem Mikroskop Olympus BX40 (Olympus) betrachtet und in 20-facher Vergrößerung mit der Kamera Nikon D7000 (Nikon) fotografiert. Von jedem Nierenschnitt wurden ca. zehn Fotos des gesamten Nierenkortex aufgenommen. Diese Fotos wurden mithilfe des Programms Fiji is Just ImageJ (entwickelt von Wayne Rasband) analysiert. Die Auswertung geschah verblindet: Zum Zeitpunkt der Analyse war unbekannt, zu welcher Mausgruppe das Präparat gehörte und um welche Niere – obstruiert oder kontralateral – es sich handelte. Das Foto wurde zunächst über „*Image – Type*“ in eine 8-bit Version umgewandelt. Dann wurde über „*Image – Type – Adjust – Threshold*“ eine Threshold-Einstellung ausgewählt, die die markierten Zellen und Areale am besten erfasst. Anschließend wurden störende Bereiche, die fälschlicherweise markiert waren, mit „*Oval Selections*“ ausgewählt und mit weißer Farbe gefüllt. Danach wurde „*Threshold – Apply*“ angewendet und es entstand ein schwarz-weißes Bild, das die markierten Zellen weiß darstellte. Über „*Analyze – Measure*“ konnte die Fläche in Prozent gemessen

und angegeben werden. Die ermittelten Daten wurden in Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA) übertragen.

2.10.4 Kollagenfärbung mittels Sirius Red / Fast Green

Nachdem die Schnitte entparaffiniert und rehydriert waren (siehe 2.10.2), wurden sie mittels Sirius Red/Fast Green Collagen Staining Kit (Chondrex, Redmond, USA) anhand des Kit-Protokolls gefärbt. Die Werte der optischen Dichte wurden per Spectrophotometer (FLUOstar Optima Microplate Reader, BMG Labtech, Ortenberg, D) bei 540 nm und 605 nm analysiert. Anhand der Formel des Kit-Protokolls wurde die Menge an Collagen in $\mu\text{g}/\text{Ausschnitt}$ berechnet.

2.11 Kollagenexpression mittels Western Blot

Die Durchführung der Western Blots und die quantitative Auswertung der Gele wurden freundlicherweise durch die technische Assistentin Frau Blanka Duvnjak durchgeführt.

2.11.1 Proteinisolierung

Teile der durch die unilaterale Ureter-Obstruktion geschädigten Nieren wurden nach der Entnahme in 300 μl *Allprotect Tissue Reagent* (Qiagen) gelagert. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten im Eiswasserbad. Zur Proteinisolierung wurden die Nierenstücke aus dem *Allprotect Tissue Reagent* entnommen und zunächst in 500 μl kaltem PBS und daraufhin in 150 μl Lysepuffer in Homogenisierungsröhrchen überführt. Der Lysepuffer setzt sich zusammen aus 50 mM TrisHCl (Sigma Aldrich), pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 % SDS (Sigma Aldrich), 1 % Triton X-100 (Sigma Aldrich) und Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche diagnostics), 1 Tablette pro 10 ml. Die Homogenisierung erfolgte mithilfe eines *TissueRuptors* (Qiagen). Anschließend inkubierte das Homogenisat für 30 Minuten im Eiswasserbad, woraufhin es in 1,5ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und bei 4°C und maximaler Rotationsgeschwindigkeit für 15 Minuten zentrifugiert wurde. 100 μl des Überstandes wurden entnommen, mit 100 μl Laemmli-Proben-Puffer, 2-

fach konzentriert (Sigma Aldrich) versetzt. Dies wurde zunächst für fünf Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend bei -80°C tiefgefroren. Für die Proteinbestimmung wurden 5 µl entnommen und mit 30 µl destilliertem Wasser vermischt.

2.11.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Herstellervorgaben durchgeführt.

2.11.3 Herstellung der Gele

Für die Elektrophorese wurden Trenn- und Sammelgele benötigt. Es wurden 7-prozentige Polyacrylamid-Gele mit dem Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems (Bio-Rad, Hercules, USA) hergestellt.

Die Trenngele setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1. Puffer A, pH 8,8, bestehend aus: TrisHCl 2M, 90 ml; TrisBase 2M, 285 ml (Thermo Scientific); SDS 20 %, 10 ml; H₂O, 115 ml
2. Rotiphorese Gel 30, 37,5:1 (Carl Roth)
3. APS 10 % (Sigma Aldrich)
4. TEMED (Carl Roth)
5. Wasser

Die Sammelgele setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1. Puffer B, pH 6,9, bestehend aus: TrisHCl 2M, 121 ml; TrisBase 2M, 4 ml; SDS 20 %, 10 ml; H₂O, 365 ml
2. Rotiphorese Gel 30, 37,5:1
3. APS 10 %
4. TEMED
5. Wasser

2.11.4 Gelelektrophorese und Western Blot

Für die Gelelektrophorese wurden 7-prozentige Polyacrylamid-Gele verwendet. Für das Sammelgel wurde eine Spannung von 70 V für 30 Minuten, für das Trenngel eine Stromstärke von 15 mA für 1,5 Stunden angelegt. Die Taschen wurden mit jeweils 15-30 µg Protein beladen. Für den Western Blot wurde daraufhin eine Mini-PROTEAN Tetra *Vertical Electrophoresis Cell* (Bio-Rad) verwendet und der Blot bei 200 mA und 2 Stunden und 45 Minuten Laufzeit durchgeführt.

Die freien Stellen für eine Proteinbindung auf der Membran werden mit einem für den Antikörper nicht erkennbaren Protein über Nacht geblockt. Dies erfolgte in einer 5-prozentigen Magermilchpulver-Waschpuffer-Lösung (Carl Roth). Nach der Blockierung wurde die Membran mit dem Kollagen-Typ1-Antikörper, Anti-Maus (#203002, MD bioproducts, Oakdale, USA), 1:15000 und einer 1-prozentigen Magermilchpulver-Waschpuffer-Lösung versehen. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurde die Membran drei Mal zu je fünf Minuten mit Waschpuffer (bestehend aus 12,9 mM Tris HCl pH 7,5, 129 mM NaCl, 1,1 mM Polysorbat 20, Carl Roth) gewaschen. Anschließend wurde der zweite Antikörper Anti-Kaninchen (#sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), 1:20000, hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte erneut wie zuvor eine Waschung. Unter Zugabe von superECL (Roche diagnostics) wurde die Membran entwickelt und mit einem Imager (Alpha Innotech, Santa Clara, USA) Fotos der entwickelten Membran nach einer, zwei und fünf Minuten aufgenommen. Für die Durchführung der Ladekontrolle wurde die Membran mit einem anti-β-Actin-Antikörper (#A5316, Sigma Aldrich), 1:10000, versehen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut mit Waschpuffer drei Mal zu je fünf Minuten gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper Anti-Maus (#P0447, Dako), 1:10000 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Membran entwickelt und Fotos der Membran nach 30 Sekunden und einer Minute aufgenommen.

Die gespeicherten Aufnahmen konnten mittels der Software AlphaView quantifiziert werden. Dazu wurde die Pixeldichte densitometrisch erfasst. Die Auswertung erfolgte als Quotient der Daten der drei Mausarten zu dem Mittelwert der WT-Mäuse.

2.12 Statistik

Die Anzahl der Experimente pro Gruppe wurde mit „n“ aufgeführt, wobei „n“ für eine einzelne Niere steht. Die statistische Auswertung erfolgte durch Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen. Unter Benutzung des Computerprogramms GraphPad Prism (Version 5.0, San Diego, USA) wurde zunächst die Normalverteilung der Werte mit dem Kolmogorov-Smirnov Test untersucht. Dies ergab in allen Fällen eine Normalverteilung. Bei dem Vergleich von zwei Gruppen wurden durch ungepaarte T-Tests Signifikanzen ermittelt. Bei dem Vergleich mehrerer Gruppen wurden durch *One-Way*-ANOVA mit Turkey Post-Hoc Test Signifikanzen ermittelt und die Ergebnisse grafisch dargestellt. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galten als signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Genotyps

Die Knockout Mäuse stammen aus einer Kreuzung des α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout C57BL/6 Mausstammes auf den Hintergrund des FVB-Stammes, da der C57BL/6 -Stamm protektive Faktoren für die Entwicklung einer Glomerulosklerose besitzt [53].

Bei den *Dbh- α_{2A}* -transgenen Mäusen handelt es sich um α_{2A} -Adrenozeptor-defiziente Mäuse mit selektiver Expression von präsynaptischen α_{2A} -Rezeptoren in adrenergen Neuronen mithilfe des humanen Dopamin- β -Hydroxylase (*Dbh*)-Promotors. [30] Die *Dbh- α_{2A}* -transgenen Mäuse wurden ebenfalls auf den für Nierenschädigung sensiblen FVB-Stamm zurückgekreuzt und anschließend mit den α_{2A} -Knockout Mäusen verpaart und weitergezüchtet. Dies führte zu Generierung von Mäusen, die selektiv nur den präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptor exprimieren.

Als Kontrolle wurden Genotypisierungen mittels PCR aus DNA von Schwanzbiopsien der α_{2A} -Knockout und *Dbh- α_{2A}* -transgenen Mäuse durchgeführt. Die folgende Abbildung 3.1 zeigt die Genotypisierung, welche die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout FVB-Linie und die *Dbh- α_{2A}* -transgenene FVB-Linie charakterisiert.

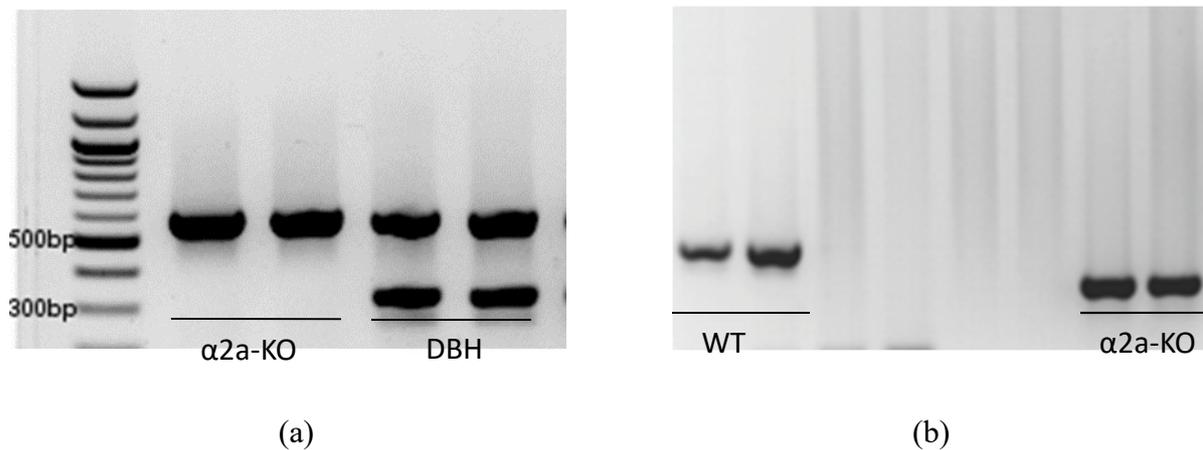


Abbildung 3.1: Genotypisierung aus Schwanzzell-DNA mittels PCR von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen in (a) und von Wildtyp und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen in (b). In der Abbildung (a) entspricht die 542 bp lange Bande dem Knockout-Allel, die 325 bp lange Bande dem Dbh-Allel (siehe Beschriftung). In der Abbildung (b) entspricht die 410 bp lange Bande dem Wildtyp-Allel, die 260 bp lange Bande dem Knockout-Allel (siehe Beschriftung). Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel aufgetragen.

Außerdem wurde die mRNA Expression des α_{2A} -Adrenozeptors im Nierengewebe der Wildtyp Mäuse, der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse und der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse untersucht. Dabei war keine Expression des α_{2A} -Adrenozeptors in den α_{2A} -Knockout Mäusen, eine starke Expression in den Wildtyp Mäusen und eine schwächere Expression in den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen zu beobachten (Abbildung 3.2).

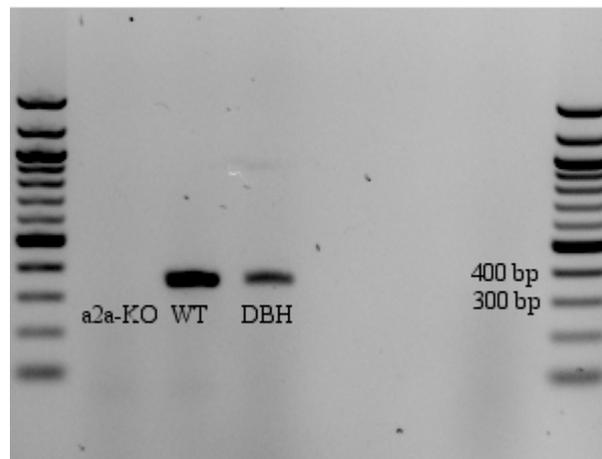


Abbildung 3.2: Expression von α_{2A} -Adrenozeptor-mRNA. Darstellung der Amplifikationsprodukte in einem mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel, 343 bp lange Bande. Es handelt sich um RNA, gewonnen aus Nierengewebe der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse, der Wildtyp Mäuse und der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse (siehe Beschriftung). Zu sehen ist eine starke noMäusen und keine Expression bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen.

3.2 Isoliert perfundierte Mausniere

3.2.1 Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation

Als funktioneller Test für die Rekonstitution des präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptors wurde die präsynaptische Noradrenalin-Freisetzung nach renaler Nervenstimulation mit den Frequenzen 1-15 Hz untersucht (nicht alle Ergebnisse gezeigt). Die NA-Freisetzung war in den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen im Vergleich zu den α_{2A} -Knockout Mäusen bei der Stimulationsfrequenz von 5 Hz signifikant vermindert (Abbildung 3.3).

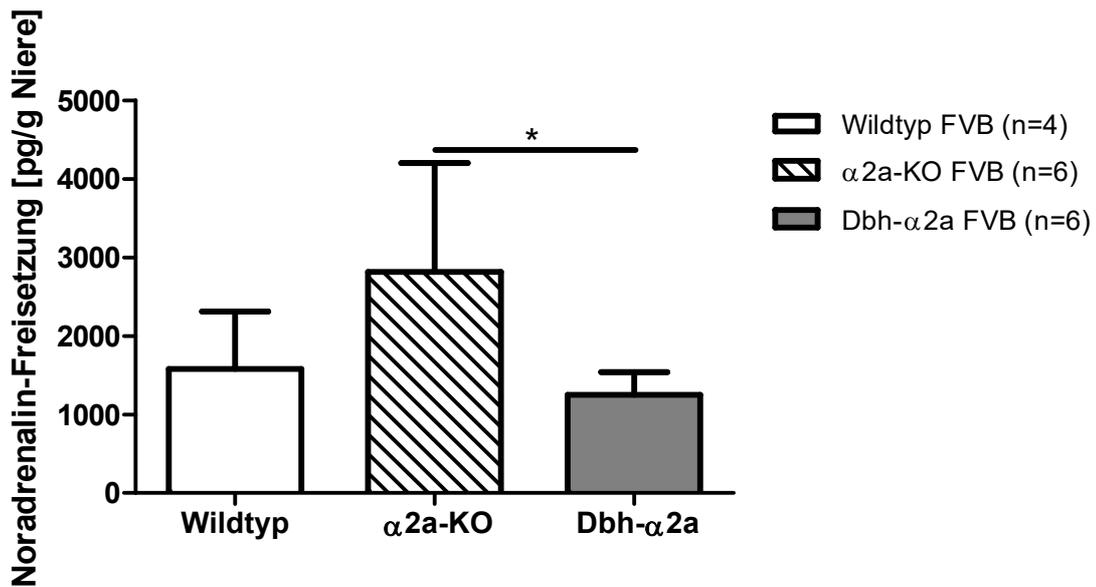


Abbildung 3.3: Noradrenalin-Freisetzung nach renaler Nervenstimulation mit 5 Hz bei Wildtyp, α_2A -Knockout und Dbh- α_2A -transgenen Mäusen, gemessen mittels HPLC und angegeben in pg/g Niere. * bedeutet $p < 0,05$ und zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen α_2A -Knockout und Dbh- α_2A -transgenen Mäusen an. Zwischen Wildtyp und α_2A -Knockout Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied (*One-way ANOVA*).

3.3 Vergleich von Wildtyp, α_2A -Knockout und Dbh- α_2A -transgenen Mäusen nach unilateraler Ureter-Obstruktion

Der Einfluss der Ureter-Obstruktion auf die Induktion von Nierenfibrose und Immunzellinfiltration wurde bei den drei Mausarten verglichen.

3.3.1 Makrophageninfiltration als Parameter für renale Inflammation

Die renale Inflammation wurde durch die Bestimmung der Infiltration von Makrophagen in das Nierengewebe bemessen. Die Inflammation wurde durch die 7-tägige Ureter-Obstruktion herbeigeführt.

Dabei zeigte sich ein signifikant geringeres Vorkommen von Makrophagen im obstruierten Nierengewebe von α_2A -Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen sowie im

Vergleich zu Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen. Im obstruierten Nierengewebe der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse zeigte sich eine signifikant geringere Makrophageninfiltration als bei den Wildtyp Mäusen (Abbildung 3.4 und 3.5). In den kontralateralen Nieren war keine Änderung der Makrophageninfiltration festzustellen.

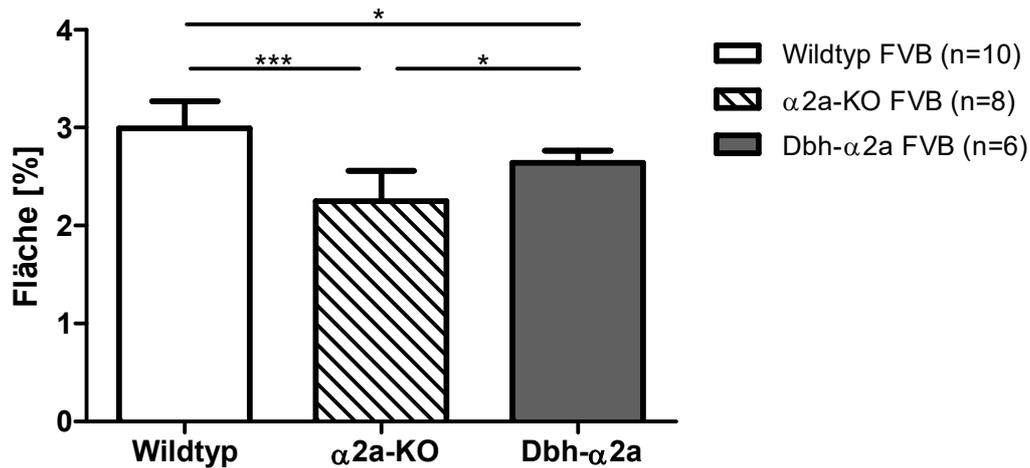


Abbildung 3.4: Makrophageninfiltration des Nierenkortex nach 7-tägiger Ureter-Obstruktion. Gegenüberstellung von Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen. * $p < 0,05$ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen, sowie zwischen α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen an (*One-way ANOVA*). *** $p < 0,0001$ zeigt einen hoch signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen an (*One-way ANOVA*). Die Makrophagen wurden mittels F4/80-Antigen-Immunhistochemie gefärbt und die Fläche mithilfe des Programms Fiji is Just ImageJ ermittelt und in Prozent % angegeben.

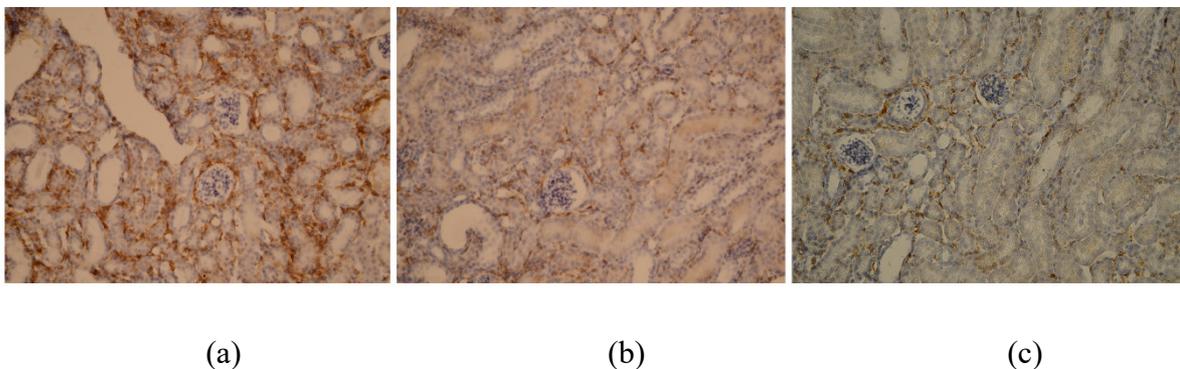


Abbildung 3.5: Beispiele von Aufnahmen der F4/80-Antigen-Immunhistochemie der Nierenkortexes von Wildtyp (a), α_{2A} -Knockout (b) und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen (c). Braune Färbung der Makrophagen durch DAB.

3.3.2 Kollagenexpression als Parameter für renale Fibrose

Durch die Quantifizierung der Expression von Kollagen auf verschiedenen Ebenen wurde die renale Fibrose beurteilt. Dies geschah durch die Untersuchung der histologischen Menge an Kollagenfasern im Nierengewebe, der Expression von Kollagen 1 auf RNA-Ebene und durch die Bestimmung der Menge des Proteins Kollagen 1 im Nierengewebe.

Der renale Gehalt von Kollagenfasern wurde nach 7-tägiger Ureter-Obstruktion histologisch bestimmt. Die Histologie zeigte einen signifikant reduzierten Kollagengehalt im obstruierten Nierengewebe von α_{2A} -Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Zudem war die Expression von Kollagen bei den obstruierten Nieren von Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen signifikant reduziert. Zwischen den Nieren der α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse bestand kein Unterschied (Abbildung 3.6 und 3.7). In den kontralateralen Nieren war keine Änderung des Kollagengehalts zu erkennen.

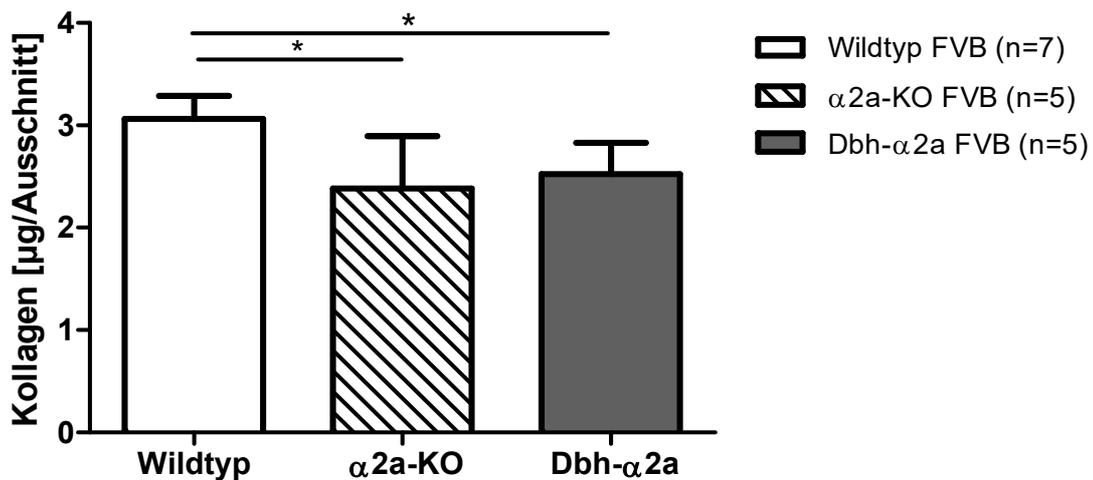
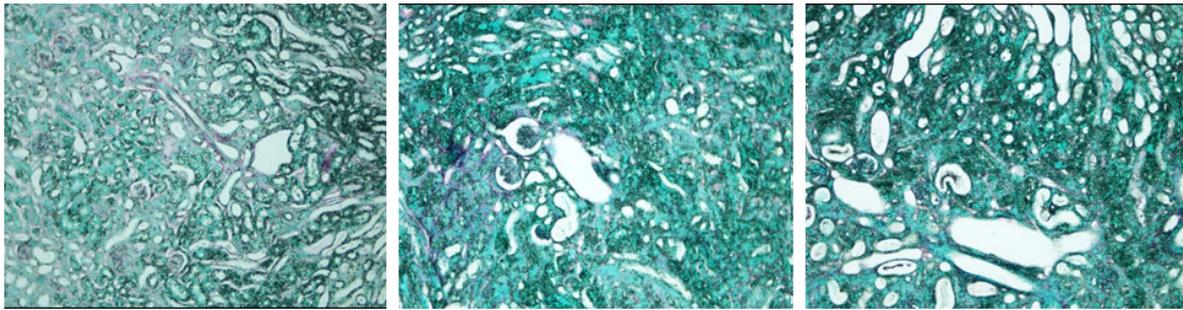


Abbildung 3.6: Renaler Gehalt von Kollagenfasern im Nierengewebe sieben Tage nach unilateraler Ureter-Obstruktion. * $p < 0,05$ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen und zwischen Wildtyp und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen an (*One-way ANOVA*). Die Kollagenfasern wurden mittels Sirius Red / Fast Green-Färbung gefärbt und per Spectrophotometer bei 540 nm und 605 nm analysiert. Die Kollagenmenge wurde in μg pro Ausschnitt angegeben.



(a)

(b)

(c)

Abbildung 3.7: Beispiele von Aufnahmen der Sirius Red / Fast Green-Färbung von Nierengewebe von Wildtyp (a), α_{2A} -Knockout (b) und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen (c). Purpurfarbige Färbung der Kollagenfasern durch Sirius Red.

Auch auf RNA-Ebene wurde die Kollagen 1 Expression untersucht und zwischen den drei Mausarten verglichen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Sirius Red / Fast Green-Färbung konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Kollagen 1 mRNA festgestellt werden (Abbildung 3.8). Die Kollagen 1 mRNA war in den Nieren der α_{2A} -Knockout Mäuse geringer als in den Nieren der Wildtyp und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse. Die Kollagen 1 Expression in den Nieren der Wildtyp und der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse ist ähnlich hoch.

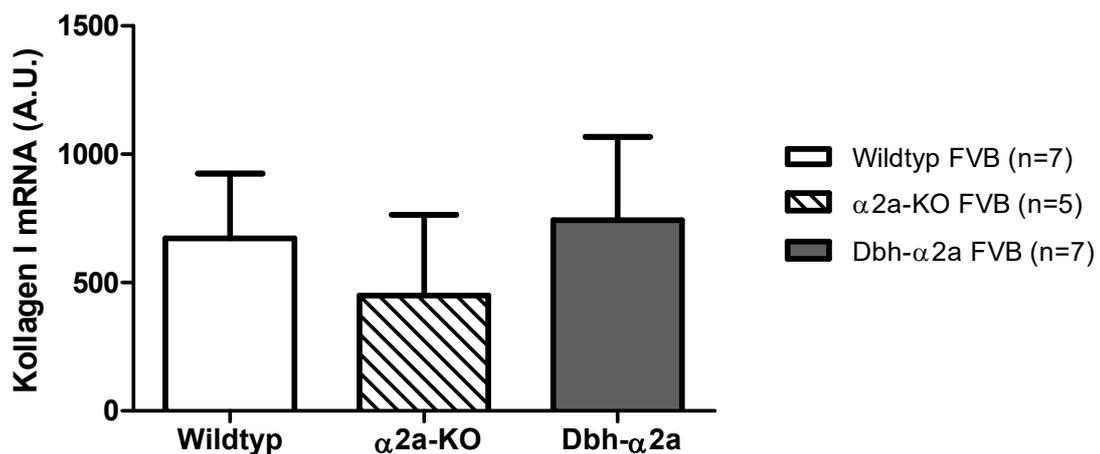
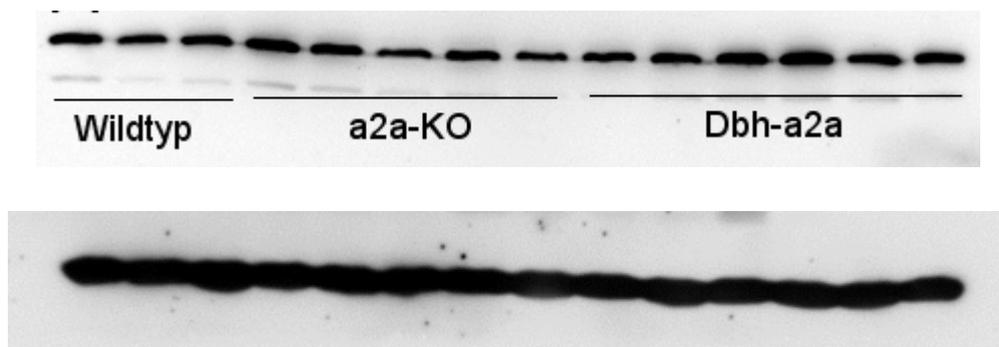
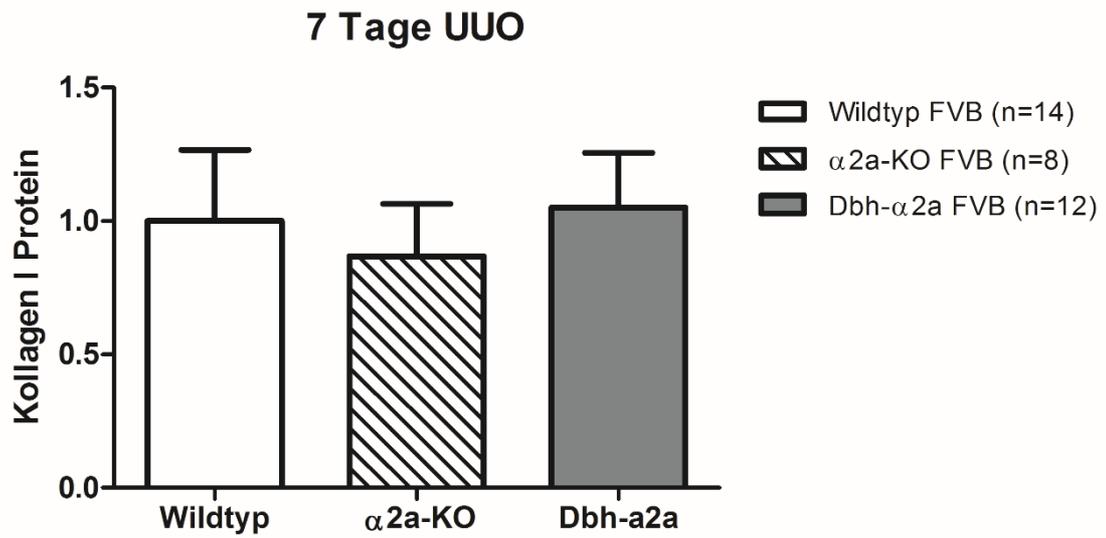


Abbildung 3.8: Renale Kollagen 1 Expression nach 7-tägiger Ureter-Obstruktion. Gegenüberstellung von Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Außerdem wurde die Menge von Kollagen 1 als Protein in dem Nierengewebe der Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse untersucht. Die Mäuse wurden für sieben bzw. 14 Tage der unilateralen Ureter-Obstruktion unterzogen. Dabei zeigte sich ein unterschiedliches Ergebnis zwischen den Zeitpunkten. Nach sieben Tagen UUU bestand kein signifikanter Unterschied in der Menge Kollagen 1 in dem obstruierten Nierengewebe zwischen den drei Mausarten (Abbildung 3.9). Nach 14 Tagen war jedoch der Gehalt an Kollagen 1 in den Nieren der α_{2A} -Knockout Mäuse signifikant geringer als in den Nieren der Wildtyp Mäuse. In den Nieren der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse war das Protein Kollagen 1 signifikant höher exprimiert als in den Nieren der α_{2A} -Knockout Mäuse. Die Menge an Kollagen 1 der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse war geringer als die der Wildtyp Mäuse. (Abbildung 3.10).

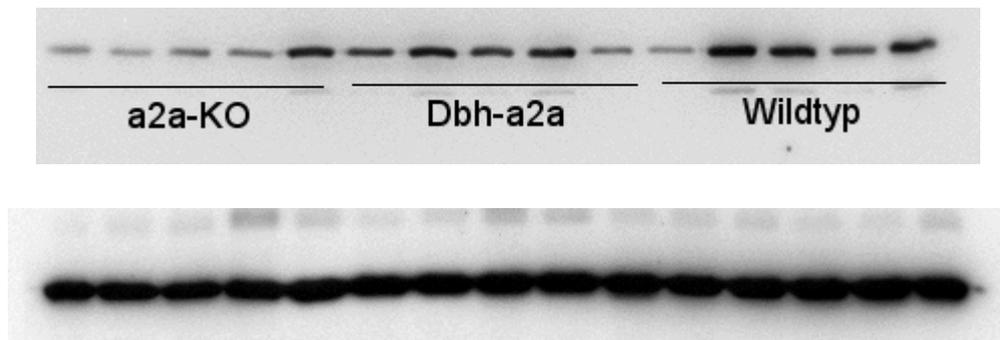


(a)



(b)

Abbildung 3.9: Gemessen wurde die Menge des Proteins sieben Tage nach UUO mittels Western Blot. Bilder der Gele und Ladekontrolle mit β -Actin, Entwicklung mit ECL in (a). Expression des Proteins Kollagen 1 im Nierengewebe der Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse in (b). Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.



(a)

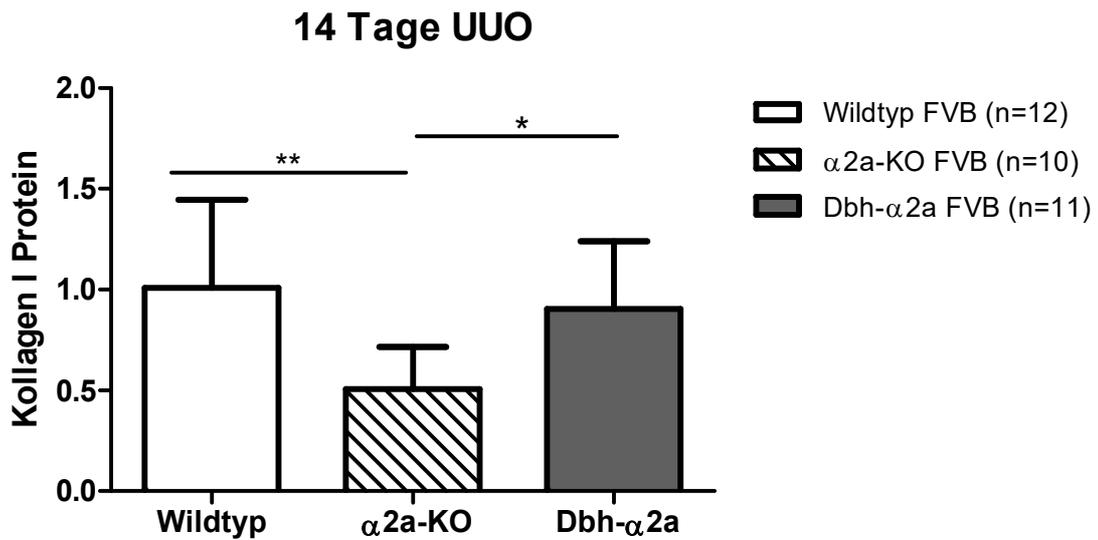


Abbildung 3.10: Gemessen wurde die Menge des Proteins 14 Tage nach UUO mittels Western Blot. Bilder der Gele und Ladekontrolle mit β -Actin, Entwicklung mit ECL in (a). Expression des Proteins Kollagen 1 im Nierengewebe der Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse in (b). ** $p < 0,01$ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen, sowie * $p < 0,05$ einen signifikanten Unterschied zwischen α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen an (*One-way ANOVA*).

3.3.3 Renale Expression von Zytokinen und Biomarkern

Es wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine und Biomarker in Nierengewebe sieben Tage nach UUO untersucht. Dazu gehörten das „*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*“ (NGAL) und „*kidney injury molecule 1*“ (KIM1) als Biomarker für renale Schädigung, das pro-inflammatorische Zytokin „*tumour necrosis factor α* “ (TNF α) und das Chemokin „*monocyte chemotactic protein 1*“ (MCP1). Dabei konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen den Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse nach UUO festgestellt werden (Abbildung 3.11).

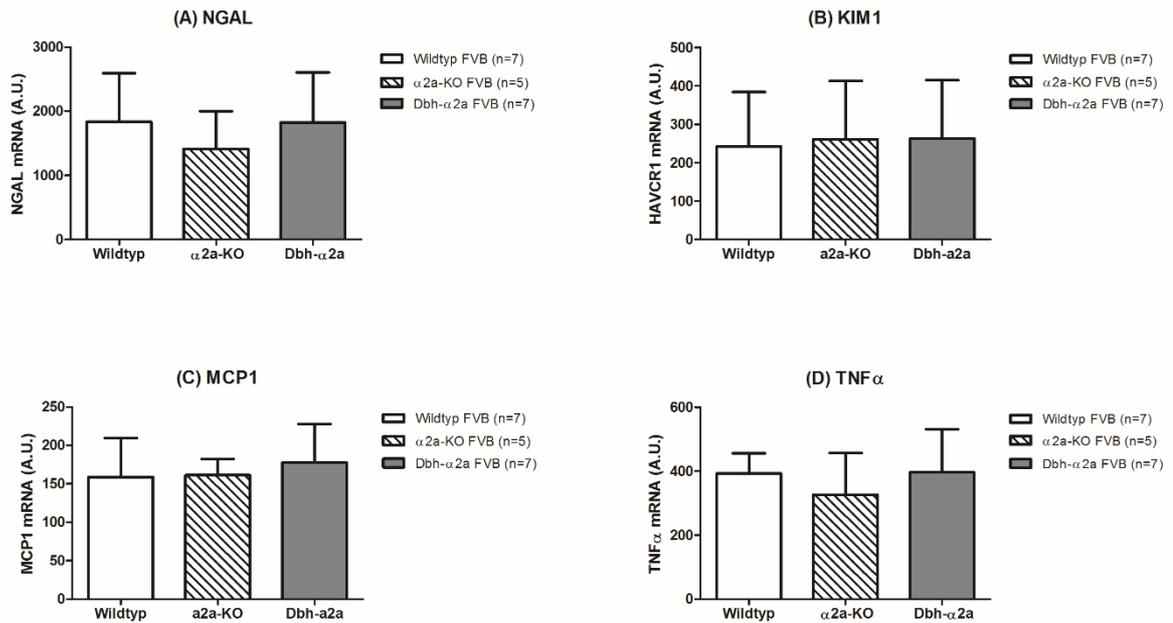


Abbildung 3.11: Renale Expression von Zytokinen und Biomarkern nach 7-tägiger Ureter-Obstruktion. Dargestellt ist in (A) die Expression von NGAL, in (B) KIM1, in (C) MCP1 und in (D) die Expression von TNF α . Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp, α _{2A}-Knockout und Dbh- α _{2A}-transgenen Mäusen zu erkennen.

3.3.4 Regulation des α _{2A}-Adrenozeptors nach UUO

Zur Klärung der Frage, ob die unilaterale Ureter-Obstruktion zu einer Veränderung der Rezeptordichte des α _{2A}-Adrenozeptors geführt hat, wurde überprüft, inwieweit der α _{2A}-Adrenozeptor im Nierengewebe nach 14-tägiger unilateraler Ureter-Obstruktion im Vergleich zur kontralateralen, nicht obstruierten Niere vermehrt oder verringert exprimiert wird. Dies geschah durch Quantifizierung der mRNA des α _{2A}-Adrenozeptors. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung des α _{2A}-Adrenozeptors im Nierengewebe nach UUO bei den Wildtyp Mäusen verglichen mit der kontralateralen Niere. Bei den Dbh- α _{2A}-transgenen Mäusen war hingegen kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abbildung 3.12).

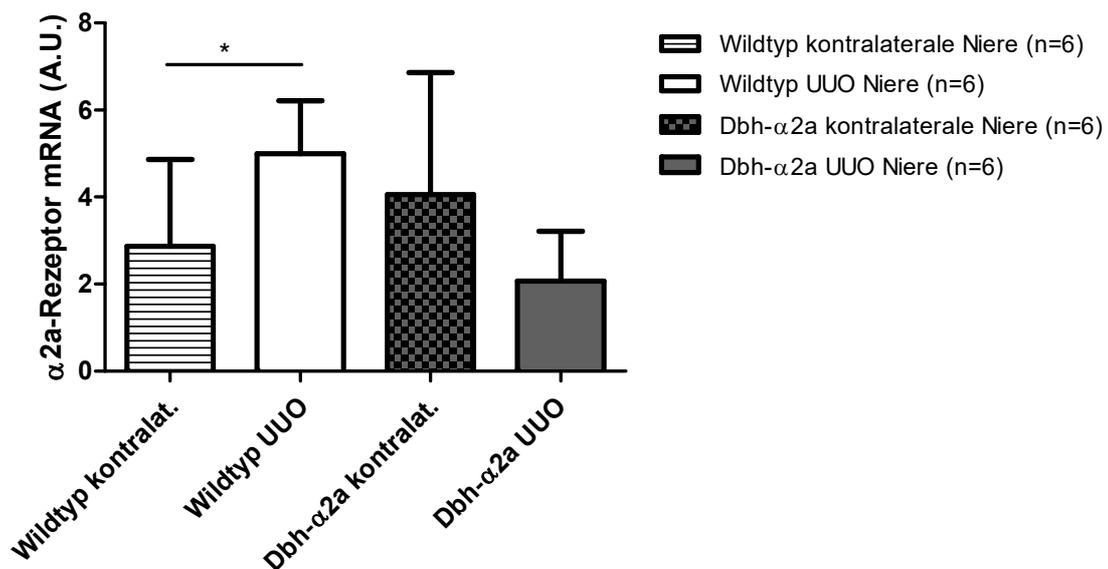


Abbildung 3.12: Expression des α_{2A} -Adrenozeptors in Nierengewebe von Wildtyp und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen. Vergleich von obstruierten Nieren und kontralateralen Nieren. * $p < 0,05$ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den kontralateralen und obstruierten Nieren der Wildtyp Mäuse.

3.4 Einfluss von Makrophagen auf renale Fibrose und Inflammation

Um die Zellart, die für die vom α_{2A} -Adrenozeptor vermittelten Effekte verantwortlich ist, zu identifizieren, wurden peritoneale Makrophagen der drei Mausarten isoliert und untersucht. Dabei sollte zunächst der α_{2A} -Adrenozeptor auf den murinen, peritonealen Makrophagen nachgewiesen werden. In einem Versuch gelang der Nachweis einer schwachen Bande in der PCR mit RNA aus peritonealen Makrophagen der Wildtyp Mäuse (Abbildung 3.13).

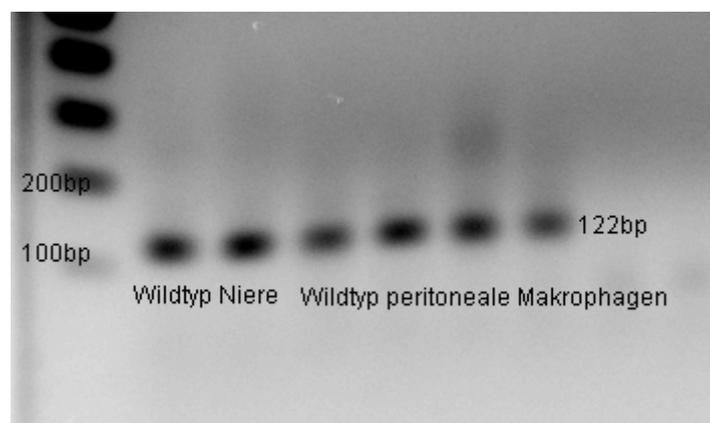


Abbildung 3.13: Expression von α_{2A} -Adrenozeptor-mRNA. Darstellung der Amplifikationsprodukte in einem mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel, 122 bp lange Bande. Es handelt es sich um RNA, die aus Nierengewebe und aus peritonealen Makrophagen von Wildtyp Mäusen gewonnen wurde.

Dass es sich bei den isolierten Peritonealzellen um Makrophagen handelt, wurde überprüft, indem Ausstriche des Zellgemischs angefärbt, mikroskopisch beurteilt und ausgezählt wurden (Abbildung 3.14). In allen Versuchen bestand die Zellpopulation zu mindestens 95 % aus Makrophagen.

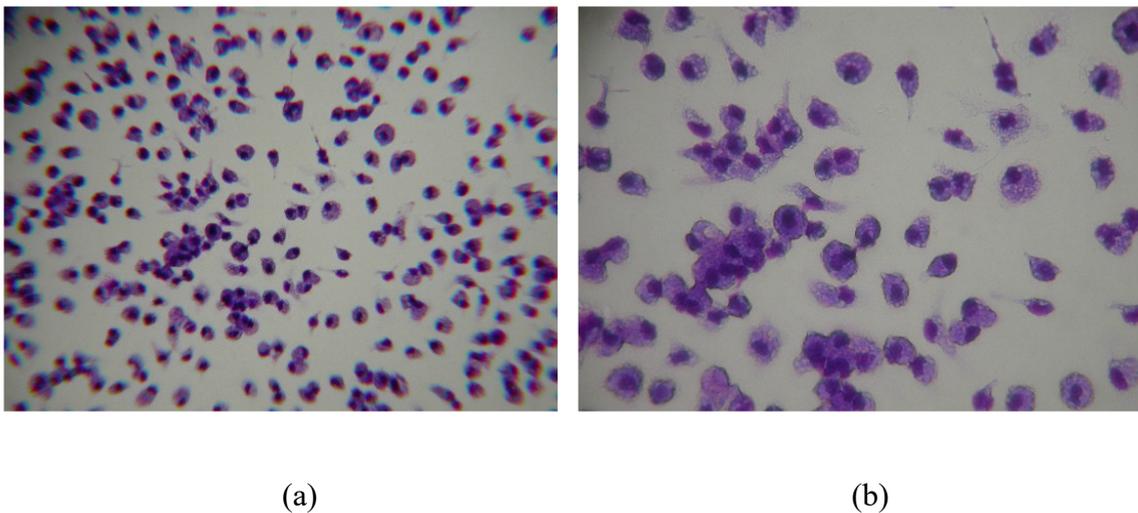


Abbildung 3.14: Beispiele von Aufnahmen der Hemacolor Schnellfärbung der Peritonealzellen. Die Zellen wurden aus dem Peritoneum der Maus isoliert, selektiert, auf einem Objektträger ausgestrichen und gefärbt. Die Bilder wurden in 20-facher (a) und 40-facher (b) Vergrößerung aufgenommen.

Um die Expression des α_{2A} -Adrenozeptors auf Makrophagen weiter zu untersuchen, wurden Makrophagen aus den Nieren der Mäuse isoliert. Auf den Makrophagen der Wildtyp und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse konnte der α_{2A} -Adrenozeptor mittels PCR nachgewiesen werden. Die Makrophagen aus α_{2A} -Knockout Mäusen zeigten keine Expression des α_{2A} -Adrenozeptors (Abbildung 3.15).

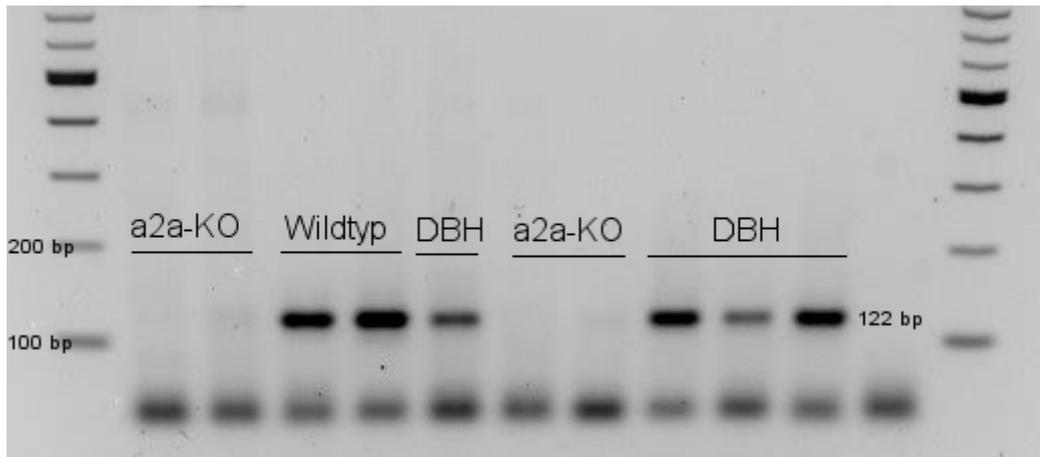


Abbildung 3.15: Expression von α_{2A} -Adrenozeptor-mRNA. Darstellung der Amplifikationsprodukte in einem mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel, 122 bp lange Bande. Es handelt es sich um RNA, die aus Makrophagen aus Nierengewebe von Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen gewonnen wurde.

Um zu überprüfen, ob der α_{2A} -Adrenozeptor auf Makrophagen renale Fibrose und Inflammation induziert, wurden die peritonealen Makrophagen der Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse mit dem α_{2A} -Adrenozeptor-Agonisten UK 14.304 stimuliert und daraufhin die TNF α -Expression mittels RTq-PCR untersucht. Als Positiv-Kontrolle diente die Stimulation mit LPS und als Negativ-Kontrolle wurden die Makrophagen DMSO, dem Lösungsmittel für UK 14.304, exponiert. Dabei zeigte sich eine starke Erhöhung der TNF α -Expression nach Stimulation mit LPS, jedoch keine Änderung der Expression nach Stimulation mit UK 14.304 (Abbildung 3.16).

Die Untersuchung des Zellüberstandes mittels TNF α -ELISAs wies ebenfalls eine massive TNF α -Sekretion nach Stimulation mit LPS nach, jedoch keine nach Stimulation mit UK 14.304 (Ergebnisse nicht gezeigt).

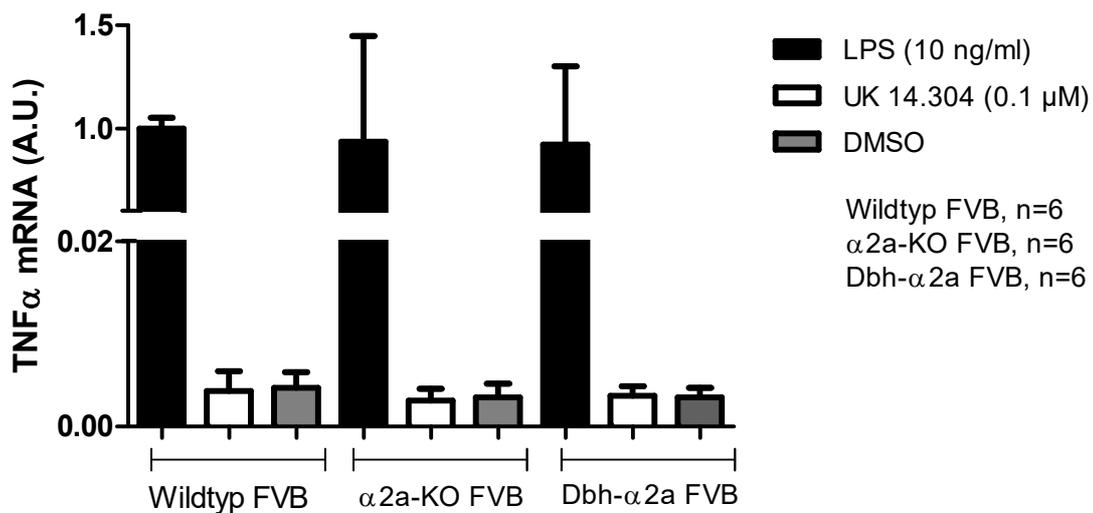


Abbildung 3.16: Expression von TNF α in peritonealen Makrophagen von Wildtyp, α_{2A} -Knockout und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen nach Stimulation mit LPS, UK 14.304 und DMSO. Es zeigte sich eine massive Steigerung der TNF α -Expression durch LPS, jedoch keine durch UK 14.304.

3.4.1 Differenzierung der murinen Makrophagen in M1- und M2-Makrophagen

Zudem wurden Makrophagen aus dem Knochenmark von Femur und Tibia von Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen isoliert, stimuliert und in M1- und M2-Makrophagen differenziert. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung in M1-Makrophagen erfolgreich zu einer Expression von M1-Markern und die Differenzierung in M2-Makrophagen zu einer Expression von M2-Markern führt. Zudem stellte sich ein Unterschied zwischen den Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen heraus. Bei den Wildtyp Mäusen zeigte sich eine signifikant stärkere Expression von proinflammatorischen M1-Markern, wohingegen die α_{2A} -Knockout Mäuse eine signifikant vermehrte Expression von immunsuppressiven M2-Markern aufweisen.

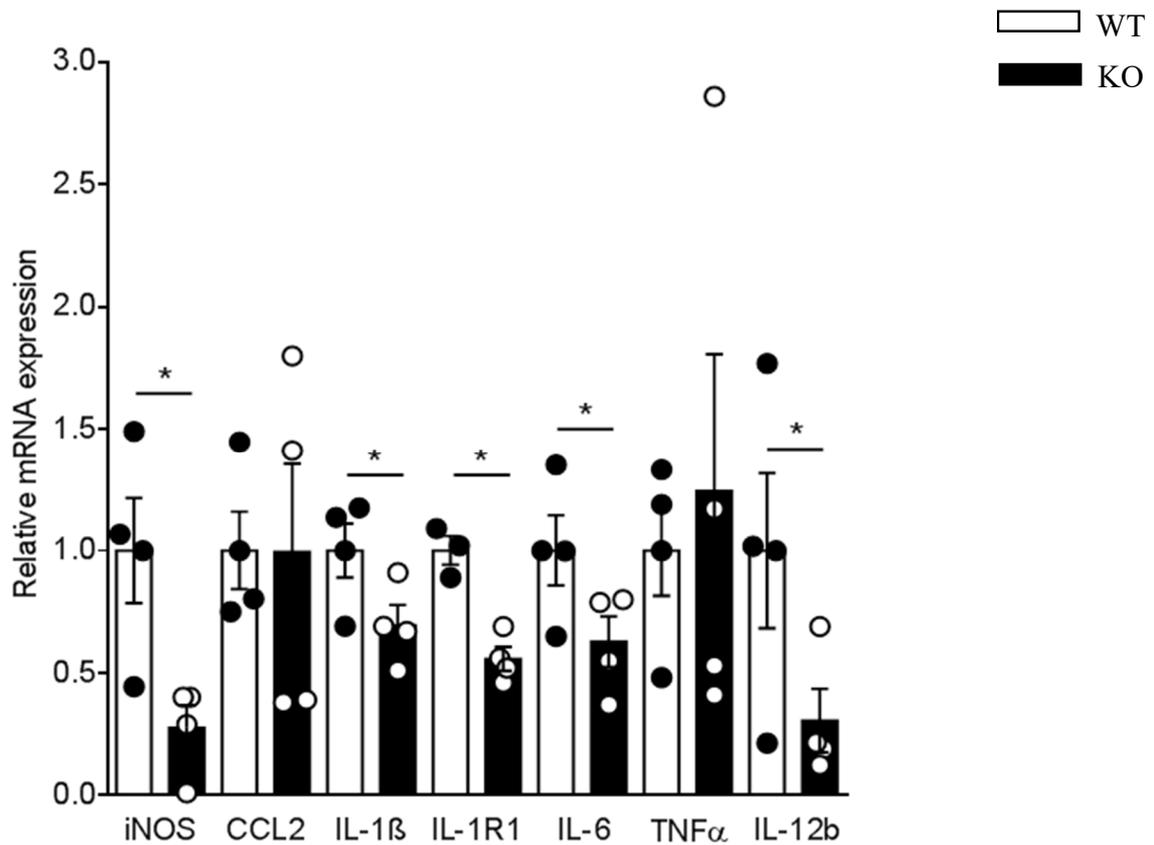


Abbildung 3.17: Expression von M1-Markern in Knochenmarksmakrophagen, die mit M1-spezifischen Stimulantien behandelt wurden, von Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der M1-Marker iNOS, IL-1 β , IL-1R1, IL-6 und IL-12b bei den Wildtyp Mäusen. * $p < 0,05$ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Makrophagen von Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen (ungepaarter T-Test).

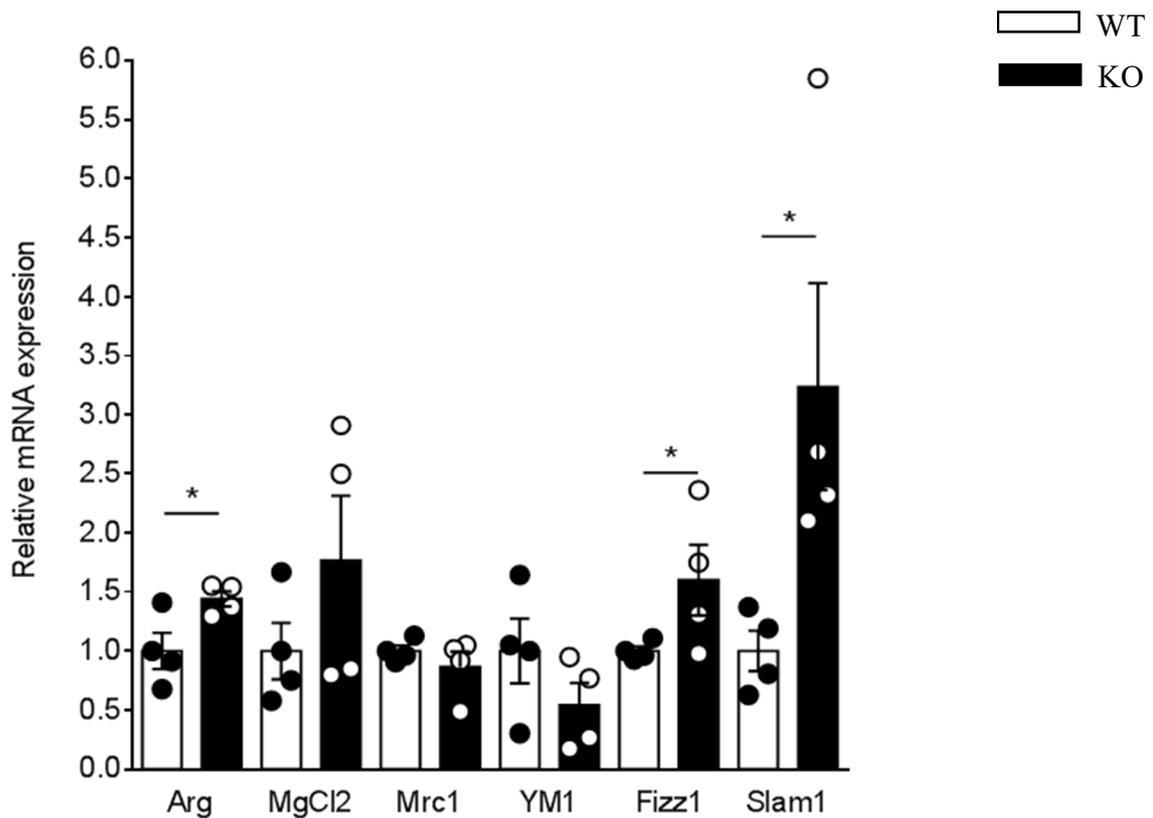


Abbildung 3.18: Expression von M2-Markern in Knochenmarksmakrophagen, die mit M2-spezifischen Stimulantien behandelt wurden, von Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der M2-Marker Arg, Fizz1 und Slam1 bei den α_{2A} -Knockout Mäusen. * $p < 0,05$ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Makrophagen von Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen (ungepaarter T-Test).

3.5 Expression des α_{2A} -Adrenozeptors auf anderen Zelltypen

Neben den Makrophagen wurden auch andere Zelltypen in Betracht gezogen, die für die beobachteten, vom α_{2A} -Adrenozeptor vermittelten Effekte verantwortlich sein könnten.

Eine mögliche Bedeutung könnte den Sammelrohrzellen zugeschrieben werden. Die RTq-PCR-Analyse der aus Sammelrohrzellen von Wildtyp Mäusen extrahierten RNA zeigte eine α_{2A} -Rezeptorexpression (Abbildung 3.19 A). Als Vergleich diente die Expression des α_{2A} -Adrenozeptors in Nierengewebe von Wildtyp Mäusen. Eine Expression der α_{2B} - und α_{2C} -Adrenozeptoren konnte nur sehr gering nachgewiesen werden (Abbildung 3.19 B).

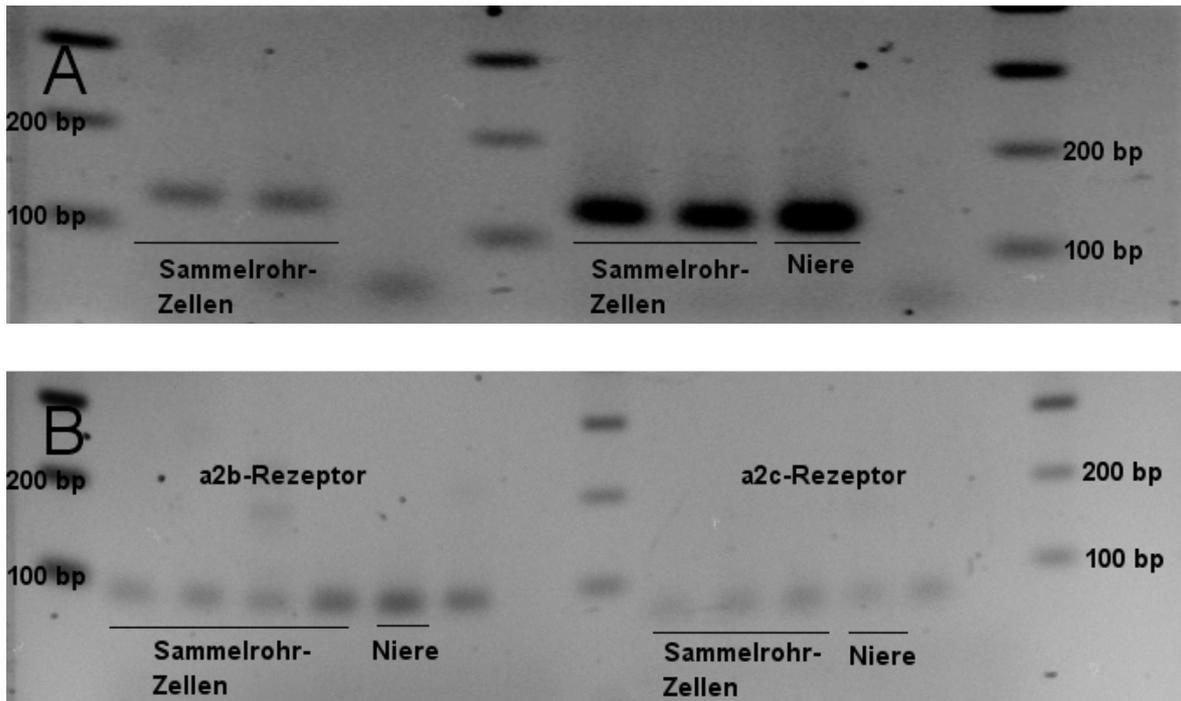


Abbildung 3.19: Expression von α_{2A} -Adrenozeptor-mRNA (A) und α_{2B} - und α_{2C} -Adrenozeptor-mRNA (B). Darstellung der Amplifikationsprodukte in einem mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel. Der α_{2A} -Adrenozeptor entspricht der 122 bp langen Bande. Es handelt sich um RNA gewonnen aus Sammelrohrzellen sowie aus Nierengewebe zum Vergleich (siehe Beschriftung).

Eine weitere Zellpopulation, die möglicherweise eine Rolle bei den beobachteten Effekten spielt, sind die T-Lymphozyten. Die RTq-PCR-Analyse der aus T-Lymphozyten von Wildtyp Mäusen extrahierten RNA wies eine schwache α_{2A} -Rezeptorexpression nach (Abbildung 3.20).

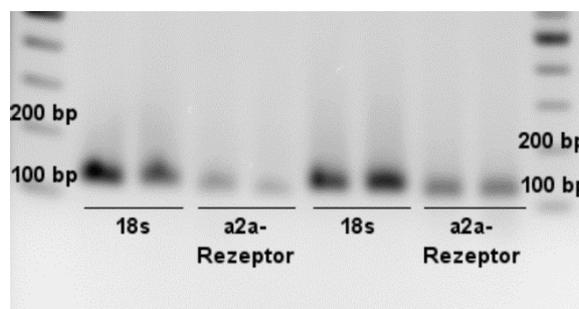


Abbildung 3.20: Expression von α_{2A} -Adrenozeptor- und 18s-mRNA. Darstellung der Amplifikationsprodukte in einem mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel. Der α_{2A} -Adrenozeptor entspricht der 122 bp langen Bande. Amplifiziert wurde RNA, gewonnen aus T-Lymphozyten.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des α_{2A} -Adrenozeptors auf renale Inflammation und Fibrose untersucht und dabei zwischen den Effekten der α_{2A} -Adrenozeptoren anhand zwei verschiedener Maus-Modelle differenziert. Dabei handelte es sich um die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse, denen sowohl die präsynaptischen Autorezeptoren als auch die postsynaptischen Heterorezeptoren fehlten, und die Dbh- α_{2A} -transgene Mäuse mit selektiver *Re-Expression* von präsynaptischen Autorezeptoren. Diese Mäuse wurden in Hinblick auf renale Neurotransmission und die Entwicklung von renaler Fibrose und Inflammation untersucht und verglichen.

4.1 Erfolgreiche Generierung der Dbh- α_{2A} -transgenen Maus

Als Kontrolle der Rückzuchten und Kreuzungen, die zur Generierung der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse geführt haben, wurden Genotypisierungen aus DNA von Schwanzbiopsien der Mäuse durchgeführt. Dabei zeigten sich eindeutige Amplifikationsprodukte. So konnten die Wildtyp Mäuse mit normaler Expression des α_{2A} -Adrenozeptors, die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse ohne funktionellen α_{2A} -Adrenozeptor und die Dbh- α_{2A} -transgene Mäuse mit selektiver Expression des Rezeptors in adrenergen Zellen eindeutig identifiziert werden.

Dies konnten auch Gilsbach et. al nach ihrer Generierung der Dbh- α_{2A} -transgenen Maus nachweisen. Die Arbeitsgruppe detektierte mRNA des Dbh- α_{2A} -Transgens in peripherem und zentralem Nervengewebe, wohingegen die mRNA Expression in nicht-adrenergen Regionen deutlich geringer war. [30]

Die erfolgreiche Generierung der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse zeigte sich auch in der unterschiedlichen Expression des α_{2A} -Adrenozeptors im Nierengewebe der drei Mausarten. Der Rezeptor konnte in den Nieren der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse wie erwartet nicht nachgewiesen werden. In den Nieren der Wildtyp Mäuse war eine sehr starke renale Expression zu beobachten, wohingegen die Expression in den Nieren der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse schwächer ausfiel. Dies weist darauf hin, dass in der Mausniere sowohl die α_{2A} -Adrenozeptoren auf adrenergen als auch auf nicht-adrenergen Zellen

vorhanden sind. Die schwächere Expression des Rezeptors in den Nieren der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse ist durch das Fehlen der α_{2A} -Adrenozeptoren auf nicht-adrenergen Zellen, die jedoch in den Wildtyp Mäusen vorhanden sind, zu erklären.

Letztlich ist jedoch der stärkste Beweis für die erfolgreiche Generierung der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse in den Ergebnissen der renalen Noradrenalin-Freisetzung nach renaler Nervenstimulation zu finden.

4.2 Renale Neurotransmission in der Dbh- α_{2A} -transgenen Maus im Vergleich zur α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Maus

In dieser Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Noradrenalin-Freisetzung nach renaler Nervenstimulation in der isoliert perfundierten Niere von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen nachgewiesen werden. Interessant ist, dass die renale Neurotransmission in Nieren von Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen im Vergleich zu α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen signifikant geringer war. Zwischen den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen und Wildtyp Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die verstärkte renale Neurotransmission, die in den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen zu sehen ist, ist in den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen aufgehoben. Das spricht dafür, dass die Autoinhibition der Noradrenalin-Freisetzung für diese Beobachtungen verantwortlich ist. Diese ist durch den Knockout aufgehoben. Durch die *Re-Expression* des Rezeptors in die adrenergen Zellen in den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen ist die Autoinhibition wieder intakt und die Noradrenalin-Freisetzung somit geringer.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das Dbh- α_{2A} -transgene Mausmodell funktioniert. Die Beobachtungen bestätigen die Bedeutung des α_{2A} -Adrenozeptors für die renale präsynaptische Noradrenalin-Regulation, die auch mit einem α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Modell auf dem Hintergrund von C57BL/6 Mäusen beschrieben wurde. [54]

Hoch et. al beobachteten bereits eine erhöhte Noradrenalin-Freisetzung nach renaler Nervenstimulation in α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Zudem zeigte ihre Arbeit eine gesteigerte Noradrenalin-Freisetzung in den Wildtyp Mäusen nach renaler Nervenstimulation nach Gabe des α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin. Dies weist auf eine gesteigerte sympathische Aktivität hin. [35]

Es ist bekannt, dass eine erhöhte sympathische Aktivität die Progression einer Niereninsuffizienz beeinflusst. Die sympathische Aktivität korreliert dabei mit der Konzentration von Noradrenalin im Plasma. [8, 9] In Studien wurde gezeigt, dass bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen eine erhöhte Noradrenalin-Konzentration im Plasma und somit eine erhöhte sympathische Aktivität, vorlag. Diese machte sich auch durch eine Tachykardie bemerkbar. [34] Das erhöhte Plasma-Level an Noradrenalin beobachteten auch Gilsbach et. al [48]

4.3 Beurteilung der renalen Inflammation und Fibrose

Eine erhöhte sympathische Aktivität spielt eine wesentliche Rolle bei der Progression von chronischer Niereninsuffizienz und der Entstehung von kardiovaskulären Komplikationen. [8, 55] Sympathische Efferenzen sowie chemo- und mechanosensitive afferente Nervenfasern sind an der Regulation der peripheren Inflammation und Immunantwort beteiligt.

Die afferenten Nervenfasern können zu einer Aktivierung oder Hemmung renaler sympathischer Aktivität führen. [56-58] Durch eine erhöhte sympathische Aktivität kommt es zu erhöhten Spiegeln von Neurotransmittern, insbesondere von Noradrenalin. Dies hat in der Niere unterschiedliche Auswirkungen, die zu Bluthochdruck und chronischen Nierenerkrankungen führen können. So bewirkt Noradrenalin am juxtaglomerulären Apparat über eine erhöhte Renin-Freisetzung die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Des Weiteren kommt es an renalen Gefäßen zu einer Vasokonstriktion, einer Erhöhung des renalen Gefäßwiderstandes und somit zu einer vaskulären Hypertrophie und Reduktion der glomerulären Filtrationsrate. An den Tubuluszellen bewirkt Noradrenalin eine verstärkte Natrium- und Wasserretention. Außerdem beeinflusst Noradrenalin die verstärkte Infiltration von Immunzellen in die Niere und die vermehrte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Auf diese Weise resultiert eine erhöhte sympathische Aktivität in Hypertonie, Inflammation und Fibrose. [7, 22, 59-61]

Kommt es in einem gesunden Organismus zu einer erhöhten sympathischen Aktivität, so werden die afferenten Nervenfasern der Niere aktiviert. Diese wiederum bewirken über inhibitorische Neurone im zentralen Nervensystem eine Verringerung der sympathischen Aktivität. [59, 62, 63] Somit wird über einen negativen *Feedback*-Mechanismus vor der

erhöhten sympathischen Aktivität geschützt. Bei akuter oder chronischer Nierenschädigung werden in der Niere die chemo- und mechanosensitiven afferenten Nerven aktiviert. Dadurch kommt es im zentralen Nervensystem zu einer Aktivierung der renalen efferenten sympathischen Nervenfasern und somit zu einer erhöhten sympathischen Aktivität, welche über oben genannte Mechanismen zu einer weiteren Progression der Nierenschädigung führt.

Aus diesem Grund wäre es denkbar, dass in dem experimentellen Modell einer Nierenfibrose, die unilaterale Ureter-Obstruktion, die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse, die Anzeichen einer erhöhten sympathischen Aktivität aufwiesen, eine stärkere Progression der Erkrankung erfahren. Die Wildtyp und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse, die niedrigere Noradrenalin-Level zeigten, würden somit eine geringere Progression der chronischen Nierenkrankheit aufweisen.

Inflammation

Interessanterweise konnten wir genau das Gegenteil nachweisen. Nach Herbeiführen der experimentellen Nierenschädigung durch unilaterale Ureter-Obstruktion wurde die Makrophageninfiltration in den Nieren der Mäuse untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant geringere Infiltration von Makrophagen in die Nieren der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse als in die Nieren der Wildtyp und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse. Die Makrophageninfiltration der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse war geringer als die der Wildtyp Mäuse, jedoch höher als die der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Beobachtungen von Kim et. al, die ebenfalls zeigen konnten, dass die Inhibition von α_2 -Adrenozeptoren durch Antagonisten in Mäusen nach unilateraler Ureter-Obstruktion zu einer Reduktion von Inflammation und Fibrose führt und die Aktivierung der Rezeptoren schädlich auf die Progression der renalen Schädigung wirkt. Die Nieren zeigten unter anderem eine Reduktion von Kollagen1, geringere Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und eine niedrigere Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. [7]

Auch in experimentellen Modellen akuter Nierenschädigung wurden vergleichbare Ergebnisse erbracht. So zeigten Mäuse, deren Nieren durch renale Ischämie und Reperfusion geschädigt wurden, durch die Behandlung mit einem α_2 -Adrenozeptor-Antagonisten eine geringere Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen. [64] Des Weiteren wurde bei

einer Cisplatin-induzierten Nephropathie unter Inhibition von α_2 -Adrenozeptoren eine Verbesserung der Nierenfunktionsstörung und der histologischen Schäden beobachtet. [65]

Ähnliches zeigten auch Studien über experimentelle Lungenschädigung. Die Inflammation in der Lunge wurde durch Blockierung von α_2 -Adrenozeptoren auf Makrophagen supprimiert. [41] Interessanterweise zeigte eine kürzlich durchgeführte Studie über akutes Lungenversagen bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen mit dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse. Dabei konnten bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen nach Induktion von akutem Lungenversagen erhöhte Noradrenalin-Konzentrationen im Lungengewebe nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine geringere Infiltration von Immunzellen und eine geringere Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. In alveolären Makrophagen verminderte Noradrenalin nachweislich die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine *in vitro*. [66]

Die Unterschiede in der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die in anderen Studien gezeigt wurden [7, 67], konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es stellten sich dabei keine signifikanten Unterschiede heraus. Dies könnte möglicherweise durch die anti-inflammatorischen Effekte von Noradrenalin über wiederum β_2 -Adrenozeptoren erklärt werden. Es wurde gezeigt, dass die Applikation eines β_2 -Adrenozeptor-Agonisten in regulatorischen T-Zellen zu einer verstärkten anti-inflammatorischen Reaktion führt. [68, 69] Studien, die die Auswirkungen von Noradrenalin auf B- und T-Zellen untersuchen, implizieren, dass Noradrenalin auf Immunzellen sowohl eine pro- als auch eine anti-inflammatorische Wirkung hat. [70, 71]

Fibrose

Die Kollagen-Expression, als Maß für renale Fibrose, wurde histologisch sowie auf RNA- und Protein-Ebene bestimmt. Die Menge an Kollagen 1 in den Nieren der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse war im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen signifikant reduziert. Die Ergebnisse der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse lagen erneut zwischen denen der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen. Die Differenzen waren erkennbar, jedoch nur zum Teil signifikant. Die signifikanten Differenzen lagen nach 14-tägiger unilateraler Ureter-Obstruktion vor, sodass die Annahme besteht, dass sich die Unterschiede mit längerer Behandlungsdauer weiter intensivieren könnten. Auch Kim et. al untersuchten die Mäuse drei oder zehn Tage nach unilateraler Ureter-Obstruktion und konnten die größeren Unterschiede nach längerem Zeitintervall feststellen.

Kim et. al zeigten, dass Zellkulturmedium von Noradrenalin-exponierten Tubuluszellen freigesetztes TGF- β 1 und CTGF enthält und die Differenzierung von interstitiellen Nierenfibroblasten in α -SMA-positive Myofibroblasten auslöst und Noradrenalin somit zu Fibrogenese beiträgt. Dies wird durch die Inhibition von α_2 -Adrenozeptoren verhindert. [7, 64]

Die von Kim et. al beschriebenen inflammatorischen und fibrogenen Effekte des Noradrenalins könnten die Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Maus-Modellen erklären. Die Wildtyp Mäuse, die über reguläre α_{2A} -Adrenozeptoren verfügen, zeigen den ungünstigsten Verlauf. Die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse, die keine α_{2A} -Adrenozeptoren haben, weisen das geringste Ausmaß an Inflammation und Fibrose auf. Dahingegen sind die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse, die ausschließlich α_{2A} -Adrenozeptoren in adrenergen Zellen besitzen, nicht in gleichem Maße wie die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse geschützt.

Dies unterstreicht die Bedeutung des α_{2A} -Adrenozeptors auf nicht-adrenergen Zellen wie Immunzellen und Tubuluszellen. Noradrenalin bewirkt auf Tubuluszellen zum einen tubuläre Apoptose und zum anderen die Differenzierung von Nierenfibroblasten in Myofibroblasten und trägt somit zu Fibrogenese bei. Noradrenalin bewirkt außerdem eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. [7, 64] Die Aktivierung von α_{2A} -Adrenozeptoren auf Makrophagen führt zu einer vermehrten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α . [49, 72] Diese Effekte werden durch den Knockout von α_{2A} -Adrenozeptoren auf nicht-adrenergen Zellen verhindert.

Es besteht Grund zur Annahme, dass das Zusammenspiel der α_{2A} -Adrenozeptoren auf adrenergen und nicht-adrenergen Zellen für die Progression der chronischen Nierenkrankheit in diesem Modell verantwortlich ist. Um dies weiter zu untersuchen, könnten die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse vor einer unilateralen Ureter-Obstruktion einer renalen Denervierung unterzogen werden, wodurch die Autorezeptoren auf adrenergen Zellen ebenfalls eliminiert würden. Dann wäre eine Verminderung der renalen Inflammation und Fibrose zu erwarten.

Gilsbach et. al nutzten ebenfalls die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse und die Dbh- α_{2A} -transgene Mauslinie. Sie zeigten ein gesteigertes Noradrenalin-Level im Plasma, kardiale Hypertrophie und Fibrose in den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen, welche in

den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen nicht zu finden waren. [48] Somit bestehen Unterschiede zwischen den Untersuchungen am Herzen und an der Niere. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Wirkung von Noradrenalin in den verschiedenen Organen erklären. In den Untersuchungen von Gilsbach et. al zeigten sich bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen gesteigerte Noradrenalin-Level im Plasma. Die Sympathikusaktivierung führt über eine positive Inotropie zu einer Druckbelastung des Herzens und folglich zu typischen kardiovaskulären Konsequenzen, einschließlich Umwandlung des linken Ventrikels, kardialer Hypertrophie und Fibrose. [27, 48]

4.4 Hochregulation des α_{2A} -Adrenozeptors in CKD

Eine weitere Fragestellung ist, ob die herbeigeführte chronische Nierenkrankheit zu einer Veränderung der Rezeptordichte des α_{2A} -Adrenozeptors führt.

Diese Arbeit konnte einen signifikanten Unterschied in der mRNA Expression des α_{2A} -Adrenozeptors in Nieren von Wildtyp Mäusen feststellen. Der Rezeptor war in den Nieren der Wildtyp Mäuse nach unilateraler Ureter-Obstruktion signifikant höher exprimiert als zuvor. Interessanterweise konnte keine signifikante Differenz der Rezeptorexpression in den Nieren der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse gezeigt werden. Dies indiziert, dass es nur zu einer Hochregulation der α_{2A} -Adrenozeptoren auf nicht-adrenergen, z.B. Immun- oder Epithelzellen, und nicht auf adrenergen Zellen kommt. Durch die Hochregulation des Rezeptors nach experimenteller Nierenfibrose könnten die inflammatorischen und fibrogenen Effekte des Noradrenalins in Wildtyp Mäusen durch vermehrte α_{2A} -Adrenozeptoren verstärkt sein und dadurch das schlechtere Outcome der Wildtyp Mäuse erklären.

Dies stimmt mit den Beobachtungen von Kim et al. überein, die eine Hochregulation des α_{2A} -Adrenozeptors auf Tubuluszellen in Nieren nach unilateraler Ureter-Obstruktion nachweisen konnten. [7] Hoch et. al hingegen konnten keine Änderung der mRNA Expression des α_{2A} -Adrenozeptors in den Nieren von Mäusen nach Herbeiführen einer chronischen Niereninsuffizienz durch subtotale Nephrektomie feststellen. [35]

4.5 Unterschiede bei der Differenzierung der murinen Makrophagen in M1- und M2-Makrophagen

Die zuvor beschriebenen Differenzen zwischen den α_{2A} -Adrenozeptor Knockout und Wildtyp Mäusen könnten außerdem über unterschiedliche Effekte der Makrophagen erklärt werden.

Bei der Untersuchung der Knochenmarksmakrophagen zeigte sich ein Unterschied zwischen den Wildtyp und α_{2A} -Knockout Mäusen. Die Knochenmarksmakrophagen der Wildtyp Mäuse zeigten eine deutlich stärkere Expression von pro-inflammatorischen M1-Markern, wohingegen die α_{2A} -Knockout Mäuse eine signifikant vermehrte Expression von immunsuppressiven M2-Markern aufwiesen.

Bei Auftreten einer Organschädigung kommt es zur Rekrutierung von Monozyten, die sich in klassisch aktivierte M1-Makrophagen oder alternativ aktivierte M2-Makrophagen differieren. [38] Die Makrophagen haben in der Niere je nach Subtyp zwei konträre Funktionen. Nach Infiltration in die Niere sezernieren M1-Makrophagen pro-inflammatorische Zytokine, die Gewebeschäden durch verstärkte Inflammation und somit letztendlich Fibrose begünstigen. Auf der anderen Seite sezernieren die M2-Makrophagen immunsuppressive Mediatoren und begünstigen Angiogenese, Zellproliferation sowie Wundheilung. [38, 40] Die Aktivierung von α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren scheint die Polarisation in den pro-inflammatorischen M1-Phänotyp der Makrophagen zu induzieren, wohingegen die Aktivierung von β_2 -Adrenozeptoren die Polarisation in Richtung des anti-inflammatorischen M2-Phänotyps vermittelt. [73-75]

Somit könnte die verstärkte Expression von anti-inflammatorischen M2-Markern der Knochenmarksmakrophagen der α_{2A} -Knockout Mäuse eine weitere Erklärung für das zum Teil bessere Outcome der α_{2A} -Knockout Mäuse sein.

4.5 Charakterisierung der verantwortlichen Zellart

4.5.1 Makrophagen

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die nicht-adrenerge Zellart zu identifizieren, welche für die Effekte des α_{2A} -Adrenozeptors auf renale Fibrose und Inflammation verantwortlich ist.

Kommt es zu einer Schädigung der Niere, infiltrieren unter anderem Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen das Gewebe und setzen Zytokine und Wachstumsfaktoren frei. [50] Makrophagen und ihre Vorstufen, die Monozyten, sind vorwiegend verantwortlich für die Fibrogenese. [38] Makrophagen verfügen über Adrenozeptoren. Die Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren führt zu einer verstärkten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und pro-fibrogenen Zytokinen. Noradrenalin reguliert so unter anderem die Produktion und Sekretion von TNF α in Makrophagen. [49, 50] Es kam nach der Entfernung von Makrophagen durch Ganzkörper-Röntgenbestrahlung von Ratten zu einer Verringerung von Fibrose, Glomerulosklerose und Albuminurie. [39] Flierl et. al konnten zeigen, dass der α_{2A} -Adrenozeptor auf Makrophagen exprimiert ist und pulmonale Inflammation und Fibrose vermittelt. Außerdem wiesen sie eine Expression der Enzyme der Biosynthese von Katecholaminen wie Tyrosin-Hydroxylase und Dopamin- β -Hydroxylase in alveolären Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nach. [41] Anhand dieser Beobachtungen wäre es möglich, dass die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse auch über den α_{2A} -Adrenozeptor in Phagozyten verfügen. Der Fokus dieser Arbeit lag zunächst auf der Untersuchung von Makrophagen.

Nach Isolation von Makrophagen aus Nierengewebe der unterschiedlichen Mausstämmen, konnte auf Makrophagen der Wildtyp und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse der α_{2A} -Adrenozeptor mittels PCR nachgewiesen werden, wohingegen die Makrophagen aus α_{2A} -Knockout Mäusen keinen α_{2A} -Adrenozeptor zeigten. Dies bestätigt das Vorhandensein von α_{2A} -Adrenozeptoren auf Makrophagen im Nierengewebe der Wildtyp und auch der Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse. Das könnte dadurch erklärt werden, dass Phagozyten, wie bei Flierl et. al beobachtet, in der Lage sind, Katecholamine zu synthetisieren und somit auch über die Enzyme zur Synthese, unter anderem die Dopamin- β -Hydroxylase, verfügen. [41] So könnte über den Dbh-Promoter, der bei der Generierung der Dbh- α_{2A} -transgenen Maus genutzt wurde, der α_{2A} -Adrenozeptor auch in Makrophagen eingeführt worden sein.

In der vorliegenden Arbeit führte die Stimulation der peritonealen Makrophagen mit dem α_{2A} -Adrenozeptor-Agonisten UK 14.304 zu keiner gesteigerten TNF α -Expression in den Makrophagen der Wildtyp Mäuse, wohingegen die Stimulation mit LPS zu einer massiven Steigerung der TNF α -Expression führte. Die Charakterisierung der peritonealen Makrophagen erfolgte zum einen morphologisch mittels Hemacolor-Schnellfärbung. Dabei zeigte sich bei der Betrachtung der Zellen das Vorhandensein von mindestens 95 % Makrophagen. Zum anderen erfolgte eine positive Selektion der Makrophagen aus den

Peritonealzellen über CD11b MicroBeads. So konnte eine Isolation von Makrophagen gezeigt und die Isolation anderer Zelltypen ausgeschlossen werden.

Spengler et. al und Szelényi et. al hingegen konnten eine gesteigerte TNF α -Produktion durch murine Makrophagen nach Stimulation mit dem α_{2A} -Adrenozeptor-Agonisten UK 14.304 nachweisen. [49, 72] Jedoch untersuchten beide Arbeitsgruppen die TNF α -Produktion nach vorheriger Stimulation mit LPS. Auch Baccan et. al konnten bei Makrophagen erst eine gesteigerte Zytokinfreisetzung durch Katecholamine zeigen, nachdem die Makrophagen zuvor mit LPS stimuliert wurden. [76] Der initiale Reiz zur Produktion von TNF α könnte somit im hier vorliegenden Experiment fehlen und dies der Grund für die fehlende TNF α -Expression nach reiner Stimulation mit UK 14.304 sein.

Jedoch könnte auch ein methodisches Problem die Ursache des fehlenden Nachweises der TNF α -Expression in den hier vorliegenden Versuchen sein. Die RNA-Isolation aus den peritonealen Makrophagen gestaltete sich zum Teil schwierig, möglicherweise könnte es an einer zu geringen Zellzahl liegen. Nach der Isolation der peritonealen Makrophagen wurden ca. 170.000 Zellen pro *Well* erreicht. Zhang beschrieb eine gewünschte Zellzahl von 170.000 - 340.000 Zellen pro *Well*. [51] Dahingegen konnte bei der Isolation der Knochenmarksmakrophagen eine durchschnittliche Zellzahl von 600.000 pro *Well* erreicht werden. In der Zukunft könnten somit Stimulationsversuche mit LPS und UK 14.304 mit Makrophagen aus Knochenmark oder Nierengewebe der Mäuse durchgeführt und die TNF α -Expression bestimmt werden.

4.5.2 T-Lymphozyten

Die Progression von Nierenerkrankungen beinhaltet eine Interaktion zwischen T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen. Inadäquate T-Zell-Reaktionen verursachen hypersensitive Immunreaktionen, die Glomerulopathien verursachen können. T-Zellen sezernieren Zytokine, aktivieren Makrophagen und stimulieren diese. [37] Tapmeier et. al untersuchten Mäuse, die nicht über CD4-positive T-Lymphozyten verfügen. Diese waren nach unilateraler Ureter-Obstruktion vor der Entwicklung der Nierenfibrose im Vergleich zu Wildtyp Mäusen geschützt. Zudem konnten sie in den Wildtyp Mäusen eine Akkumulation von T-Lymphozyten in den UO-Nieren nachweisen. [77] Dass T-Zellen bei

der Entwicklung von Nierenfibrose von Bedeutung sind, ist somit unbestritten. Die Rolle und Funktion des α_{2A} -Adrenozeptors auf T-Zellen hingegen ist weniger gut verstanden.

In dieser Arbeit konnte der α_{2A} -Adrenozeptor auf T-Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine schwache Rezeptorexpression. Um die Funktion der T-Zellen weiter zu untersuchen, könnten im Rahmen anderer Studien T-Zellen aus Milzen von Wildtyp Mäusen durch negative Selektion mittels MicroBeads isoliert und die α_{2A} -Adrenozeptor-Expression erneut untersucht werden. Potenzielle Effekte, die der α_{2A} -Adrenozeptor auf T-Zellen vermittelt, können durch Stimulation mit dem α_{2A} -Adrenozeptor-Agonisten UK 14.304 untersucht werden.

4.5.3 Das Tubulussystem der Niere

Ein häufiger Bestandteil von chronisch progressiven Nierenerkrankungen ist die tubulointerstitielle Schädigung. Die Sammelrohre der Niere scheinen an der Progression der Inflammation und Fibrose beteiligt zu sein. [43] So konnten auch Forbes et. al in ihrer Studie zeigen, dass die experimentelle chronische Nierenkrankheit in der Maus, herbeigeführt durch unilaterale Ureter-Obstruktion, durch Zerstörung der glomerulotubulären Einheit und Bildung von atubulären Glomeruli gekennzeichnet ist. Die Tubuli erfahren eine rapide und dramatische Schädigung und Zelltod. [78] Immunzellen sezernieren Zytokine, welche dann auf Fibroblasten und Tubuluszellen wirken und dadurch Fibrogenese induzieren. Dies wird auch durch Untersuchungen *in vitro* bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass die Kokultivierung von Tubuluszellen und aktivierten Leukozyten die epitheliale-mesenchymale Transition und die vermehrte Produktion interstitieller Matrix induziert. [79]

In Anlehnung an diese Beobachtungen kann dem Tubulussystem der Niere bei der Inflammation und Fibrose eine wichtige Rolle zugeteilt werden. Daher ist es interessant, ob der α_{2A} -Adrenozeptor auch auf den Zellen des Tubulussystem exprimiert ist und welche Effekte daraus resultieren. In dieser Arbeit konnte eine α_{2A} -Adrenozeptor Expression auf Sammelrohrzellen von Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wäre es möglich, in weiterführenden Arbeiten zusätzlich proximale und distale Tubuluszellen zu isolieren, die Expression des α_{2A} -Adrenozeptors zu untersuchen und die Tubulus- und Sammelrohrzellen mit dem α_{2A} -Adrenozeptor-Agonisten UK 14.304 zu stimulieren und tubuläre Schädigung und Fibrogenese zu erfassen. Dabei könnte die epitheliale

mesenchymale Transition von Sammelrohrzellen, die auf renale Fibrogenese hindeutet, durch Bestimmung der Expression von Vimentin, α -SMA und E-cadherin untersucht werden. [44]

4.6 Schlussfolgerung

Dem α_{2A} -Adrenozeptor kommt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von renaler Fibrose und Inflammation zu. Ziel dieser Arbeit war es, zwischen den präsynaptischen und postsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptoren zu differenzieren. Dazu wurden die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse und die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse verwendet.

Die renale Freisetzung von Noradrenalin war in den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen signifikant erhöht. Die renale Neurotransmission in den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen hingegen lag auf dem gleichen Niveau wie die der Wildtyp Mäuse. Der präsynaptische α_{2A} -Adrenozeptor scheint für diese Beobachtungen verantwortlich zu sein. Kommt das vom terminalen Axon ausgeschüttete Noradrenalin in Kontakt mit dem präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptor, so wird die weitere Nordadrenalin-Freisetzung gehemmt. Diese *Feedback Inhibition* ist durch den Knockout in den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen aufgehoben und führt zu einer erhöhten renalen Noradrenalin-Freisetzung nach renaler Nervenstimulation. In den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen ist sie wieder intakt, sodass die renale Noradrenalin-Freisetzung das Level der Wildtyp Mäuse erreicht. Dadurch wird bestätigt, dass das Dbh-Mausmodell funktioniert.

Bei der Beurteilung der renalen Inflammation und Fibrose nach experimenteller Induktion einer renalen Fibrose zeigte sich ein deutlich günstiger Verlauf der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Die Progression der Erkrankung war durch den Knockout vermindert. Interessanterweise zeigten die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse nicht den gleichen vorteilhaften Verlauf wie die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse, jedoch auch nicht den ungünstigen Verlauf der Wildtyp Mäuse. Dies unterstreicht, dass dem α_{2A} -Adrenozeptor auf nicht-adrenergen Zellen ebenfalls eine wichtige Funktion zukommt. Es scheint das Zusammenwirken beider Rezeptoren, dem präsynaptischen Rezeptor auf adrenergen Zellen und dem postsynaptischen Rezeptor auf nicht-adrenergen Zellen, für die Progression der chronischen Nierenkrankheit verantwortlich zu sein.

Die Knochenmarksmakrophagen der Wildtyp Mäuse zeigten eine deutlich stärkere Expression von pro-inflammatorischen M1-Markern, wohingegen die α_{2A} -Knockout Mäuse eine signifikant vermehrte Expression von immunsuppressiven M2-Markern aufwiesen. Dies könnte eine Erklärung für das zum Teil bessere Outcome der α_{2A} -Knockout Mäuse sein.

Interessanterweise konnte eine Hochregulation des α_{2A} -Adrenozeptors in den Wildtyp Mäusen nach Herbeiführen einer experimentellen Nierenfibrose gezeigt werden, jedoch nicht in den Dbh- α_{2A} -transgenen Mäusen. Daher scheint es, dass nur der α_{2A} -Adrenozeptor in nicht adrenergen-Zellen bei Inflammation und Fibrose vermehrt exprimiert wird. Die Hochregulation des α_{2A} -Adrenozeptors in den Wildtyp Mäusen könnte den ungünstigeren Verlauf der Wildtyp Mäuse nach UUO erklären.

Somit besteht auch eine stärkere klinische Bedeutung des α_{2A} -Adrenozeptors auf nicht-adrenergen Zellen als bisher angenommen. Es sollte weiterführende Untersuchungen zu dem α_{2A} -Adrenozeptor, seinen Signalwegen und Effekten geben. Dies könnte zu neuen therapeutischen Strategien und möglicherweise zur Veränderung bestehender Therapiekonzepte führen.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, die Zellart zu identifizieren, die für die beobachteten Effekte des α_{2A} -Adrenozeptors mit verantwortlich sein könnte. Der α_{2A} -Adrenozeptor konnte auf Makrophagen aus Nierengewebe der Wildtyp und Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse nachgewiesen werden. Das spricht dafür, dass Makrophagen tatsächlich über die Enzyme zur Synthese von Katecholaminen verfügen und die Dbh- α_{2A} -transgenen Mäuse daher durch den Dbh-Promoter auch über α_{2A} -Adrenozeptoren auf Makrophagen verfügen. Zudem konnte der α_{2A} -Adrenozeptor auf T-Lymphozyten und Sammelrohrzellen der Wildtyp Niere nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bahnen den Weg für weitere Studien, welche die Rolle des α_{2A} -Adrenozeptors auch auf T-Lymphozyten und auf Zellen des Tubulussystems der Niere näher untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. Hering, L., et al., *α 2A-Adrenoceptors Modulate Renal Sympathetic Neurotransmission and Protect against Hypertensive Kidney Disease*. 2020. **31**(4): p. 783-798.
2. *US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States*. Am J Kidney Dis, 2019.
3. Frei, U. and H.J. Schober-Halstenberg, *Nierenersatztherapie in Deutschland, Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007*. QuaSi-Niere gGmbH, 2008: p. 5.
4. *Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2019 der Deutschen Stiftung Organtransplantation*. 2020. p. 88-89.
5. Go, A.S., et al., *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. N Engl J Med, 2004. **351**(13): p. 1296-305.
6. Lupher, M.L., Jr. and W.M. Gallatin, *Regulation of fibrosis by the immune system*. Adv Immunol, 2006. **89**: p. 245-88.
7. Kim, J. and B.J. Padanilam, *Renal nerves drive interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(2): p. 229-42.
8. Rump, L.C., et al., *Sympathetic overactivity in renal disease: a window to understand progression and cardiovascular complications of uraemia?* Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(11): p. 1735-8.
9. Zoccali, C., et al., *Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease*. Circulation, 2002. **105**(11): p. 1354-9.
10. Vonend, O., et al., *Noradrenaline and extracellular nucleotide cotransmission involves activation of vasoconstrictive P2X(1,3)- and P2Y6-like receptors in mouse perfused kidney*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(1): p. 66-74.
11. Oberhauser, V., O. Vonend, and L.C. Rump, *Neuropeptide Y and ATP interact to control renovascular resistance in the rat*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(6): p. 1179-85.
12. Amann, K., et al., *Glomerulosclerosis and progression: effect of subantihypertensive doses of alpha and beta blockers*. Kidney Int, 2001. **60**(4): p. 1309-23.
13. Vonend, O., et al., *ATP release in human kidney cortex and its mitogenic effects in visceral glomerular epithelial cells*. Kidney Int, 2002. **61**(5): p. 1617-26.
14. Vonend, O., et al., *P2Y-receptors stimulating the proliferation of human mesangial cells through the MAPK42/44 pathway*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(6): p. 1119-26.
15. Huber, T.B., et al., *Catecholamines modulate podocyte function*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(3): p. 335-45.
16. Jang, H.S., J. Kim, and B.J. Padanilam, *Renal sympathetic nerve activation via α (2)-adrenergic receptors in chronic kidney disease progression*. 2019. **38**(1): p. 6-14.
17. Ruffolo, R.R., Jr., et al., *Structure and function of alpha-adrenoceptors*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(4): p. 475-505.
18. Limbird, L.E., *Receptors Linked to Inhibition of Adenylate-Cyclase - Additional Signaling Mechanisms*. Faseb Journal, 1988. **2**(11): p. 2686-2695.
19. Bylund, D.B., et al., *International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 121-36.
20. Docherty, J.R., *The pharmacology of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors: evidence for and against a further subdivision*. Pharmacol Ther, 1989. **44**(2): p. 241-84.

21. Starke, K., *Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha2-adrenoceptors*. J Neurochem, 2001. **78**(4): p. 685-93.
22. Amann, K., et al., *Effects of low dose sympathetic inhibition on glomerulosclerosis and albuminuria in subtotaly nephrectomized rats*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(8): p. 1469-78.
23. Guimaraes, S. and D. Moura, *Vascular adrenoceptors: an update*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 319-56.
24. Hein, L., *Adrenoceptors and signal transduction in neurons*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 541-51.
25. Philipp, M., et al., *Placental alpha(2)-adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo*. Nat Genet, 2002. **31**(3): p. 311-5.
26. Haubold, M., R. Gilsbach, and L. Hein, *{Alpha}2B-adrenoceptor deficiency leads to postnatal respiratory failure in mice*. J Biol Chem, 2010. **285**(44): p. 34213-9.
27. Brede, M., et al., *Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure*. Circulation, 2002. **106**(19): p. 2491-6.
28. Brede, M., et al., *Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by alpha 2-adrenoceptor subtypes*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(8): p. 1640-6.
29. Gilsbach, R. and L. Hein, *Are the pharmacology and physiology of alpha(2) adrenoceptors determined by alpha(2)-heteroreceptors and autoreceptors respectively?* Br J Pharmacol, 2012. **165**(1): p. 90-102.
30. Gilsbach, R., et al., *Genetic dissection of alpha2-adrenoceptor functions in adrenergic versus nonadrenergic cells*. Mol Pharmacol, 2009. **75**(5): p. 1160-70.
31. MacMillan, L.B., et al., *Central hypotensive effects of the alpha2a-adrenergic receptor subtype*. Science, 1996. **273**(5276): p. 801-3.
32. Lakhiani, P.P., et al., *Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via "hit and run" gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9950-5.
33. Hein, L., J.D. Altman, and B.K. Kobilka, *Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission*. Nature, 1999. **402**(6758): p. 181-4.
34. Altman, J.D., et al., *Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(1): p. 154-61.
35. Hoch, H., et al., *Regulation of renal sympathetic neurotransmission by renal alpha(2A)-adrenoceptors is impaired in chronic renal failure*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(2): p. 438-46.
36. Hoch, H., *Einwirkung des alpha(2A)-Adrenozeptors auf die Progression der chronischen Niereninsuffizienz*. 2011, Dissertation aus der Klinik für Nephrologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. p. 22-24.
37. Kurts, C., et al., *Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology*. Semin Immunopathol, 2007. **29**(4): p. 317-35.
38. Ricardo, S.D., H. van Goor, and A.A. Eddy, *Macrophage diversity in renal injury and repair*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3522-30.
39. Diamond, J.R. and I. Pesek-Diamond, *Sublethal X-irradiation during acute puromycin nephrosis prevents late renal injury: role of macrophages*. Am J Physiol, 1991. **260**(6 Pt 2): p. F779-86.

40. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
41. Flierl, M.A., et al., *Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 721-U8.
42. Sean Eardley, K. and P. Cockwell, *Macrophages and progressive tubulointerstitial disease*. Kidney Int, 2005. **68**(2): p. 437-55.
43. Nath, K.A., *The tubulointerstitium in progressive renal disease*. Kidney Int, 1998. **54**(3): p. 992-4.
44. Ivanova, L., M.J. Butt, and D.G. Matsell, *Mesenchymal transition in kidney collecting duct epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(5): p. F1238-48.
45. Veelken, R., et al., *Autonomic renal denervation ameliorates experimental glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(7): p. 1371-8.
46. Hausberg, M., et al., *Effects of moxonidine on sympathetic nerve activity in patients with end-stage renal disease*. J Hypertens, 2010. **28**(9): p. 1920-7.
47. Yigiter, M., et al., *The protective effects of metyrosine, lacidipine, clonidine, and moxonidine on kidney damage induced by unilateral ureteral obstruction in rats*. Surg Today, 2012. **42**(11): p. 1051-60.
48. Gilsbach, R., et al., *Sympathetic alpha(2)-adrenoceptors prevent cardiac hypertrophy and fibrosis in mice at baseline but not after chronic pressure overload*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(3): p. 432-42.
49. Spengler, R.N., et al., *Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor*. J Immunol, 1990. **145**(5): p. 1430-4.
50. Liu, Y., *Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2011. **7**(12): p. 684-96.
51. Zhang, X., R. Goncalves, and D.M. Mosser, *The isolation and characterization of murine macrophages*. Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter 14**: p. Unit 14.1.
52. Chen, D., et al., *Impact of Angiotensin Type 1A Receptors in Principal Cells of the Collecting Duct on Blood Pressure and Hypertension*. Hypertension, 2016. **67**(6): p. 1291-7.
53. Ma, L.J. and A.B. Fogo, *Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 350-5.
54. Vonend, O., et al., *Alpha(2A)-adrenoceptors regulate sympathetic transmitter release in mice kidneys*. Br J Pharmacol, 2007. **150**(1): p. 121-7.
55. Neumann, J., et al., *Sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease: pathogenesis, clinical relevance, and treatment*. Kidney Int, 2004. **65**(5): p. 1568-76.
56. DiBona, G.F., *Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(5): p. R1517-24.
57. Zheng, H. and K.P. Patel, *Integration of renal sensory afferents at the level of the paraventricular nucleus dictating sympathetic outflow*. Auton Neurosci, 2017. **204**: p. 57-64.
58. Pyner, S., *The paraventricular nucleus and heart failure*. Exp Physiol, 2014. **99**(2): p. 332-9.
59. DiBona, G.F. and U.C. Kopp, *Neural control of renal function*. Physiol Rev, 1997. **77**(1): p. 75-197.
60. Bradley, E., et al., *Effects of varying impulse number on cotransmitter contributions to sympathetic vasoconstriction in rat tail artery*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. H2007-14.

61. McDonough, A.A., *Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(4): p. R851-61.
62. Kopp, U.C., et al., *Renal sympathetic nerve activity modulates afferent renal nerve activity by PGE2-dependent activation of alpha1- and alpha2-adrenoceptors on renal sensory nerve fibers*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(4): p. R1561-72.
63. Kopp, U.C., et al., *Dietary sodium modulates the interaction between efferent and afferent renal nerve activity by altering activation of α 2-adrenoceptors on renal sensory nerves*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **300**(2): p. R298-310.
64. Kim, J. and B.J. Padanilam, *Renal denervation prevents long-term sequelae of ischemic renal injury*. Kidney Int, 2015. **87**(2): p. 350-8.
65. Salman, I.M., et al., *Characterization of renal hemodynamic and structural alterations in rat models of renal impairment: role of renal sympathoexcitation*. J Nephrol, 2011. **24**(1): p. 68-77.
66. Cong, Z., et al., *α 2A-adrenoceptor deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury by increasing norepinephrine levels and inhibiting alveolar macrophage activation in acute respiratory distress syndrome*. Clin Sci (Lond), 2020. **134**(14): p. 1957-1971.
67. Hoch, H., et al., *9a.05: Sympathetic Nervous System Drives Renal Inflammation by Alpha(2a)-Adrenoceptors*. J Hypertens, 2015. **33 Suppl 1**: p. e118.
68. Vida, G., et al., *β 2-Adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system*. Faseb j, 2011. **25**(12): p. 4476-85.
69. Guerreschi, M.G., et al., *Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4+ Foxp3+ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner*. Eur J Immunol, 2013. **43**(4): p. 1001-12.
70. Kohm, A.P. and V.M. Sanders, *Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): p. 487-525.
71. Sanders, V.M., *The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet?* Brain Behav Immun, 2012. **26**(2): p. 195-200.
72. Szelényi, J., J.P. Kiss, and E.S. Vizi, *Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF-alpha production by alpha2- and beta-adrenoceptors in mice*. J Neuroimmunol, 2000. **103**(1): p. 34-40.
73. Grisanti, L.A., D.M. Perez, and J.E. Porter, *Modulation of immune cell function by α (1)-adrenergic receptor activation*. Curr Top Membr, 2011. **67**: p. 113-38.
74. Grailer, J.J., et al., *Induction of M2 regulatory macrophages through the β 2-adrenergic receptor with protection during endotoxemia and acute lung injury*. J Innate Immun, 2014. **6**(5): p. 607-18.
75. Harwani, S.C., *Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension*. Transl Res, 2018. **191**: p. 45-63.
76. Baccan, G.C., et al., *Effects of cold stress, corticosterone and catecholamines on phagocytosis in mice: differences between resting and activated macrophages*. Neuroimmunomodulation, 2010. **17**(6): p. 379-85.
77. Tapmeier, T.T., et al., *Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction*. Kidney Int, 2010. **78**(4): p. 351-62.

78. Forbes, M.S., B.A. Thornhill, and R.L. Chevalier, *Proximal tubular injury and rapid formation of atubular glomeruli in mice with unilateral ureteral obstruction: a new look at an old model*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(1): p. F110-7.
79. Nightingale, J., et al., *Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(1): p. 21-32.