

**Experimentelle Untersuchungen zu der Beteiligung des renalen
Dopamin D₃ Rezeptors an der Regulation des arteriellen
Blutdruckes**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Torsten Staudacher

Tag der mündlichen Prüfung:

25.07.2005

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. B. Mühlbauer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Drews

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	Formen der arteriellen Hypertonie.....	1
1.2	Behandlungsschema der Hypertonie.....	2
1.3	Die Niere.....	3
1.3.1	Regulationsmechanismen der Niere.....	8
1.3.1.1	RAAS.....	9
1.3.1.2	Regulationsmechanismen der Reninfreisetzung.....	10
1.4	Altersabhängige renale Veränderungen.....	14
1.5	Dopamin und seine Rezeptoren.....	16
1.5.1	Dopamin – Entdeckung, Biosynthese und Elimination.....	16
1.5.2	Dopamin und seine Funktionen.....	18
1.5.3	Dopaminrezeptoren.....	19
1.6.	Der Dopamin D ₃ Rezeptor.....	22
1.6.1	Renale Dopamin D ₃ Rezeptorfunktionen.....	23
1.6.1.1	Dopamin Rezeptoren und arterielle Hypertonie.....	23
1.6.1.2	Dopamin Rezeptoren und Elektrolythaushalt.....	24
2.	EIGENE FRAGESTELLUNG.....	26
3.	MATERIAL.....	27
3.1	Substanzen.....	27
3.2	Geräte.....	29
3.3	Verbrauchsmaterialien.....	31
3.4	Futter/ Diäten.....	32
3.5	Puffer und Lösungen.....	33
3.5.1	Puffer + Laufmittel für die Dopaminbestimmung mit Hilfe der Mikro- und Makro-HPLC.....	34
3.5.2	Laufmittel für die Kreatininbestimmung mit Hilfe der HPLC.....	35

3.5.3	Puffer und Lösungen für die Präparation und Superfusion der juxta-glomerulären Zellen.....	36
3.6	Versuchstiere	39
3.6.1	Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp- Mäuse	39
3.6.1.1	Generierung von Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout-Mäusen	39
3.6.2	Ratten.....	42
4.	METHODEN.....	43
4.1	Tierexperimenteller Teil.....	43
4.1.1	Blutdruckmessung bei wachen Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.....	43
4.1.1.1	Validierung der Methode	43
4.1.1.2	Gewöhnungsphase der Versuchstiere	44
4.1.1.3	Studiendesign der Blutdruckmessung bei den Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.....	45
4.1.1.4	Messvorgang.....	47
4.1.2	Stoffwechselläufigexperimente.....	47
4.1.2.1	Chronische Kochsalzbeladung von Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.....	47
4.1.2.2	Gewinnung der Urinproben	48
4.1.2.3	Bestimmung von Futtermenge, Trinkvolumen und Tiergewicht.....	49
4.1.2.4	Dopaminurinausscheidung (U _{DAV})	49
4.1.2.5	Dopaminkonzentration im Plasma ([DA] _{Plasma}).....	50
4.1.3	Einfluss von Angiotensin II auf den Blutdruck von Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen	50
4.1.3.1	Versuchsdesign und -ablauf.....	50
4.1.3.2	Narkose bei Mäusen	51
4.1.3.3	Präparation der Tiere	52
4.1.3.4	Bolusgaben verschiedener Dosen von humanem Angiotensin II	54
4.2	Isolierung, Anreicherung und Superfusion der juxtaglomerulären Zellen ...	54
4.2.1	Isolierung und Anreicherung der juxtaglomerulären Zellen	54

4.2.2	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer	56
4.2.3	Bestimmung der Viabilität der reninsezernierenden Zellen	56
4.2.4	Beschreibung der Superfusionsapparatur	57
4.2.5	Validierung der Superfusionskammern	59
4.2.6	Bestimmung der Vorlaufzeit	59
4.2.7	Superfusion	60
4.2.8	Bestimmung der Reninrestaktivität auf den Filtern	62
4.2.9	Proteinbestimmung nach LOWRY.....	63
4.2.10	Gewinnung von Angiotensinogen.....	64
5.	ANALYTIK	66
5.1	Analyse der Proben aus den Stoffwechselläufig- und den chronischen NaCl-Beladungsexperimenten.....	66
5.1.1	Bestimmung der Na ⁺ - und K ⁺ -Konzentration im Plasma und Urin	66
5.1.2	Bestimmung von Cl ⁻ in Plasma und Urin	66
5.1.3	Messung der Osmolalität der Plasma- und Urinproben.....	67
5.1.4	Bestimmung der somatischen Charakteristika und Blutprobengewinnung von Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen	67
5.1.5	Hämatokrit	68
5.2	Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate mit Hilfe der Kreatinin-Clearance.....	68
5.3	Bestimmung von Dopamin im Urin, Plasma und Nierengewebe	69
5.3.1	Makro-HPLC-Anlage	70
5.3.1.1	Extraktion und Bestimmung von Dopamin in den Urinproben	70
5.3.1.2	Extraktion und Bestimmung von Dopamin im Nierengewebe.....	72
5.3.2	Mikro-HPLC-Anlage	72
5.3.2.1	Extraktion und Bestimmung von Dopamin in den Plasmaproben.....	73
5.4	Bestimmung der Aldosteronkonzentration im Plasma	73
5.5	Bestimmung der Plasma-Reninaktivität.....	74

5.5.1	Bestimmung der Reninaktivität mittels Radioimmunoassay (RIA).....	74
6.	BERECHNUNGEN UND STATISTIK	77
6.1	Berechnung der Natrium- und Kaliumurinausscheidung ($U_{Na}V$ und U_{KV})	77
6.2	Berechnung der glomerulären Filtrationsrate	77
6.3	Berechnung der Reninaktivität	78
6.4	Statistik.....	78
7.	ERGEBNISSE.....	80
7.1	Tierexperimenteller Teil.....	80
7.1.1	Blutdruckmessung bei wachen Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.....	80
7.1.1.1	Blutdruckwerte der 3 Monate alten Mäuse	81
7.1.1.2	Blutdruckwerte der 11 Monate alten Mäuse	85
7.1.2	Stoffwechselläufigexperimente.....	90
7.1.2.1	Natriumurinausscheidung bei chronischer Kochsalzbeladung bei 3 Monate alten Tieren	90
7.1.2.2	Natriumurinausscheidung bei chronischer Kochsalzbeladung bei 11 Monate alten Tieren	92
7.1.2.3	Weitere untersuchte Variablen der Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse vor und während der chronischen Kochsalz- beladung.....	96
7.1.3	Somatische Charakteristika von Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.....	97
7.1.4	Glomeruläre Filtrationsrate von wachen Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.....	102
7.1.4.1	Kreatininurinausscheidung und -konzentration im Plasma	104
7.1.4.2	Glomeruläre Filtrationsrate, mittels Kreatininclearance bestimmt.....	105
7.1.5	Dopaminbestimmung im Urin, Plasma und Nierengewebe von Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen mittels HPLC	106

7.1.6	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System von Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.....	111
7.1.6.1	Plasmareninaktivität	111
7.1.6.2	Plasma Aldosteronkonzentration.....	114
7.1.6.3	Systolische Blutdruckveränderungen bei Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen unter dem Einfluss von humanem Angiotensin II.....	114
7.2	Superfusion von isolierten juxtaglomerulären Zellen	117
7.2.1	Isolierte juxtaglomeruläre Zellen.....	117
7.2.1.2	Angiotensin I Standardkurve	118
7.2.1.3	Einfluss von Vitamin C als Antioxidanz auf die Reninsekretion	119
7.2.1.4	Viabilität der reninsezernierenden Zellen unter dem Einfluss von Dopamin	120
7.2.1.5	Zellzahl und Restaktivität auf den Filtern.....	121
7.2.1.6	Zeitverlaufskurve einer Superfusion von juxtaglomerulären Zellen mit Dopamin	122
7.2.1.7	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Dopamin.....	123
7.2.1.8	Zeitverlaufskurve einer Superfusion von juxtaglomerulären Zellen mit Isoprenalin	124
7.2.1.9	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin.....	126
7.2.1.10	Blockade der dopaminergen Wirkung auf die Reninsekretion durch Atenolol	127
7.2.1.11	Stimulation der Reninsekretion durch SKF 38393.....	129
7.2.1.12	Einfluss von Bromocriptin als unselektiver Dopamin D ₂ Rezeptor Agonist auf die reninsezernierenden Zellen	132
7.2.1.13	Wirkung von 7-OH-DPAT auf die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen	134
7.2.1.14	Superfusion der juxtaglomerulären Zellen mit BSF 201640	136
8.	DISKUSSION.....	139
8.1	Diskussion der Methoden.....	139
8.1.1	Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout-Mäuse zur Untersuchung der D ₃ Rezeptor Funktion	139

8.1.1.1	Blutdruckmessung bei wachen Tieren mit Hilfe der Schwanzdruckplethysmographie.....	140
8.1.1.2	Stoffwechselläufigexperimente.....	140
8.1.1.3	Niedrig-, Normal- und Hochsalzdiät.....	141
8.1.1.4	Detektion der Katecholamine mit Hilfe der HPLC.....	142
8.1.1.5	Kreatinin als physiologischer Marker der glomerulären Filtrationsrate	143
8.1.1.6	Blutdruckmessung unter Angiotensin II Bolus-Injektionen unter Narkose	145
8.1.1.7	Das Modell frisch isolierter superfundierter juxtaglomerulärer Zellen	146
8.2	Diskussion der Ergebnisse.....	147
8.2.1	Tierexperimenteller Teil.....	147
8.2.1.1	Blutdruckmessung bei wachen Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.....	147
8.2.1.2	Natriumurinausscheidung unter chronischer Kochsalzbelastung	151
8.2.1.3	Einfluss der chronisch verabreichten Kochsalzdiäten auf physiologische Funktionen	155
8.2.1.4	Abschätzen der GFR mit Hilfe der Kreatininclearance	158
8.2.1.5	Bestimmung von Dopamin im Plasma, Urin und Nierengewebe	158
8.2.1.6	Plasmareninaktivität	161
8.2.1.7	Blutdruckveränderungen durch Angiotensin II.....	164
8.2.2	Superfusion der juxtaglomerulären Zellen.....	165
8.2.2.1	Dopaminerge Stimulation der Reninsekretion	166
8.2.2.2	Stimulation der JGZ mit dem selektiven Dopamin D ₁ Rezeptor Agonisten SKF 38393	169
8.2.2.3	Einfluss von Bromocriptin auf die Reninsekretion	169
8.2.2.4	Stimulation des Dopamin D ₃ Rezeptors auf den JGZ.....	170
8.2.2.5	Blockade des Dopamin D ₃ Rezeptors auf den JGZ.....	171
9.	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	172
10.	LITERATURVERZEICHNIS	175

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

7-OH-DPAT	7-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralinhydrobromid
(-/-)	Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout-Mäuse
(+/-)	Dopamin D ₃ Rezeptor Wildtyp-Mäuse
Abb.	Abbildung
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
AT I	Angiotensin I
AT II	Angiotensin II
¹²⁵ AT I	¹²⁵ Iod-Thyrosin ⁴ -Angiotensin I
Aqua demin.	Aqua demineralisata
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Albumin aus Rinderserum
Con	Kontrolle
°C	Grad Celcius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
COMT	Katechol-O-Methyltransferase
cpm	counts per minute
d	Tag
[DA] _{Niere}	Dopaminkonzentration in der Niere
[DA] _{Plasma}	Dopaminkonzentration im Plasma
[DA] _{Urin}	Dopaminkonzentration im Urin
DHBA	Dihydroxybenzanilid
DOCA	Deoxycorticosteronacetat
EC ₅₀	Die Konzentration, bei der 50 % des Effektes auftreten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hkt	Hämatokrit

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HS	Hochsalzdiät (<u>H</u> igh <u>S</u> alt diet, 4,6% NaCl)
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
JGZ	Juxtaglomeruläre Zellen
[K ⁺] _{Plasma}	Kaliumkonzentration im Plasma
[K ⁺] _{Urin}	Kaliumkonzentration im Urin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
[Kreatinin] _{Plasma}	Kreatininkonzentration im Plasma
[Kreatinin] _{Urin}	Kreatininkonzentration im Urin
l	Liter
LS	Niedrigsalzdiät (<u>L</u> ow <u>S</u> alt diet, 0,2% NaCl)
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
M	mol/ l
MAO	Monoaminoxidase
MAP	Mittlerer Arterieller Druck
mM	Millimol/ l
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
n	Anzahl der Versuchstiere/ Kammern/ Experimente
Na ⁺	Natrium
[Na ⁺] _{Plasma}	Konzentration von Natrium im Plasma
[Na ⁺] _{Urin}	Konzentration von Natrium im Urin
NG	Nierengewicht

NHE3	Natrium-Protonen-Austauscher in der luminalen Membran des proximalen Tubulus
NO	Stickstoffmonoxid
NS	Normalsalzdiät (<u>N</u> ormal <u>S</u> alt diet, 0,6% NaCl)
osm	Osmol
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatgepufferte Saline
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RR _{Sys}	Systolischer Blutdruck
RR _{Dia}	Diastolischer Blutdruck
s	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SSA	Sulfosalicylsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TV	Trinkvolumen
U	Units
UV	Urinvolumen
U _{Cl} V	Chloridausscheidung mit dem Urin
U _K V	Kaliumurinausscheidung
U _{Krea} V	Kreatininurinausscheidung
U _{Na} V	Natriumurinausscheidung
U _{DA} V	Dopaminurinausscheidung
vs.	versus
x g	x mal Gravitationsbeschleunigung
ZNS	zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1 Formen der arteriellen Hypertonie

Die essentielle Hypertonie ist eine weitverbreitete Dysfunktion des Herz-Kreislauf-Systems und mit schweren, häufig tödlich verlaufender Komplikationen verbunden. So sind Myokardinfarkt, Apoplex und terminale Niereninsuffizienz typische Folgen eines unbehandelten Bluthochdrucks. Ungefähr 25 % der erwachsenen Bevölkerung in den Industrienationen leiden unter einem erhöhten Blutdruck (Hollon et al. 2002), wobei laut der WHO-MONICA Studie Augsburg, 1994/ 95 nur ungefähr 40 % der Männer und 60 % der Frauen behandelt werden. Laut Definition spricht man von einer arteriellen Hypertonie bei Blutdruckwerten höher als 140 mmHg systolisch und 90 mmHg diastolisch. Ein hoher Blutdruck ist ein eigenständiger und wichtiger Risikofaktor, jedoch wird sein Einfluss auf das individuelle Gesamtrisiko durch das Lebensalter sowie Anwesenheit und Ausmaß weiterer Risikofaktoren modifiziert. Dabei spielt der Schweregrad der Hypertonie eine entscheidende Rolle. Es wird zwischen einer Hypertonie ohne Organschäden (Grad I), einer Hypertonie mit Organbeteiligung, wie bei der linksventrikulären Hypertrophie, Verengung der Netzhautarterien, Mikroalbuminurie, Nachweis von arteriellen Plaques (Grad II) oder einer Hypertonie mit Organschäden, wie z.B. Angina pectoris, Myokardinfarkt, Apoplex, Blutungen in der Netzhaut, Serum Kreatinin > 2 mg/ dl oder Aortenaneurysma (Grad III) unterschieden.

Bluthochdruck zählt wie Diabetes mellitus zu den „silent killers“, d.h. die Betroffenen spüren die primäre Form der Erkrankung nicht unmittelbar und lassen sich deshalb auch nicht untersuchen und behandeln. Die Ursachen der primären oder essentiellen Hypertonie sind in den meisten Fällen nicht bekannt, während die sekundären Formen als Begleiterkrankung einer primären pathogenen Veränderung auftreten. Als solche kommen die renoparenchymatöse Hypertonie, welche die häufigste sekundäre Form darstellt, die renovaskuläre Hypertonie und endokrine Hypertonieformen in Frage. Als Ursachen für die endokrinen Formen sind primärer Hyperaldosteronismus, Phäochromozytom, Cushing Syndrom, Hyperparathyreoidismus und Schilddrüsenerkrankungen bekannt. Bezüglich der Familienanamnese, und somit der genetischen Prädisposition zur arteriellen

Hypertonie, haben verschiedene Studien kontroverse Ergebnisse gezeigt (Williams & Fisher 1997), (Brand et al. 1998). Dabei werden unter anderen ein Zusammenhang mit dem epithelialen Natriumkanal wie beim Liddle's Syndrom oder mit dem Angiotensinogen-Gen, diskutiert. Des Weiteren wurde vorgeschlagen, dass ein Zusammenhang zwischen dem NaCl-Gehalt der Ernährung, der Dopaminurinausscheidung und der arteriellen Hypertonie besteht, welcher wiederum bei verschiedenen ethnischen Gruppierungen unterschiedlich ausgeprägt sein soll (Lee et al. 1990). Dabei entwickeln einige dieser prädisponierten Gruppierungen bei einer Kochsalzbeladung eine Hypertonie. Sie werden als „salz-sensitiv“ bezeichnet. Die niedrig-Renin Hypertonie, welche relativ häufig bei der schwarzen Bevölkerung in den USA und in der Karibik diagnostiziert wird, soll auf eine solche NaCl Empfindlichkeit zurückzuführen sein (Lee et al. 1990).

1.2 Behandlungsschema der Hypertonie

Das Ziel der Behandlung einer manifesten arteriellen Hypertonie ist eine Einstellung der Blutdruckwerte auf < 130 mmHg systolisch bzw. < 90 mmHg diastolisch. Dazu werden zusätzlich zu einer medikamentösen sowohl diätetische Maßnahmen als auch regelmäßige körperliche Bewegung empfohlen. Das derzeitige Behandlungsschema der Hochdruckliga sieht zunächst eine Monotherapie, dann bei Bedarf eine Zweierkombination, und schließlich die Verschreibung von drei Medikamenten vor. Bei der Monotherapie wird zunächst versucht, den Blutdruck entweder mit Betarezeptorenblockern (β -Blocker), Diuretika, Calciumkanalblockern (Calciumantagonisten), ACE-Hemmern oder den neueren AT_1 Rezeptorenblockern unter die genannten Werte einzustellen. Gegebenenfalls kann die Therapie um ein weiteres Medikament erweitert werden. Bei der ersten der beiden empfohlenen Kombinationen wird ein Diuretikum zusammen mit einem weiteren Diuretikum, einem Calciumantagonisten oder einem ACE-Hemmer verabreicht. Bei der zweiten Kombination wird ein Calciumantagonist mit einem β -Blocker, ACE-Hemmer oder AT_1 -Blocker gegeben. Bei der Dreierkombination schließlich wird ein Diuretikum zusammen mit einer Zweierkombination aus β -Blocker, Diuretikum, Calciumantagonist, ACE-Hemmer oder AT_1 -Blocker empfohlen. Nicht selten

allerdings sind, vor allem nach längerer Erkrankungszeit, mehr als drei Medikamente erforderlich, um eine ausreichende Druckeinstellung zu gewährleisten.

1.3 Die Niere

Die Niere ist von zentraler Bedeutung für die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolytstoffwechsels, des Säure-Basen-Haushalts, der intra- und extrazellulären Flüssigkeitsverteilung und damit auch für die Aufrechterhaltung des Blutdruckes bei unterschiedlichen physiologischen Bedingungen. Eine weitere Funktion ist die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Fremdstoffen, wie z.B. Arzneimittel. Außerdem werden die Hormone Erythropoietin, Calcitriol, Renin und auch Dopamin gebildet und freigesetzt. Diese wiederum haben mittelbaren oder unmittelbaren Einfluss auf die Feinregulation der Nierenfunktion und nachgeschaltete kardiovaskuläre Prozesse.

Die Niere des Menschen wiegt ungefähr 150 g und lässt sich makroskopisch in eine Mark- und eine Rindenzone einteilen. Die kleinste funktionelle Einheit ist das Nephron. Jedes der 1,2 Millionen Nephren einer Niere besteht aus dem Glomerulus und dem sich anschließenden Tubulusapparat (Abb. 1.1). Am vaskulären Pol der Nierenkörperchen treten die afferenten Arteriolen ein, die sich dann in die glomerulären Kapillarschlingen verzweigen. Diese vereinigen sich und treten am vaskulären Pol wieder aus und umschlingen als peritubuläres Gefäßnetz die Tubuli und die Sammelrohre. Somit besitzt die Niere zwei in Reihe geschaltete Kapillarsysteme.

Der renale Blutfluss beim adulten Menschen beträgt etwa 1-1,2 l/ min, d.h. 25 % des Herzminutenvolumens fließen durch die Niere. Somit werden bei einem gesunden Erwachsenen pro Tag etwa 180 l Blut filtriert. Das sind etwa 120 ml/ min oder 20 % des renalen Plasmaflusses, welche in den Glomeruli abgepresst werden. Diese Größe wird als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet und normalerweise in [ml/ (min \times 1,73 m² Körperoberfläche)] angegeben. Ähnlich wie in anderen

Kapillarsystemen wird die renale Durchblutung und damit die GFR über einen weiten Bereich des arteriellen Blutdrucks annähernd konstant gehalten.

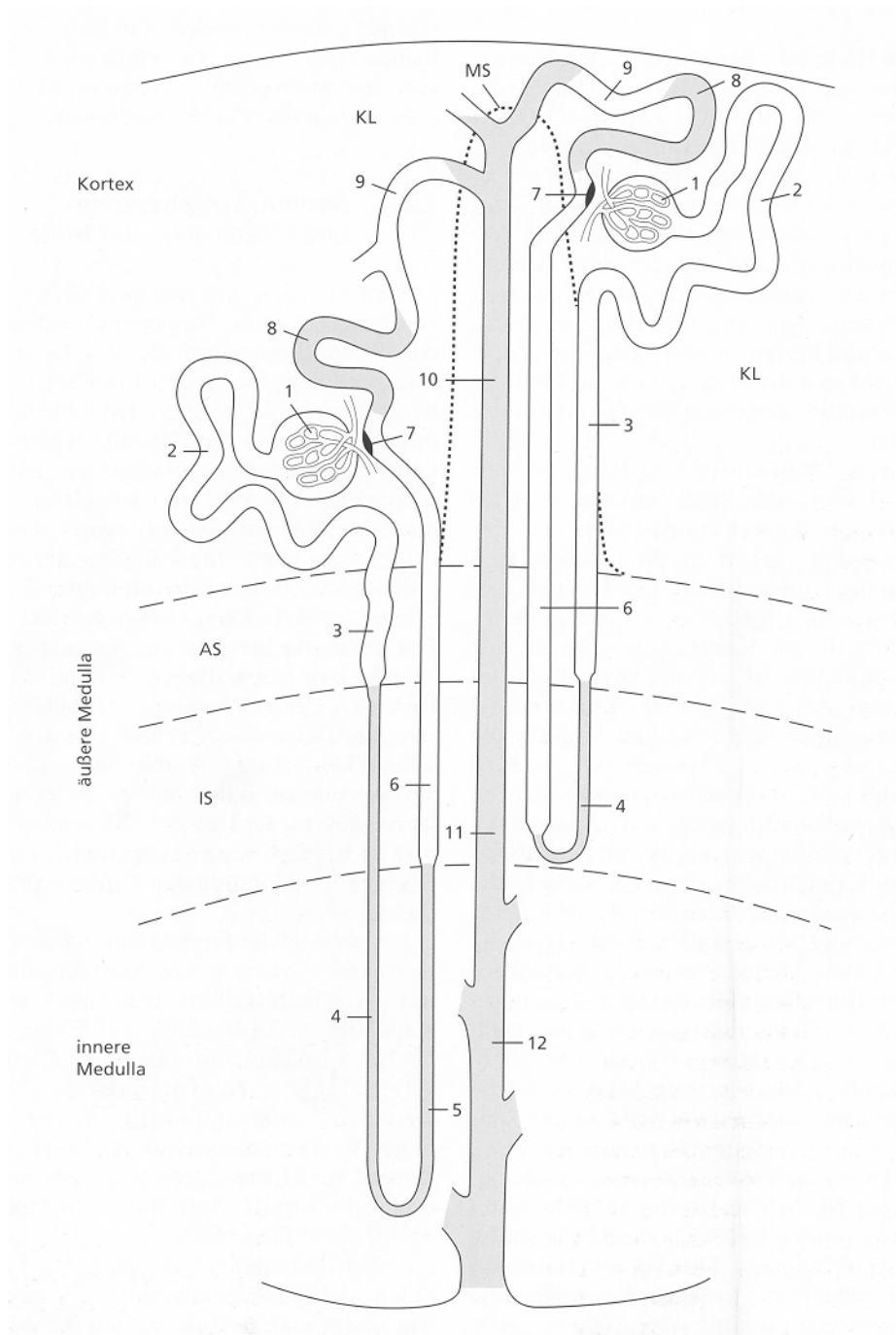


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Tubulus- und Sammelrohrsystems eines superfiziellen und eines tiefen, juxtamedullären Nephrons. 1 = Glomerulum innerhalb des Nierenkörperchens; 2 = proximales Konvolut; 3 = gerader proximaler Tubulus; 4 und 5 = Intermediärtubuli; 6 = dicker aufsteigender Teil der Henleschen Schleife; 7 = Macula densa; 8 = distaler Tubulus; 9 = Verbindungstubulus; 10, 11 und 12 = kortikales, äußeres medulläres und inneres medulläres Sammelrohr. KL = kortikales Labyrinth; MS = Markstrahlen; AS = äußerer Streifen; IS = innerer Streifen (modifiziert nach Kritz & Kaissling (2000)).

Zwischen 80 und 180 mmHg wird durch die Autoregulation der Niere die Durchblutung und damit die Filtrationsleistung über einen weiten Bereich aufrechterhalten. Diese Regulationsmechanismen sind weitgehend unabhängig von der Innervierung und zirkulierenden Hormonen und werden später genauer ausgeführt.

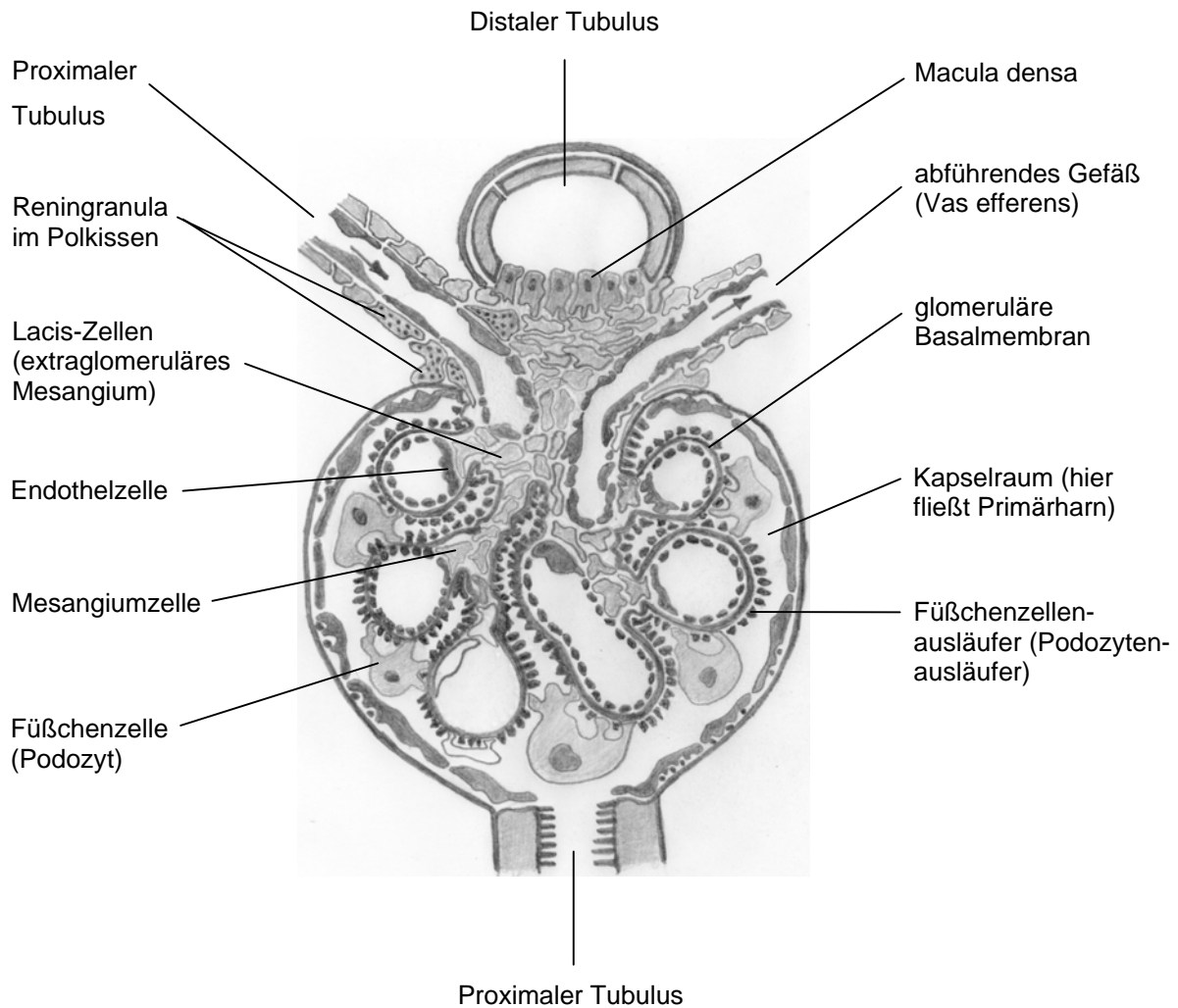


Abb. 1.2: Schematischer Aufbau eines Glomerulus (modifiziert nach Spornitz (1996)).

Als Filtrationsbarriere dient die Wand der glomerulären Kapillarschlingen. Diese werden durch das viszerale Blatt der Bowmanschen Kapsel, den Podozyten, zum Kapselraum hin bedeckt. Die Podozyten mit ihren Fußfortsätzen sitzen direkt auf der Basalmembran der Glomerulusschlingen, welche von einem gefensterten Endothel mit einer Porenweite von ungefähr 50 bis 100 nm ausgekleidet sind. Zwischen den Podozyten befindet sich eine Schlitzmembran mit einer Porenweite von ungefähr 5 nm. Durch dieses Filtersystem einerseits und durch die negative Wandladung der

glomerulären Barriere andererseits, werden große Makromoleküle zurückgehalten, während kleinere frei filtrierbar sind. Ferner werden aufgrund der negativen Ladung negativ geladene Moleküle weniger filtriert als positiv geladene.

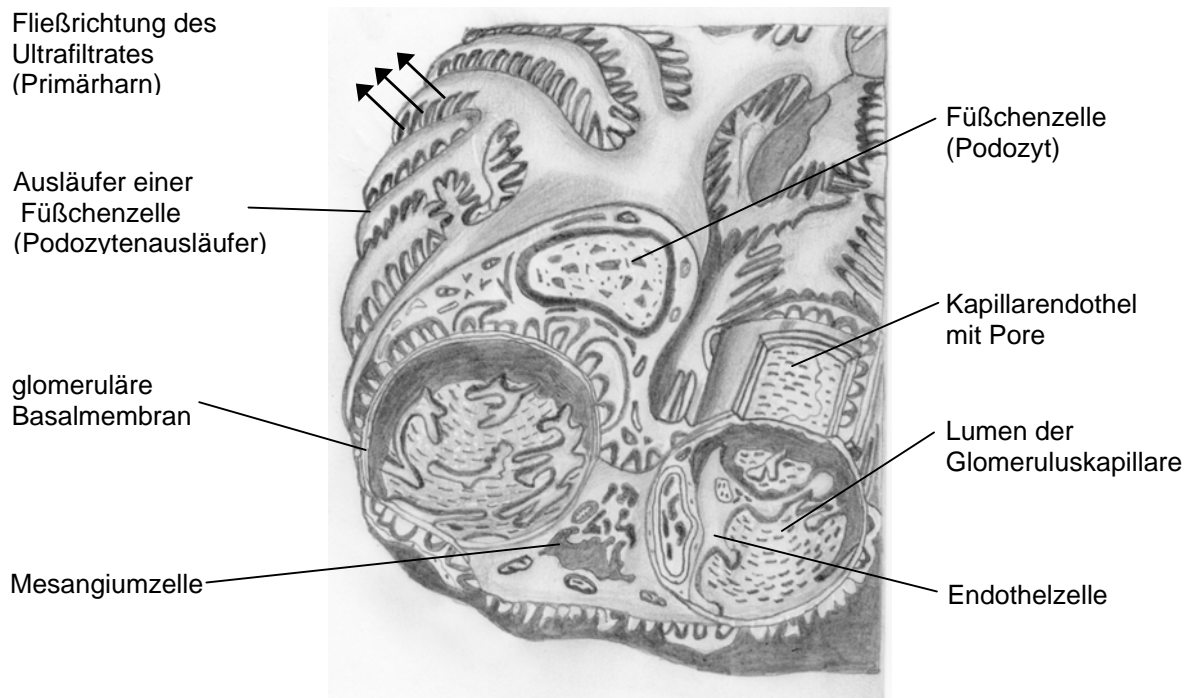


Abb. 1.3: Querschnitt durch zwei Kapillarschlingen des Glomerulus mit Darstellung des Nierenfilters. Der innerste Teil des Filters wird durch das mit Poren versehene Kapillarendothel gebildet, welches auf der Basalmembran aufliegt. Dieses wiederum steht in direktem Kontakt mit den Zellen des Mesangiums. Der äußerste Teil des Nierenfilters wird durch die miteinander verzahnten Ausläufer der Podozyten gebildet (modifiziert nach Spornitz (1996)).

Der filtrierte Primärharn gelangt in den proximalen Tubulus. Die Endothelzellen in diesem Segment weisen einen charakteristischen apikalen Bürstensaum, sowie laterale Membraneinfaltungen auf, welche große Mitochondrien enthalten. Durch diese Eigenschaften sind diese Zellen zu einer großen Transportleistung fähig. 55-60 % der in den Glomerula filtrierte Flüssigkeit wird in diesem Abschnitt reabsorbiert. Die treibende Kraft für diesen Transport ist die basolaterale $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, welche aktiv Natrium aus der Zelle ins umliegende Interstitium pumpt. Dem entstehenden Gradienten nachfolgend wird luminal 1 Natriumion im Austausch gegen 1 Proton

über den $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiport (NHE3) sekundär-aktiv in die Zelle transportiert. Das Proton assoziiert im Lumen mit Hilfe der Carboanhydrase mit HCO_3^- zur Kohlensäure, welche anschließend zu Wasser und CO_2 zerfällt und in Form dieser beiden Komponenten durch die apikale Membran diffundieren kann. Insgesamt werden in diesem Tubulussegment etwa 90 % des filtrierte Bicarbonats (HCO_3^-) sowie 65 % bzw. 55 % des filtrierte Natriums bzw. Chlorids reabsorbiert, während Glucose und Aminosäuren (im Kotransport mit Natrium) fast vollständig wieder aufgenommen werden. Zusätzlich werden hier Protonen sowie organische Anionen und Kationen ins Lumen sezerniert. In diesem Abschnitt findet auch die renale Dopaminproduktion aus L-Dopa statt, welches aus dem zirkulierenden Plasma stammt (Lee 1982).

Der proximale Tubulus geht in die Henlesche Schleife über. Diese besteht im wesentlichen aus 3 Abschnitten: Dem absteigenden, geraden Abschnitt, einem dünnwandigen Intermediärtubulus und dem dicken aufsteigenden Teil. Alle Fragmente zusammen bilden die Form einer Haarnadel. Charakteristisch für diesen Tubulusabschnitt ist der nahezu wasserundurchlässige aufsteigende Teil der Henleschen Schleife mit dem apikal lokalisierten $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter. Hier werden 25 bis 35 % des glomerulär filtrierte NaCl reabsorbiert. Dieser Vorgang ist die Voraussetzung für die Ausbildung des osmotischen Gradienten, welchem nun Wasser aus dem leicht permeablen absteigenden Abschnitt ins Interstitium nachfolgen kann. Durch dieses sogenannte Haarnadelgegenstromprinzip erfolgt eine Harnverdünnung bzw. -konzentrierung.

Im distalen Tubulus und im sich anschließenden Sammelrohr findet unter hormoneller Kontrolle die Feineinstellung der Nierenausscheidung statt. Voraussetzung dafür ist eine entsprechend niedrige Beladung dieses Abschnittes. Die in der basolateralen Membran dieses Segmentes lokalisierte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ weist die höchste Aktivität des gesamten Nephrons auf. Entsprechend hoch ist auch der Mitochondrienbesatz in diesem Teil. Der distale Tubulus reabsorbiert unter physiologischen Bedingungen etwa 5 bis 10 % des glomerulär filtrierte NaCl . Luminal folgt das Natrium zum größten Teil dem sich ausbildenden Gradienten über den Thiazid-hemmbareren $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransporter. Im spätdistalen Tubulus findet, genau wie im Sammelrohr, unter dem Einfluss des Mineralocorticoids Aldosteron die

Natrium-Reabsorption sowie die Kalium-Sekretion statt. Natrium gelangt dabei im wesentlichen über den Amilorid-hemmbareren epithelialen Na^+ -Kanal (ENaC) über die apikale Membran in die Zelle. Unter dem Einfluss des Antidiuretischen Hormons (ADH) erfolgt im Sammelrohr die Wasserrückresorption über Aquaporine. ADH bindet an basolaterale V_2 -Rezeptoren und aktiviert über die Adenylatcyclase die Verschmelzung von Vesikeln, welche das Aquaporin 2 enthalten, mit der luminalen Membran. Des Weiteren werden basolateral Aquaporin 3 bzw. 4 eingebaut. Durch diese transzelluläre Wasserreabsorption erfolgt die osmotische Äquilibration der Tubulusflüssigkeit mit dem kortikalen Interstitium.

1.3.1 Regulationsmechanismen der Niere

Bereits 1889 erkannte Golgi, dass der dicke aufsteigende Teil der Henleschen Schleife zum zugehörigen Glomerulum zurückführt und durch den Winkel am Gefäßpol verläuft, der von Vas afferens und Vas efferens gebildet wird. An der Kontaktstelle zwischen Tubulus- und Gefäßsystem sitzen die sogenannten Macula densa Zellen, die für die tubuloglomeruläre Rückkopplung von Bedeutung und Teil des juxtaglomerulären Apparates sind. Zu dieser Struktur gehören außerdem, die den Winkel zwischen der afferenten und efferenten Arteriole ausfüllenden extraglomerulären Mesangiumzellen und die reninbildenden Zellen in der Media der afferenten Arteriole.

Der Mechanismus des tubuloglomerulären Feedback (TGF) beschreibt eine vaskuläre Antwort auf ein tubuläres Ereignis. Über den durch Furosemid hemmbaren Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Kotransporter in der luminalen Membran der Macula densa wird die Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit gemessen. Die energieverbrauchende Na^+ - K^+ -ATPase, die Natrium auf der basolateralen Membran aus der Zelle ins Interstitium pumpt, verbraucht für diese Transportleistung ATP. Aus dem ATP-Stoffwechsel entsteht durch die $5'$ -Nucleotidase Adenosin, welches nun Adenosin A_1 Rezeptoren auf den extraglomerulären Mesangiumzellen stimuliert und dabei zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Die direkte Kopplung der extraglomerulären Mesangiumzellen mit den granulierten, reninhaltigen Zellen

und den glatten Muskelzellen der afferenten Arteriolen über gap junctions führt zu einer Hemmung der Reninfreisetzung und einer Vasokonstriktion der afferenten Arteriole.

1.3.1.1 RAAS

Das Enzym Renin wird aus juxtaglomerulären Zellen durch verschiedene Stimulationsmechanismen freigesetzt und spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Elektrolythaushaltes und des Blutdruckes. Die reninsezernierenden Zellen befinden sich nicht nur in der Niere, wo sie zuerst entdeckt wurden, sondern auch in einigen anderen Organen, wie dem Gehirn, Hirnanhangdrüse und Drüsen der Nebennierenrinde, in glatten Muskelzellen der Arterien und in den Hoden (Hackenthal et al. 1990). In der Niere befinden sich die Reninzellen in der Media der periglomerulären Arteriole (Taugner et al. 1979), wobei die Anzahl von der Spezies und vom pathologischen Zustand abhängig ist. Des Weiteren wurden Unterschiede im Zellgehalt der einzelnen Glomeruli beschrieben (Wurfer et al. 1988). Renin besteht aus 340 Aminosäuren (37-40 kDa) und wird als Präprorenin synthetisiert und in das inaktive Prorenin umgewandelt. Dieses wird durch Abspaltung von 43 Aminosäuren in das aktive Renin überführt und zusammen mit Prorenin in den Granula der reninsezernierenden Zellen gespeichert. Das Enzym Renin ist von Spezies zu Spezies verschieden. Es unterscheidet sich sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in der Struktur.

Renin als Aspartylprotease und Schlüsselenzym des RAAS beginnt die Kaskade, indem es von dem aus der Leber stammenden α_2 -Globulin Angiotensinogen, das Decapeptid Angiotensin I abspaltet. Das in den Endothelzellen der Lunge, den renalen Arteriolen und glomerulären Kapillaren (Taugner & Ganten 1982) befindliche Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) spaltet am C-terminalen Ende des Angiotensin I, Histidin und Leucin ab, wobei das Angiotensin II (AT II) entsteht. AT II selbst hat nun mehrere Funktionen: Angiotensin II ist, abgesehen vom Endothelin, der potenteste Vasokonstriktor im Organismus. Über AT_1 Rezeptoren an den Gefäßen wirkt es vorwiegend auf ein G_q oder G_{12} Protein, welches über den second

messenger IP_3 , Calcium aus dem sarkoplasmatischen Reticulum der glatten Muskelzellen freisetzt und somit eine Kontraktion dieser Gefäße auslöst. Außerdem stimuliert AT II den Nucleus tractus solitarii, der in der Medulla oblongata liegt und zum Kreislaufzentrum gehört. Hier kommt es einerseits zu einer zentral vermittelten Vasokonstriktion als auch zu einer Verstärkung der direkten Wirkung von AT II. Des Weiteren löst Angiotensin II den Durstmechanismus im Hypothalamus aus und spielt zusätzlich eine fördernde Rolle bei der Regulation des Kochsalz-Appetits. Auch in der Niere selbst wirkt AT II vasokonstriktorisch, wodurch die renale Durchblutung und die GFR beeinflusst werden. In der Nebennierenrinde stimuliert Angiotensin II die Sekretion von Aldosteron aus der Zona glomerulosa. Aldosteron wiederum fördert als Mineralocorticoid die Synthese und den Einbau von Natriumkanälen im spätdistalen Tubulus und im Sammelrohr und führt somit zu einer Na^+ - und nachfolgenden Wasserreabsorption. Dadurch wird der natrium- und wassersparende Effekt noch verstärkt.

1.3.1.2 Regulationsmechanismen der Reninfreisetzung

Die Reninfreisetzung unterliegt dem sogenannten Macula densa Mechanismus, sowie neuronalen, myogenen und endokrinen Regulationsprozessen. Die Macula densa wird von 10 bis 20 epithelialen, hochprismatischen Zellen gebildet, deren Struktur sich von den Endothelzellen des sie umgebenden dicken Astes der Henleschen Schleife unterscheiden. Eine Verbindung zwischen dieser und der Reninfreisetzung, aufgrund deren unmittelbaren Nähe zueinander, wurde zum ersten Mal von Goormaghtigh (1945) vermutet. In der luminalen Membran befindet sich der gleiche, durch Furosemid hemmbare, $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporter wie im wasserundurchlässigen dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife. Über diesen wird die tubuläre Konzentration dieser Ionen bestimmt (Lapointe et al. 1990). Dabei ist sowohl die Cl^- als auch die K^+ -Konzentration maßgeblich (Schnermann & Briggs 1982), (Vallon et al. 1997). Eine Steigerung der Elektrolytkonzentration im Tubulus führt zu einer Kontraktion des Vas afferens und damit zu einer Erniedrigung der GFR. Außerdem ist dies ein Signal zur Hemmung der Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen. Als Botenstoff für die Signaltransduktion werden Adenosin,

Prostaglandine und Stickstoffmonoxid (NO) diskutiert. Albinus et al. (1998) konnten zeigen, dass endogen freigesetztes Adenosin die Reninsekretion aus isolierten juxtaglomerulären Zellen hemmt. Adenosin stammt aus dem Energiestoffwechsel der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und vermittelt seine Wirkung über den Adenosin A_1 Rezeptor (Churchill & Churchill 1985). Prostaglandine werden in fast allen Zellen über die konstitutive Cyclooxygenase (COX) 1 gebildet. PGE_2 und Prostacyclin können die Reninsekretion aus isolierten Glomerula steigern (Beierwaltes et al. 1982). In in vivo Experimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch COX-Inhibitoren die Reninfreisetzung gehemmt wird (Freeman et al. 1982). Es wird vermutet, dass über die Macula densa, welche u.a. die Chloridionenkonzentration im spätdistalen Tubuluslumen detektiert, auf eine Erniedrigung der Konzentration, mit der Stimulation der Prostaglandinsynthese im extrazellulären Mesangium reagiert. Die Prostaglandine aktivieren ihrerseits die Adenylatcyclase und steigern die cAMP-Produktion, was wiederum die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen stimuliert (Lorenz et al. 1993b).

Stickstoffmonoxid (NO) wird ebenfalls als Mediator diskutiert. NO als EDRF (endothelium derived relaxing factor) erhöht intrazellulär die cGMP Konzentration und hemmt damit die Reninfreisetzung (Schrickler & Kurtz 1993), (Kurtz et al. 1988a). Allerdings zeigen andere Experimente, dass durch Nitroprussid-Natrium, aus welchem NO freigesetzt wird, die Reninsekretion gesteigert werden kann. Die Effekte von NO sind sehr komplex und noch nicht vollständig geklärt.

Kurtz et al. (1988b) konnten zeigen, dass sich auf den juxtaglomerulären Zellen Dopamin D_1 Rezeptoren befinden, über welche die Reninsekretion reguliert werden kann. 9 Jahre später konnten Yamaguchi et al. (1997) nachweisen, dass im Rattenmodell die Reninsekretion über den Dopamin D_{1A} Rezeptor stimuliert wird. Dabei wird über die Adenylatcyclase intrazellulär cAMP gebildet, welches wiederum die Reninsekretion aus juxtaglomerulären Zellen stimuliert. Auf mRNA Ebene konnten Sanada et al. (1997) den Dopamin D_3 und D_4 Rezeptor nachweisen, welche zur Unterfamilie der D_2 Rezeptoren gehören (siehe 1.5.3). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion durch einen selektiven Dopamin D_3 Rezeptor Agonisten blockiert werden konnte. Weitere Autoren fanden, dass die dopaminerge Stimulation der Reninsekretion nicht durch Blockade der

zellständigen β_1 Rezeptoren beeinträchtigt werden kann (Kurtz et al. 1988b), (Antonipillai et al. 1989) und folgerten, dass die Effekte ausschließlich über die D_1 Rezeptoren vermittelt werden. Henry et al. (1977) allerdings konnten die Effekte von Dopamin mit Hilfe von Propranolol vollständig hemmen, so dass die dopaminerge Spezifität der geschilderten Beobachtungen gewissen Zweifeln unterliegt.

Über sympathische Neuronen wird die Reninsekretion dagegen ganz unbestritten moduliert. Dadurch lässt sich auch die relativ hohe Dichte an sympathischen Nervenendigungen an den juxtaglomerulären Zellen im Bereich des glomerulären Gefäßpols erklären. Über β_1 -adrenerge Rezeptoren vermittelt, aktiviert Noradrenalin die Adenylatcyclase. Intrazellulär gebildetes cAMP stimuliert dann die Reninfreisetzung (Hackenthal et al. 1990). Durch die Stimulation von efferenten Nerven der Niere konnte eine Steigerung der Reninausschüttung gezeigt werden (Kopp & DiBona 1984), wohingegen bei denervierten Tieren ein Abfall der basalen Reninsekretion zu beobachten war. Damit ist das sympathische Nervensystem ein wichtiger extrarenaler Kontrollfaktor für die Reninfreisetzung.

Die Hypothese der myogenen Regulation, auch als „Barorezeptor-Kontrolle“ bezeichnet, beruht auf der Theorie, dass es Druckrezeptoren gibt, welche Einfluss auf die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen haben (Blaine et al. 1984). Diese reagieren auf die Wandspannung in den afferenten Arteriolen. Die Reninfreisetzung verhält sich umgekehrt proportional zum renalen Filtrationsdruck. Das Signal wird dabei über sogenannte „stretch-Kanäle“ (Fray et al. 1986) vermittelt, die entweder direkt, oder durch Depolarisation der Zellmembran den Calciumeinstrom über spannungsabhängige Calciumkanäle steuern. Anders als bei anderen sekretorischen Zellen, in denen durch den Calciumeinstrom die Verschmelzung der intrazellulären Vesikel mit der Zellmembran und dabei die Ausschüttung des Transmitters erfolgt, wird durch den intrazellulären Calciumanstieg in den juxtaglomerulären Zellen, die Reninsekretion gehemmt. Dieses Phänomen wird als „Calciumparadoxon“ bezeichnet (Hackenthal & Taugner 1986), (Churchill 1987).

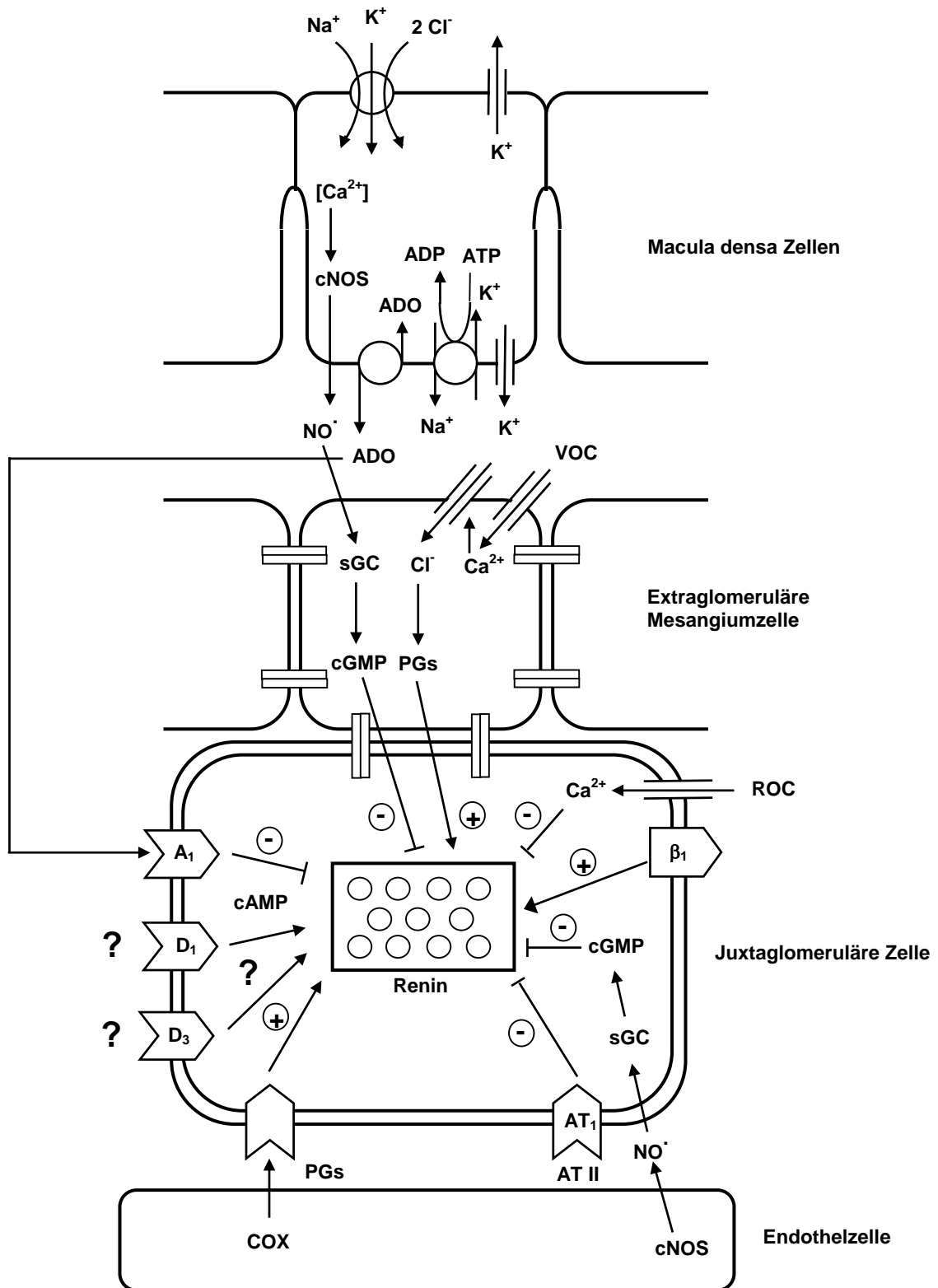


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der möglichen zellulären Regulationsmechanismen der Reninsekretion. cNOS = konstitutive NO-Synthase, ADO = Adenosin, sGC = lösliche Guanylatcyclase, VOC = voltage operated channel, ROC = receptor operated channel, COX = Cyclooxygenase, PGs = Prostaglandine, DA = Dopamin (modifiziert nach Lorenz et al. (1993a)).

1.4 Altersabhängige renale Veränderungen

Der Alterungsprozess bringt eine Reihe von funktionellen und strukturellen Veränderungen des Organismus mit sich. Neben dem kardiovaskulären und respiratorischen System finden sich derartige Vorgänge auch in der Niere. Bereits ab dem 30. Lebensjahr nimmt die Nierengröße und damit das Gesamtnierengewebe ab. Dabei ist hauptsächlich der renale Rindenbereich betroffen (Nakano et al. 1985). Auf funktioneller Ebene kommt es zu einer Verminderung des renalen Blutflusses (RBF), der glomerulären Filtrationsrate und sowohl der Natriumsekretions- als auch Natriumretentionsleistung (Epstein 1985). Durch diese Veränderungen steigt bei älteren Menschen die Gefahr eines hypo- oder hypernatriämischen Zustandes. Dabei scheint die Gesamtzahl der Glomeruli abzunehmen, während die noch verbleibenden hypertrophieren (Goyal 1982). Zusätzlich konnte eine Atrophie im Bereich der efferenten und afferenten Arteriolen des Nierencortex festgestellt werden. Bei Mäusen lässt sich mit zunehmendem Lebensalter eine Vergrößerung des gesamten Nierengewebes beobachten, womit vermutlich die verminderten Leistungen kompensiert werden sollen (Hackbarth & Harrison 1982). Sogar eine Degeneration der Bürstensaummembran in den proximalen Tubuluszellen und einiger der darin befindlichen Proteine wurde beschrieben (Nakano et al. 1985). Des Weiteren konnte eine Abnahme der Anzahl der Mitochondrien bei älteren Ratten im Vergleich zu jüngeren festgestellt werden.

Alterungsprozesse machen sich auf funktioneller Ebene durch Veränderungen im Bereich der renalen Hämodynamik und der tubulären Funktion der Niere bemerkbar. Dabei wurde sowohl ein Abfall des renalen Blutflusses (RBF) (Fliser et al. 1993) als auch der GFR (Fliser et al. 1997) mit zunehmendem Alter beschrieben. Die GFR wird häufig über die Kreatinin-Clearance bestimmt. Anhand dieser wird die Dosierung einer Reihe von Arzneistoffen, welche renal eliminiert werden, festgelegt. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Kreatinin-Clearance mit zunehmendem Alter stark abnimmt (Fliser et al. 1999). Dadurch ist bei älteren Patienten eine Dosisanpassung von Arzneistoffen, die vorwiegend renal eliminiert werden, unabdingbar.

Der Blutdruck und die Nierenfunktion hängen unmittelbar zusammen (Fliser & Ritz 1998) und das Alter als solches ist ein wesentlicher Faktor, der sich, mit anderen zusammen, ungünstig auf die Entwicklung einer Hypertonie auswirken kann. Umgekehrt kann auch ein dauerhaft erhöhter Blutdruck die Niere nachhaltig schädigen, was eine engmaschige Blutdruckkontrolle bei älteren Menschen, insbesondere bei entsprechenden zusätzlichen Erkrankungen, sinnvoll erscheinen lässt.

Auch das dopaminerge System unterliegt dem Alterungsprozess. Es konnte gezeigt werden, dass die Dopaminurinausscheidung bei Wistar Ratten im Alter abnimmt, wohingegen die Dopadecarboxylaseaktivität im Nierencortex dieser Tiere erhöht war (Armando et al. 1995). Bei Fischer Ratten war sowohl die Aktivität der Dopadecarboxylase, als auch der Dopamingehalt in der intestinalen Mucosa bei älteren Tieren erhöht (Vieira-Coelho et al. 1999). Auch die Dopaminrezeptordichte soll mit dem Alter abnehmen. Galbusera et al. (1988) und Ricci (1990) schlugen vor, dass die Dichte sowohl der peripheren als auch die zentralen Dopamin D_1 bzw. peripheren DA_1 Rezeptoren mit dem Alter in vergleichbarem Ausmaß abnimmt. Dabei war in der Niere die altersbedingte Abnahme im tubulären System stärker ausgeprägt als in den renalen Arteriolen.

Dem Rezeptorverlust im Alter folgend konnte in Tierversuchen festgestellt werden, dass die dopaminerge Hemmung der im proximalen Tubulus vorhandenen Na^+K^+ -ATPase ebenfalls im Alter nachlässt (Kansra et al. 1997). Außerdem wurde eine Salzabhängigkeit dieser Hemmung beschrieben (Vieira-Coelho et al. 1999). Auch das RAAS scheint einem Alterungsprozess zu unterliegen. Capponi & Vallotton (1976) konnten zeigen, dass die Reninsekretion aus Nierenschnitten bei jüngeren Ratten höher war als bei den älteren.

1.5 Dopamin und seine Rezeptoren

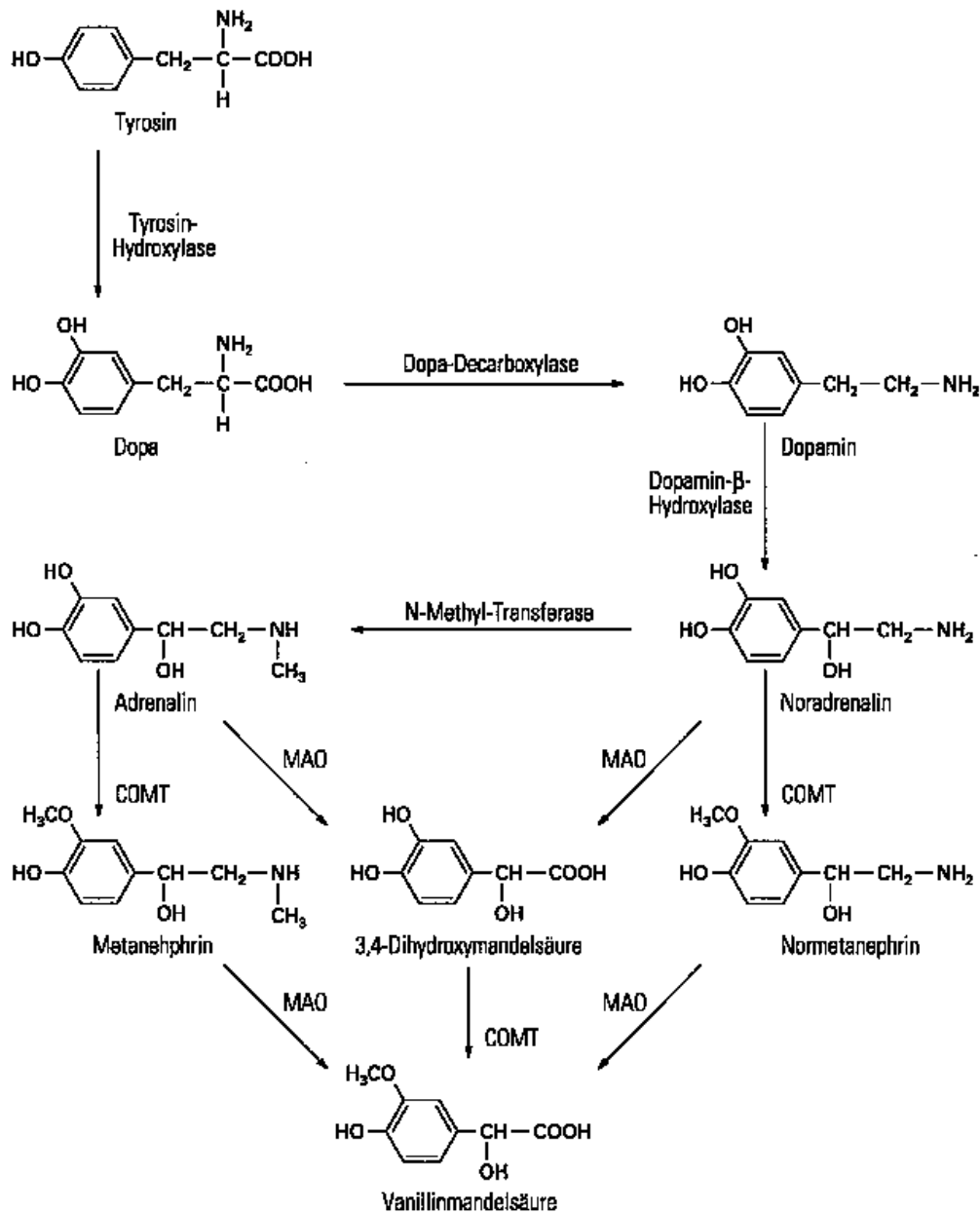
1.5.1 Dopamin – Entdeckung, Biosynthese und Elimination

1910 berichteten Mannich und Jacobson, sowie Barger und Ewins erstmals über die Synthese von 3,4-Dihydroxyphenylethylamin. Dopamin wurde lange Zeit nur als Vorstufe von Adrenalin und Noradrenalin betrachtet. Dabei stammen die Katecholamine alle aus einer gemeinsamen Biosynthese, ausgehend von der Aminosäure Tyrosin bzw. vom essentiellen Phenylalanin. Durch die Phenylalaninhydroxylase wird aus Phenylalanin Tyrosin gebildet. Daraus entsteht durch die Tyrosinhydroxylase, L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), welches im nächsten Schritt durch die Dopadecarboxylase in Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylethylamin) umgewandelt wird. Mit Hilfe der Monooxygenase (=Dopamin- β -Hydroxylase) wird aus Dopamin Noradrenalin gebildet. Schließlich entsteht durch N-Methylierung mit Hilfe der Phenylethanolamin-N-methyltransferase Adrenalin.

Dopamin wird zentral in adrenergen und dopaminergen Neuronen, sowie im Nebennierenmark gebildet. Zusammen mit den beiden anderen Katecholaminen wird es in spezifischen Granula gespeichert und bei Bedarf infolge einer Depolarisation der neuronalen Membran in den synaptischen Spalt ausgeschüttet.

Die Inaktivierung der Transmitter erfolgt einerseits über die Wiederaufnahme in die präsynaptischen Neuronen und andererseits durch die Oxidation bzw. Methylierung zu biologisch inaktiven Produkten. Der Abbau der Katecholamine kann über zwei Wege erfolgen. Mit Hilfe der Monoaminoxidase (MAO) wird Dopamin zunächst in die 3,4-Dihydroxymandelsäure umwandelt. Mit Hilfe der Katechol-O-Methyltransferase (COMT) entsteht aus dieser Verbindung die 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure (Vanilinmandelsäure). Der Metabolismus kann alternativ zuerst über die COMT und im Anschluss daran über die MAO verlaufen. Beide Wege enden bei der Vanilinmandelsäure, welche mit dem Harn ausgeschieden wird (Thews et al. 1999)

In der Peripherie wird Dopamin u.a. in der Niere produziert und mit dem Urin ausgeschieden (Ball et al. 1978), (Baines et al. 1979), (Akpaffiong et al. 1980), (Stephenson et al. 1982). Renales Dopamin wird in proximalen Tubuluszellen synthetisiert und freigesetzt (Hayashi et al. 1990). Zur Synthese wird L-DOPA benötigt, da die hierfür notwendige Tyrosinhydroxylase in den Tubuluszellen nicht vorkommt (Mühlbauer et al. 1997).



**Katecholamine:
Biosynthese und Abbau von Katecholaminen**

[81]

Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Biosynthese und des Metabolismus der Katecholamine (Hunnius, 8. Auflage, 1998).

L-DOPA stammt aus dem zirkulierenden Blutkreislauf, wird glomerulär filtriert und aus dem Lumen über apikale Natrium-abhängige Transporter in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen (Lee 1982), (Soares-da-Silva et al. 1994). Die in den Zellen vorhandene L-Dopadecarboxylase stellt aus der Aminosäure Dopamin her (Rahman et al. 1981), (Hayashi et al. 1990). Die Speicherung in und die Freisetzung aus den Tubuluszellen ist noch weitgehend ungeklärt.

1.5.2 Dopamin und seine Funktionen

Die Rolle von Dopamin als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem ist seit längerem bekannt. Bereits 1972 erkannte Goldberg, dass spezifische Dopamin Rezeptoren sowohl im ZNS als auch in der Peripherie, an Herz und Niere, vorkommen. Die Bedeutung des zentral gebildeten und freigesetzten Dopamins wurde schon bald in Zusammenhang mit Morbus Parkinson und der Schizophrenie gebracht. Beim Morbus Parkinson kommt es infolge der Degeneration von melaninhaltigen Zellen in der sogenannten Pars compacta der Substantia nigra, durch die abnehmende Dopaminproduktion zu den bekannten Ausfallserscheinungen (Thews et al. 1999). Diese Befunde werden durch eine erfolgreiche Behandlung der Symptome mit der Dopamin-Vorstufe L-Dopa gestützt. Allerdings kann wiederum die Applikation von relativ unselektiven Dopamin Rezeptor Antagonisten, wie z.B. Metoclopramid, reversible parkinsonoide Erscheinungen hervorrufen. Bei der Schizophrenie wird eine übernormale dopaminerge Aktivität im mesolimbischen System angenommen. Dopamin Rezeptorantagonisten, welche die dopaminergen Rezeptoren im synaptischen Spalt der entsprechenden Neurone blockieren, können die Symptomatik der Patienten erheblich verbessern. Ferner ist Dopamin an der Steuerung von Emotionen, Entstehung von Suchtverhalten und an kognitiven Leistungen sowie an der Hormonsynthese und deren Freisetzung beteiligt. Des Weiteren werden dem Dopamin Einflüsse auf das Brechzentrum und die Körpertemperatur zugeschrieben (Missale et al. 1998).

Die periphere Wirkung von Dopamin am Herzen zeigt sich an einer Steigerung der Kontraktionsfähigkeit des Myokards und einer Mehrdurchblutung der Mesenterialgefäße. Deshalb kann die positiv inotrope Wirkung bei der Behandlung von akutem Herzversagen genutzt werden.

In der Peripherie erhöht Dopamin den renalen Plasmafluss, erniedrigt den renalen Widerstand und verstärkt damit die Natriurese und Diurese (Doggrell 2002). Bis heute ist allerdings nicht ganz geklärt, welcher Anteil an diesen Effekten den beschriebenen systemischen zukommt. Im Glauben an eine renal-vaskuläre Wirkung wurde Dopamin auch lange in der nephrologischen Intensivmedizin angewendet (Goldberg 1972). In der sogenannten „Nierendosis“ von 1-3 µg/ (kg x min) soll es zu einer Steigerung der GFR und des RBF führen (Olsen et al. 1990), (Greven & Klein 1977), was den Verlauf des akuten Nierenversagens nach Kreislaufschock oder starkem Blutverlust verbessern sollte. Die peripheren Dopaminspiegel können durch die Verabreichung von L-DOPA tatsächlich erhöht werden (Doggrell 2002). Der therapeutische Nutzen ist inzwischen jedoch widerlegt, weshalb die Anwendung von Dopamin in der Intensivmedizin als Nierentherapeutikum schon seit Jahren als sehr fragwürdig angesehen wird (Mühlbauer 1996). Immerhin besteht der Verdacht, dass Dopamin durch Hypoxie-Erzeugung, z.B. im intestinalen Gewebe, sogar schädigende Wirkungen entfalten könnte. Neuere kontrollierte klinische Studien zeigen, dass der Nutzen von „low-dose“ Dopamin bezüglich der Erhaltung oder Verbesserung der Hämodynamik sehr gering ist und lediglich die Urinausscheidung fördert (Pereira et al. 2004), (Friedrich et al. 2005).

1.5.3 Dopaminrezeptoren

Die Dopaminrezeptoren weisen 7 transmembranäre Abschnitte auf. Aufgrund dieser Struktur werden sie den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zugeteilt und in zwei Unterfamilien gegliedert. Die D₁ Subfamilie beinhaltet den Dopamin D₁ und den D₅ Rezeptor, welche bei den Nagern auch als D_{1A} und D_{1B} Rezeptor bezeichnet werden (Missale et al. 1998). Sie sind mit einem G_s Protein gekoppelt und stimulieren somit die Adenylatcyclase, welche cAMP als second messenger produziert. Die D₂

Unterfamilie wird in die D₂, die D₃ und die D₄ Rezeptoren aufgeteilt, welche mit einem G_i Protein gekoppelt sind und damit die Adenylatcyclase hemmen. Allerdings ist zur Signaltransduktion der D₂-Subfamilie die Datenlage sehr heterogen. Die Rezeptoren der D₂-Subfamilie koppeln sowohl mit einem G_i Protein als auch mit K⁺ Kanälen (Aktories et al. 2005). Es wurde auch eine weitere Variante des D₂ Rezeptors beschrieben, welche über Diacylglycerol die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht (Todd et al. 1992). Auch die Kopplung des D₃ Rezeptors wird kontrovers diskutiert. Anfangs wurde berichtet, dass dieser Rezeptor die Adenylatcyclase nicht inhibiert (Sokoloff et al. 1990). Später konnte allerdings gezeigt werden, dass die Stimulation des D₃ Rezeptors zu einer schwachen Hemmung der Adenylatcyclase führt.

Es wird auch zwischen zentralen und peripheren Dopaminrezeptoren unterschieden. Die peripheren DA₁ Rezeptoren entsprechen weitgehend den zentralen D₁ und die peripheren DA₂, den zentralen D₂ Rezeptoren. Der Einfachheit halber wird in dieser Arbeit die unterschiedliche Bezeichnung nicht weiter berücksichtigt. Die Rezeptoren der D₁ Unterfamilie befinden sich zentral auf den postsynaptischen Membranen, während die D₂ Rezeptoren sowohl post- als auch präsynaptisch exprimiert werden, und somit auch für „negative Rückkopplungsmechanismen“ zuständig sein können (Missale et al. 1998). Insbesondere der D₃ Rezeptor wurde sowohl auf prä- als auch postsynaptischen Membranen gefunden (Kim et al. 2005).

Von den Dopaminrezeptoren existieren verschiedene Transkriptionsvarianten, die durch alternatives Spleißen der heteronukleären mRNA zu verschiedenen Isoformen synthetisiert werden (Giros et al. 1989), (Giros et al. 1991), (Fishburn et al. 1993), (Castro & Strange 1993). Man vermutet, dass über diese Varianten einerseits verschiedene Effektormechanismen hervorgerufen, und andererseits die Anzahl der Rezeptoren reguliert werden können (Kilpatrick et al., 1999).

In der Zwischenzeit konnten alle 5 bekannten Dopaminrezeptoren in der Niere nachgewiesen werden (Jose et al. 1992), (O'Connell et al. 1998), (Ricci et al. 2002), (Sun et al. 1998), (Felder et al. 2000), (Amenta 1997), (Matsumoto et al. 1995). Der Dopamin D₁ Rezeptor soll, wie oben beschrieben, an der Regulation der Reninfreisetzung aus juxtaglomerulären Zellen beteiligt sein (Kurtz et al. 1988b),

(Yamaguchi et al. 1997). Ferner wird er in ursächlichem Zusammenhang mit der Entstehung der Hypertonie (Felder et al. 2000) und, gemeinsam mit dem Dopamin D₂ Rezeptor, mit der Regulation der Elektrolytausscheidung diskutiert (Bertorello & Aperia 1990), (Eklof 1997), (Jose et al. 1998). Der Dopamin D₂ Rezeptor wird in den beiden Isoformen D_{2S} und D_{2L} exprimiert, welche nur marginale pharmakologische Unterschiede aufweisen (Castro & Strange 1993), (Malmberg et al. 1993). Bisher wurde in der Niere allerdings nur der D_{2L} identifiziert. Dieser ist an der Hyperfiltration im Frühstadium des Diabetes mellitus beteiligt (Luippold et al. 2001a). Ferner konnte bei einem D₂ Rezeptor Knockout-Modell die Entstehung einer Natrium-abhängigen Hypertonie (Ueda et al. 2003) beobachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Dopamin D₂ Rezeptor und der Na⁺-K⁺-ATPase und der damit verbundenen tubulären Elektrolytausscheidung wurde ebenfalls gefunden (Hussain et al. 1997). Der Dopamin D₃ Rezeptor konnte auf m-RNA Ebene in den juxtaglomerulären Zellen nachgewiesen werden (Sanada et al. 1997). Außerdem konnte auf funktioneller Ebene gezeigt werden, dass eine Stimulation des Dopamin D₃ Rezeptors zu einer Steigerung der GFR, verbunden mit einer Steigerung der Natriurese und Diurese bei Ratten führt (Luippold et al. 1998). Schließlich gibt es noch weitere Hinweise, dass die D₃ Rezeptoren an der Blutdruckregulation beteiligt sind (Luippold et al. 2001b) und ein D₃ Rezeptor Knockout für die Entstehung eines reninabhängigen Hypertonus verantwortlich ist (Asico et al. 1998), sowie eine Hyperaktivität bei den entsprechenden Tieren hervorruft (Accili et al. 1996). Allerdings wird dieser Befund kontrovers diskutiert (Boulay et al. 1999). Der Dopamin D₄ Rezeptor konnte in kortikalen Sammelrohren nachgewiesen werden (Sun et al. 1998), wo er an der Regulation der Wasserreabsorption (Li & Schafer 1998) und am Natriumtransport (Sun & Schafer 1996) beteiligt sein soll. Außerdem konnte er im proximalen und distalen Tubulus sowie im Bereich der glomerulären afferenten und efferenten Arteriolen nachgewiesen werden (Ricci et al. 2002). Ein Einfluss der D₄ Rezeptor auf die Reninsekretion wurde ebenfalls beschrieben (Jose et al. 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Dopamin D₅ Rezeptor Knockout-Mäuse einen erhöhten sympathischen Grundtonus aufweisen, welcher mit einem erhöhten Blutdruck einhergeht (Hollon et al. 2002).

Aufgrund der kontroversen Datenlage sind die Rezeptoren der Dopamin D₂-Unterfamilie besonders interessant. Der D₃ Rezeptor stellt wegen seiner Funktionen

und seiner Lokalisation in der Niere und seiner möglichen Beteiligung an der Regulation der systemischen Hämodynamik ein potentielles Target für blutdrucksenkende Pharmaka dar.

1.6. Der Dopamin D₃ Rezeptor

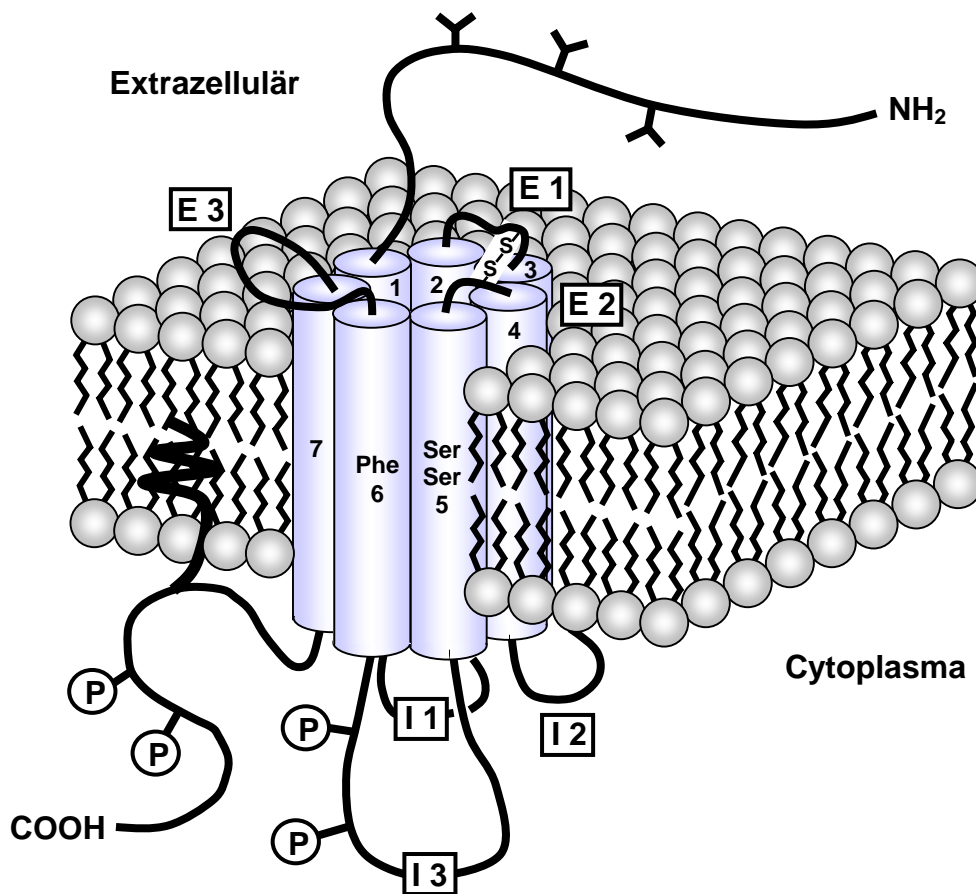


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Dopamin D₃ Rezeptors. Bei den Rezeptoren der D₂ Unterfamilie ist das COOH- Ende etwas kürzer, wohingegen die 3. Intrazelluläre Schleife (I 3) länger ist als bei Vertretern der D₁ Familie. Mögliche Phosphorylierungsstellen (P), mögliche Glykosylierungsstellen Y, I 1 – I 3 – intrazelluläre Schleifen, E 1 – E 3 – extrazelluläre Schleifen (modifiziert nach Missale et al., 1998).

1.6.1 Renale Dopamin D₃ Rezeptorfunktionen

Der Dopamin D₃ Rezeptor wurde durch Klonierungsexperimente von Sokoloff et al. (1990) entdeckt. O'Connell et al. (1998) konnten ihn schließlich immunhistochemisch in der Niere nachweisen. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte der D₃ Rezeptor im renalen Cortex, im proximalen Konvolut, in der Nähe des glomerulären Gefäßpols lokalisiert werden (Nürnberg et al. 2004). Dabei findet sich die höchste Rezeptordichte unterhalb des Bürstensaumes der subapikalen Membran.

1.6.1.1 Dopamin Rezeptoren und arterielle Hypertonie

Es wurde bereits von verschiedenen Autoren ein Zusammenhang zwischen dem renalen Dopamin D₃ Rezeptor und dem Alter, der arteriellen Hypertonie und Diabetes beschrieben (Asico et al. 1998), (Luippold et al. 2001b), (Jose et al. 2002), (Pech 2003), (Tappe 2003), (Weber 2004). Bei diesen Prozessen kommt es, wie bereits beschrieben, zu strukturellen Veränderungen und sogar zum Untergang des renalen Gewebes, welche das Ergebnis oder die Ursache dieser Prozesse darstellen. Einige Dopaminrezeptorgene konnten in DNA-Abschnitten lokalisiert werden, welche in Verbindung mit der Entstehung einer Hypertonie bei Menschen und Nagern gebracht werden (Jose et al. 2003). In diesem Zusammenhang wurde auch berichtet, dass die autokrinen/ parakrinen Funktionen von Dopamin, welche hauptsächlich an tubulären Abschnitten nachgewiesen wurden, am ehesten bei extrazellulärer Volumenexpansion beobachtet werden können (Felder et al. 2000).

Sowohl bei der essenziellen Hypertonie beim Menschen als auch in einigen Tiermodellen konnte ein direkter Zusammenhang mit der renalen Dopaminproduktion gefunden werden (Hussain & Lokhandwala 1998). Es wurde vermutet, dass Defekte an den Rezeptoren der D₁ Unterfamilie bzw. ein Fehler bei der Kopplung mit der intrazellulären Signalkaskade in den proximalen Tubuluszellen zu einer verminderten Natriumausscheidung führt, welche sich wiederum in einer primären Hypertonie manifestiert. Bei salzsensitiven Dahl Ratten wurde eine verminderte Fähigkeit zur Dopaminproduktion (Jose et al. 1993) und ein Kopplungsdefekt des Dopamin D₁

Rezeptors mit der Adenylatcyclase berichtet (Nishi et al. 1993). Dadurch unterbleibt bei diesen Tieren die Hemmung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, was zu einer unkontrollierten Natriumreabsorption führt. Der erhöhte Blutdruck der spontan hypertensiven Ratten (SHR) wird hingegen lediglich auf einen D_1 Rezeptor-second-messenger-Kopplungsdefekt zurückgeführt (Kinoshita et al. 1989).

1.6.1.2 Dopamin Rezeptoren und Elektrolythaushalt

Natrium ist das wichtigste Kation des Extrazellulärtraumes. Es wird zum größten Teil über die Nahrung und Flüssigkeit aufgenommen, im Ileum resorbiert und zu 95 % über die Niere ausgeschieden. Die Regulation der Ausscheidungsmechanismen wurde bereits dargestellt (siehe 1.3.2).

Die natriuretische Wirkung von Dopamin wird schon längere Zeit diskutiert (Lee 1982). Der Hauptsynthesort von Dopamin in der Niere befindet sich in den proximalen Tubuluszellen. Über die Dopamin D_1 Rezeptorfamilie wird die Elektrolyt- und damit die Flüssigkeitsrückresorption gehemmt (Eklof 1997). Mögliche Mechanismen der Natriurese sind die Hemmung des $\text{Na}^+\text{-H}^+\text{-Antiports}$ an der luminalen Seite (Felder et al. 1990), wobei der Dopamin D_1 Rezeptor eine entscheidende Rolle spielt und der D_2 Rezeptor von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint (Wiederkehr et al. 2001). Ein weiterer Mechanismus ist die bereits erwähnte Blockade der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ auf der basolateralen Seite des proximalen Tubulus. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob eine Kostimulation von Rezeptoren der Dopamin D_1 - und D_2 Rezeptor Unterfamilie notwendig ist, um die ATPase zu hemmen (Bertorello & Aperia 1990) und damit eine stärkere Diurese und Natriurese verursacht wird, als durch die Stimulation der D_1 Rezeptoren alleine (Jose et al. 1998). Außerdem sei es abhängig vom Ausmaß der Natriumbeladung, ob D_1 und D_2 Rezeptoren in diesem Zusammenhang synergistische oder gegensätzliche Effekte verursachen. Des Weiteren wurde berichtet, dass die D_2 Effekte über den Dopamin D_3 Rezeptor vermittelt werden und unter Natriumentzug zum Tragen kommen (Felder et al. 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Dopamin die durch Angiotensin II vermittelte Aldosteronsynthese (Whitfield et al. 1980), (Missale

et al. 1989) und die Ausschüttung des antidiuretischen Hormons aus der Hypophyse hemmt (Reid et al. 1986). Des Weiteren scheint der atriale natriuretische Faktor ein funktionierendes dopaminerges System für seine Wirkung zu benötigen (Hansell et al. 1987).

2. EIGENE FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitere Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem Dopamin D₃ Rezeptor und dem Elektrolythaushalt sowie dessen möglichen Einfluss bei der Entstehung der arteriellen Hypertonie. Ferner sollte geprüft werden ob der Dopamin D₃ Rezeptor als potentielles Target für blutdrucksenkende Wirkstoffe in Frage kommt. Dazu wurden zunächst funktionelle Untersuchungen bei wachen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Es wurden 3 und 11 Monate alte Mäuse nach dem jeweils selben Protokoll untersucht. Die Tiere wurden während der Experimente auf unterschiedlichen NaCl-Diäten gehalten, um bei den untersuchten Parametern sowohl den Einfluss von Kochsalz als auch Alterseffekte beobachten zu können.

Dazu wurde zunächst der Blutdruck der Mäuse mit Hilfe der Schwanzdruckplethysmographie bestimmt. Im Anschluss daran folgten Stoffwechselläufigexperimente, in deren Verlauf verschiedene renale Parameter unter einer chronischen NaCl-Beladung beobachtet wurden. In diesem Zusammenhang wurde die GFR und das dopaminerge System der Tiere, mit Dopaminurinausscheidung, Plasmakonzentration und dem Dopamingehalt im Nierengewebe bestimmt. Anschließend wurden morphologische Untersuchungen durchgeführt und schließlich der Zusammenhang zwischen dem Dopamin D₃ Rezeptor und dem RAAS, insbesondere dem Angiotensin (AT₁) Rezeptor untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, welche Effekte Dopamin an isolierten, superfundierten juxtaglomerulären Zellen verursacht. Dabei sollte insbesondere die Funktion des Dopamin D₃ Rezeptors, im Hinblick auf eine Beteiligung an der Regulation der Reninfreisetzung und damit des Elektrolythaushaltes und des Blutdruckes, geklärt werden. Dazu wurden aus Rattennieren reninsezernierende Zellen isoliert und mit verschiedenen rezeptoraktiven Substanzen superfundiert. In den Experimenten wurden zunächst der physiologische Ligand Dopamin und anschließend verschiedene dopaminerge Agonisten und Antagonisten in ihrer reninsekretionsfördernden oder -hemmenden Potenz untersucht.

3. MATERIAL

3.1 Substanzen

¹²⁵ I-Angiotensin I	Perkin Elmer, Boston, USA
7-OH-DPAT (7-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralinhydrobromid)	Sigma, Taufkirchen
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Adrenalin	Sigma, Taufkirchen
Aldosteron Radioimmunoassay Kit No. 1664	Immunotech, Marseilles, Frankreich
Aluminiumoxid (Al ₂ O ₃)	Sigma, Taufkirchen
Angiotensin I	Sigma, Taufkirchen
Angiotensin I Antikörper	Prof. Dr. E. Hackenthal, Heidelberg
Angiotensin II	Sigma, Taufkirchen
Aqua demineralisata	Millipore, Molsheim, Frankreich
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Atenolol	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromocriptinmesilat	Biotrend GmbH, Köln
BSA (Albumin aus Rinderserum)	Roth, Karlsruhe
BSF 201640	Abbott, Ludwigshafen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen [®] (95 % O ₂ + 5 % CO ₂)	Linde AG, Höllriegelskreuth
Citronensäure-monohydrat	Merck, Darmstadt
Collagenase A	Boehringer Mannheim
Deoxycorticosteronacetat	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
3,4-Dihydroxybenzylamin	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumcitrat-sesquihydrat	Fluka, Buchs, Schweiz
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dopaminhydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Epinin (N-Methyl-Dopamin)	Sigma, Taufkirchen

Ethanol 70 %	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Riedel-de Haën, Seelze
Furosemid (Lasix [®])	Aventis, Frankfurt
Gelatinelösung 0030 303.008	Eppendorf, Hamburg
Globulins (Cohn Fraktion IV-1, bovin)	Sigma, Taufkirchen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
8-Hydroxyquinolinhemisulfat	Sigma, Taufkirchen
Isoprenalinhydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumtartrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Neomycinsulfat	Serva, Heidelberg
Noradrenalinbitartrat	Sigma, Taufkirchen
Norit A (Charcoal)	Serva, Heidelberg
Pentobarbital-Natrium	Sigma, Taufkirchen
Percoll	Amersham Biosciences, Freiburg
ortho-Phosphorsäure 85 %-ig	Riedel-de Haën, Seelze
RPMI 1640 Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SKF 38393 Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Sacharose	Merck, Darmstadt
Standard Lithiumlösung	Eppendorf, Hamburg

Stickstoff, flüssig	Universität Tübingen
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Thiopental-Natrium (Trapanal®)	Altana, Konstanz
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin (aus bovinem Pankreas)	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid 30%	Fluka, Neu-Ulm

3.2 Geräte

Gefrierschrank –20°C - Liebherr Comfort	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank –80°C, MDF-U70VC	Sanyo, MS-Laborgeräte, Wiesloch
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Chloridmeter 6610	Eppendorf, Hamburg
Cobra Auto-Gamma	Canberra Packard, Frankfurt
Diaphot Umkehrmikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf
Druckaufnehmer Maxxim Medical	World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA
Glas Carbon Elektrode ANTEC Micro VT-03	Analytical Technology, Leiden, Niederlande
Haematokrit Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Heizung KE OP-T(Si 630 mA)	Effenberg, Pfaffing
Operationstische (Ratten+ Mäuse)	Effenberg, Pfaffing
Hamilton Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz
Heraeus LaminAir HA 2448 GS	Heraeus, Hanau
Hettich Tischzentrifuge 12-24	Hettich, Tuttlingen
HPLC zur Dopaminbestimmung mit:	
- Pumpe S 1100	
1. mit Mikropumpenkopf	
2. mit Makropumpenkopf	Sykam, Fürstenfeldbruck
- Säule RP Nucleosil 5 µm, 125x4mm	Grom, Herrenberg
- Messzelle VT-03 flowcell	Biometra, Göttingen
- Messzelle Modell Sputnik	Recipe, München

- Probensamplers S 5200 Sample Injector	Sykam, Fürstfeldbruck
- Software Axxi-Chrom 737	Axxiom Chromatographie, Calabasas, USA
HPLC zur Kreatininbestimmung mit:	
- Pumpe S 1121 Solvent Delivery System	Sykam, Fürstfeldbruck
- Säule GROM-SIL 120 ODS-3 CP 5 µm 250 x 4 mm	Grom, Herrenberg
- Sykam S8111 Low Pressure Gradient Mixer	Sykam, Fürstfeldbruck
- Sykam S3240 UV/VIS Multichannel Detector	Sykam, Fürstfeldbruck
- Probensamplers S 5200 Sample Injector	Sykam, Fürstfeldbruck
- Software Peaksimple	SRI Inc., Indianapolis, IN, USA
Inkubationsgefäß (Doppelmantel)	Bachofer, Reutlingen
Makrodex [®] Standardkäfige	Ehret, Freiburg
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikrofuge	Beckman, Fullerton CA, USA
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Multipette Socorex Microdispenser	Socorex, Lausanne, Schweiz
Neubauer Zählkammer Assistent	Karl Hecht KG, Sondheim
Operationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Osmomat O 30 Cryoscopic Osmometer	Gonotec GmbH, Berlin
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Polycarbonatröhrchen	Beckman, Fullerton, CA, USA
Flammenphotometer ELEX 6361	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter 763 Multi-Calimatic	Knick, Berlin-Zehlendorf
Schwanzblutdruckmessgerät Model 179 Blood pressure analyzer	Hugo Sachs, March-Hugstetten
Stereomikroskop VMT 10x [®]	Olympus, Japan
Stoffwechsellkäfige Techniplast [®]	Ehret, Freiburg
Superfusionskammern	Klaus Stieler, Uni-Tübingen
Superfusionspumpen	Braun, Melsungen
Thermoschnellschreiber	Hugo Sachs, Hugstetten
Thermostat M 3 Lauda	Dr. Wobser GmbH + Co KG,

	Königshofen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Ultrazentrifuge L-70	Beckman, Fullerton, CA, USA
Festwinkelrotor (50.2 TI)	Beckman, Fullerton, CA, USA
Vortexer REAX 1 DR	Heidolph, Schwabach
Ultraschallbad Braunsonic 52	Braun, Melsungen
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel IKA- Labortechnik, Staufen
Waage Mettler B 6	Spoerhase KG, Giessen
Waage Precisa 100 A-300 M	PAG Oerlikon AG, Zürich
Waage Sauter ASE	Sauter, Engen
Wasserbad Julabo SW – 20 C	Bachofer, Reutlingen
Countdown & Countup timer	Oregon Scientific, Portland, Oregon USA
Zellzählgerät „CASY®“	Schärfe-System, Reutlingen
Zentrifuge Rotaxia/ K	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge 5412	Eppendorf, Hamburg

3.3 Verbrauchsmaterialien

CASY®ton	Schärfe System, Reutlingen
Diethylaminoethylcellulose-Filter	Whatman, Maidstone, England
Hämatokrit Versiegelungskit	Brand, Wertheim
Kanülen	Braun, Melsungen
Minicaps Einmalkapillaren	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Mikrohämatokritkapillaren 75 µl	Brand GmbH&CO, Wertheim
Nahtmaterial	
Ethicon®	Johnson & Johnson,
Ethilon® II Blau Polyamid 6 monofil	Brüssel
Nylonsieb	Verseidag Techfab, Walbeck
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen

Polyethylengefäße, „Eppendorf Cups“

0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml

Eppendorf AG, Hamburg

Polyethylenkatheter

SIMS Portex[®] tubing, Hythe Kent,
UK

Polypropylenröhrchen

Greiner bio-one, Frickenhausen

Polyethylenschläuche

Reiff, Reutlingen

Polyethylenvials (HPLC)

Roland Vetter, Ammerbuch

Polystyrolröhrchen 4,5 ml

Greiner bio-one, Frickenhausen

Polystyrolröhrchen 5,0 ml

Greiner bio-one, Frickenhausen

Poröse Platten aus PTFE 10 µ

Reichert Chemietechnik, Heidelberg

Rasierklingen

Wilkinson Sword

Seidenfäden 5/0 metric 1 schwarz

Suprama, Berlin

Spritzen 1 ml Plastipak

Becton Dickinson, Heidelberg

Spritzen 2 ml Plastipak

Becton Dickinson, Heidelberg

Visking[®] dialysis tubing 27/ 32

Serva, Heidelberg

Vivaspin 500 µl

Vivascience AG, Hannover

3.4 Futter/ Diäten

Niedrigsalz C 1036 (0,2 % NaCl)

Altromin, Lage

Normalsalz H 1324 (0,6 % NaCl)

Altromin, Lage

Hochsalz H 1324 + 4 % NaCl (4,6 % NaCl)

Altromin, Lage

3.5 Puffer und Lösungen

Konservierungsmittel für Dopamin im Urin:

Da Dopamin oxidationsempfindlich ist, erfolgt unter dem Einfluss von Wärme, Licht und alkalischem pH-Wert eine Oxidationsreaktion, in deren Verlauf Dopamin umgewandelt wird. Um das mit dem Urin ausgeschiedene Dopamin während der Dauer der Stoffwechselläufigexperimente zu schützen, wurde in den Urinsammelgefäßen Citratpuffer vorgelegt.

Citronensäuremonohydrat	0,958 M (201,3 g/l)
di-Natriumhydrogencitratesesquihydrat	0,292 M (76,7 g/l)

Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst und der pH-Wert mit 10 N NaOH auf 2,6 – 2,8 eingestellt.

HEPES/ TRIS-Puffer für die Plasmagewinnung zur Bestimmung der Plasmoreninaktivität:

HEPES	40 mM (9,52 g/l)
TRIS	20 mM (2,42 g/l)
NaCl	112 mM (3,28 g/l)
EDTA-Dinatriumsalz x 2 H ₂ O	5,373 mM (2,0 g/l)

Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst und mit HEPES bzw. TRIS auf pH 7,4 eingestellt.

3.5.1 Puffer + Laufmittel für die Dopaminbestimmung mit Hilfe der Mikro- und Makro-HPLC

TRIS-Puffer:

TRIS	0,1 mol/ 50 ml (12,11 g/ 50 ml)
EDTA	0,3 mol/ 50 ml (5,58 g/ 50 ml)
Na ₂ S ₂ O ₅	0,053 mol/ 50 ml (0,50 g/ 50 ml)

Die Substanzen wurden in 50 ml Aqua demin. gelöst und anschließend mit 2 N HCl auf pH 9 eingestellt. Die fertige Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

Laufmittel für die Makro- und Mikro-HPLC:

Tri-Natriumcitratdihydrat	40 mM (11,36 g/ l)
Citronensäuremonohydrat	10 mM (1,97 g/ l)
Octansulfonsäure	~1 mM (0,3 – 0,37 g/ l)
EDTA	0,4 mM (0,15 g/ l)
Methanol	30 ml (3 %)
Acetonitril	25 – 30 ml (2,5 %)

Die Substanzen wurden gelöst und anschließend im Messkolben mit Aqua demin. auf 1000 ml aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde die Lösung 10 min lang im Ultraschallbad entgast.

Elutionsmittel für die Makro-HPLC:

H ₃ PO ₄	0,1 M
--------------------------------	-------

Die Säure wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Elutionsmittel für die Mikro-HPLC:

H_3BO_3	0,4 M
HClO_4	0,2 M

3.5.2 Laufmittel für die Kreatininbestimmung mit Hilfe der HPLC

Laufmittel A:

K_2HPO_4	0,06 M (10,45 g/ l)
--------------------------	---------------------

Die Substanz wurde in 900 ml Aqua demin. gelöst, mit 85 %-iger Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt und anschließend im Messkolben auf 1000 ml aufgefüllt. Vor dem Gebrauch wurde die Lösung für 10 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Laufmittel B:

K_2HPO_4	0,06 M (10,45 g/ l)
Acetonitril	20 % (V/ V)

Die Substanz wurde in 750 ml Aqua demin. gelöst, mit 85 %-iger Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt, 200 ml Acetonitril hinzugefügt und die Mischung anschließend im Messkolben auf 1000 ml aufgefüllt. Vor dem Gebrauch wurde die Lösung für 10 Minuten im Ultraschallbad entgast.

3.5.3 Puffer und Lösungen für die Präparation und Superfusion der juxta-glomerulären Zellen

Puffer 1:

HEPES	10 mM (2,38 g/ l)
NaCl	130 mM (7,60 g/ l)
KCl	5 mM (0,37 g/ l)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mM (0,29 g/ l)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM (0,20 g/ l)
Glucose	10 mM (1,8 g/ l)
Sucrose	20 mM (6,85 g/ l)

Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst und mit 1 N NaOH der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Puffer 2:

NaCl	126,3 mM (5,32 g/ l)
NaHCO ₃	17,5 mM (1,47 g/ l)
KCl	7,0 mM (0,52g/ l)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,0 mM (0,29 g/ l)
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM (0,30 g/ l)
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,2 mM (0,17 g/ l)
Glucose	11,0 mM (1,98 g/ l)

Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst. Die Lösung wurde vor der Superfusion für eine Stunde mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast.

Puffer 3:

TRIS	200 mM (24,2 g/l)
Neomycin	0,4 g (0,2 g/l)

Die Substanzen wurden im 1950 ml Aqua demin. gelöst, mit Eisessig auf pH 7,4 eingestellt und mit Aqua demin. auf 2000 ml aufgefüllt. Zur Herstellung der Pufferlösung für den Radioimmunoassay wurde 1 mg/ml BSA hinzugefügt.

Puffer 4:

TRIS	33,5 mM (4,06 g/l)
Maleinsäure	50,0 mM (5,80 g/l)
EDTA	8,0 mM (2,98 g/l)

Die Substanzen wurden in Aqua demin. suspendiert und mit 10 N NaOH auf pH 5,8 eingestellt bis eine klare Lösung entstand (Maleatbildung). Vor Gebrauch des Puffers wurde 1 mg/ml BSA zugesetzt.

Puffer 5:

Na ₂ HPO ₄	10,0 mM (1,78 g/l)
KH ₂ PO ₄	3,2 mM (0,44 g/l)
NaCl	123,2 mM (7,2 g/l)

Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst und auf pH 7,2 eingestellt. Zur Bestimmung der Renin-Restaktivität auf den Filtern, wurden diese in 200 µl des Puffers eluiert.

Isoosmotisches Percoll®:

9 Teile Percoll® (Polyvinylpyrrolidon gecoatetes SiO₂)

1 Teil 0,9 % NaCl-Lösung

Die Suspension wurde mit Puffer 1 zu einer 30 %-igen isoosmotischen Percoll®-Lösung verdünnt.

Proteaseinhibitorlösung:

2,3-Dimercaptopropanol 80 µl/ 100 ml

8-Hydroxychinolin 0,91 mmol/ 100 ml (132 mg/ 100 ml)

Die Substanzen wurden in 100 ml Aqua demin. gelöst. Zur Reninbestimmung wurde diese Lösung dem Reninsubstrat (Angiotensinogen) zugesetzt.

Charcoal-Suspension:

1 g Norit A + 20 ml Puffer 3 sowie 300 mg bovines α-Globulin + 10 ml Puffer 3 wurden 10 min separat auf Eis gerührt. Die Globulinlösung wurde anschließend mit der Kohlesuspension gemischt und nochmals 10 min auf Eis gerührt.

3.6 Versuchstiere

3.6.1 Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse

Für die Experimente wurden männliche Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Tiere von der Firma Abbott, Ludwigshafen mit einem Körpergewicht von 20 bis 30 g verwendet. Die Mäuse wurden bei standardisierten Umweltbedingungen, Raumtemperatur 21°C und relativer Luftfeuchtigkeit von ca. 60%, in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, im institutseigenen Tierstall gehalten. Die Tiere hatten bis zum Versuchsbeginn freien Zugang zu Trinkwasser und der jeweiligen Salzdiät. Die Experimente wurden mit 3 und 11 Monate alten Tieren durchgeführt, wobei die jeweiligen Gruppen zuvor für 1 Monat auf der jeweiligen Salzdiät gehalten wurden. Um sozialen Stress, der insbesondere bei älteren männlichen Mäusen in Gruppenhaltung durch Konkurrenzverhalten auftritt, während der Versuchsreihen zu vermeiden, wurden die Tiere, so weit möglich, einzeln in Makrodex[®] Standardkäfigen (Ehret, Freiburg i. Br.) gehalten.

3.6.1.1 Generierung von Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäusen

Die Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse wurden von den ZNS Forschungslaboratorien der Firma Abbott GmbH&Co.KG Ludwigshafen generiert. Aus einer genetischen Datenbank der 129SVJ-Maus wurde ein DNA-Abschnitt ausgewählt, welcher das erste Exon des Dopamin D₃ Rezeptors, ungefähr 0,9 kb oberhalb des Promotors und rund 7,8 kb des angrenzenden Introns enthält. Das erste Exon wurde durch die Einführung eines Tetrazyklin-abhängigen Promotors (tetracyclin-responsive translational activator protein (tTa)) und eines Neomycin-Resistenz-Gens, durch homologe Rekombination zum größten Teil ersetzt. Der Tetrazyklin-abhängige Promotor war zur Aktivierung eines konditionalen Knock-In vorgesehen, spielt aber bei den hier dargestellten Experimenten keine Rolle. Das entstehende DNA-Fragment wurde in embryonale Stammzellen (ES) von 129SVJ-Mäusen mit Hilfe der Elektrotransfektion transfiziert. Die embryonalen Stammzellen sind völlig undifferenziert und können daher sämtliche Gewebe eines Organismus

ausbilden (Omnipotenz). Durch den Prozess der homologen Rekombination wurde die mutierte exogene Sequenz an der beabsichtigten Stelle im Genlocus ausgetauscht. Die Fähigkeit der homologen Rekombination ist eine natürliche Eigenschaft von Zellen, die durch Enzyme des DNA-Reparatursystems vermittelt wird. Die erfolgreich transfizierten Stammzellen wurden auf Neomycin-haltigen Nährböden selektioniert, d.h. nur die Zellen, die das Resistenzgen gegen das Antibiotikum enthielten, konnten sich entwickeln. Diese wurden anschließend genauer auf das erwartete Gen-Insert untersucht (PCR, Southern Plot-Analyse). War es zu einer nicht-homologen Integration der exogenen DNA gekommen, wurde auch der außerhalb der Homologiearme liegende negative Selektionsmarker des Konstrukts, eine Thymidinkinase, mitübertragen, so dass diese unerwünschten Klone herausselektioniert werden konnten.

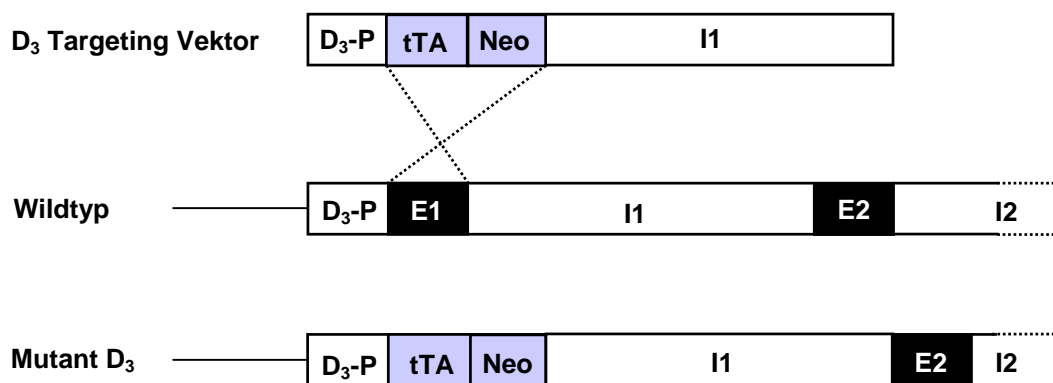


Abb. 3.1: Herstellung des Dopamin D_3 Knockout-Konstruktes. Der Tetrazyklin-abhängige Promotor (tTA) und das Neomycin-Resistenzgen ersetzen durch homologe Rekombination den größten Teil des ersten Exons (E1) im Wildtyp-Allel. Die Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Durch die Einführung dieses Inserts entsteht das mutierte Dopamin D_3 Rezeptorgen. D_3 -P = Promotor; tTA = tetrazyklin-responsive translationale Aktivatorprotein; Neo = Neomycin-Resistenzgen; I1/ I2 = Intron 1 bzw. Intron 2.

Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden vermehrt und in Blastozysten von C57BL/6-Mäusen injiziert. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden diese in scheinchwangere C57BL/6-Ammen übertragen. Die hierbei entstehenden chimeren Männchen wurden mit C57BL/6-Weibchen zurückgekreuzt, wobei in der F_1 Generation heterozygote Tiere (+/-) entstanden. Wiederholte Rückkreuzungen der (+/-) Männchen der jeweils nachfolgenden Generationen mit C57BL/6 Weibchen

wurden durchgeführt, um in der 7. Generation transgene Tiere, mit einem genetischen Hintergrund, welcher weitgehend mit den C57BL/6-Mäusen übereinstimmt, zu erhalten. Zur Genotypisierung wurde aus den Schwanzspitzen der Tiere DNA isoliert und mit Hilfe von PCR und Southern Plot analysiert. Die in den folgenden Experimenten verwendeten homozygoten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse wurden durch Kreuzung heterozygoter Tiere erhalten.

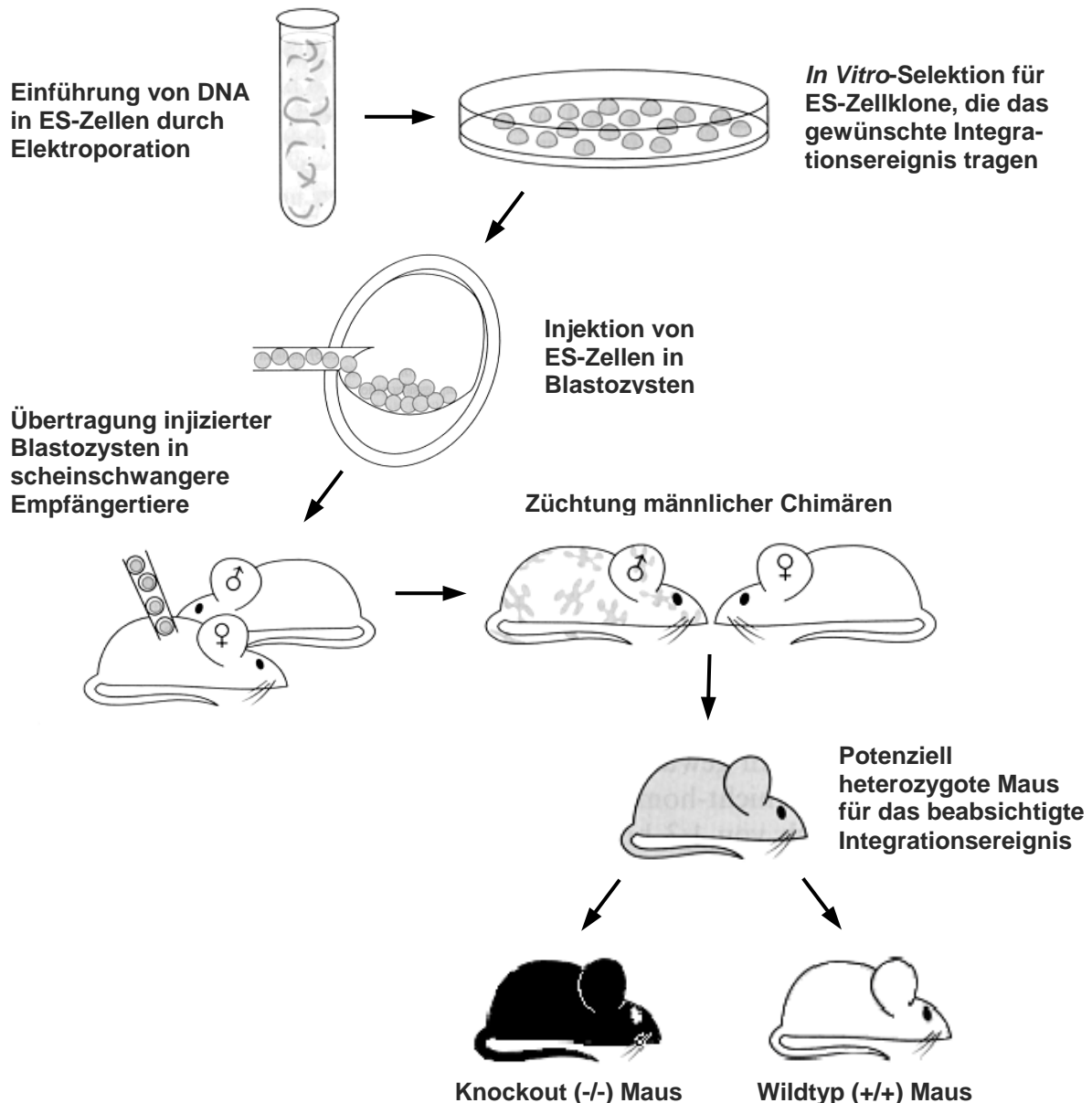


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs zur Generierung von Knockout-Mäusen (siehe 3.6.1.1). Die embryonalen Stammzellen (ES), die nach der Transfektion für das gewünschte Knockout-Konstrukt positiv waren, wurden bei der Kultivierung auf einem Neomycin-haltigen Nährboden selektiert, in Zellkultur vermehrt und anschließend in Blastozysten injiziert. Diese wurden in scheinchwangere Empfängertiere übertragen. Die geborenen chimären Männchen wurden mit den Wildtyp-Weibchen zurückgekreuzt, wobei in der folgenden Generation heterozygote Tiere entstanden (+/-). Durch die Kreuzung dieser Tiere wurden die homologen Knockout- (-/-) bzw. Wildtyp-Mäuse (+/+) erzeugt (modifiziert nach Kulozik et al. (2000)).

3.6.2 Ratten

Als Versuchstiere wurden außerdem männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 250 bis 400 g verwendet. Die Tiere wurden im institutseigenen Tierstall bei den oben genannten Bedingungen (siehe 3.6.1) gehalten. Die Ratten erhielten Normalsalzdiät (Altromin C 1324, Lage) und hatten freien Zugang zu Trinkwasser.

Vor den Versuchen wurden die Tiere für mindestens 4 Tage in MacroDEX[®]-Standardkäfigen in Gruppen bis zu 6 Tieren gehalten, damit sie sich vom Transport erholen konnten. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

4. METHODEN

4.1 Tierexperimenteller Teil

4.1.1 Blutdruckmessung bei wachen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Der Blutdruck als physiologische Variable unterliegt einer Vielzahl von umweltbedingten und vegetativen Einflüssen. Durch Narkose wird u.a. das vegetative Nervensystem und damit der Blutdruck unmittelbar beeinflusst. Um diese Störgröße zu umgehen, wurde die folgende Vorgehensweise an wachen Mäusen gewählt. Um reproduzierbare Werte bei einem nicht-narkotisierten Versuchstier zu erhalten, muss dieses an die Prozedur und alle damit verbundenen Eingriffe gewöhnt werden. Während dieser Trainingsphase wurden die Mäuse an die Versuchsumgebung, die sogenannten Restrainer, an die Umgebungstemperatur, die Dauer einer Messung und nicht zuletzt an den Experimentator gewöhnt. Dadurch waren die Blutdruckwerte stabiler, da die Mäuse weniger Bewegungsartefakte produzierten.

4.1.1.1 Validierung der Methode

Um sicherzustellen, dass die Methode verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse liefert, wurden Vorversuche durchgeführt. Die Messung erfolgte immer zur gleichen Tageszeit, um zirkadiane Druckschwankungen zu vermeiden. Jede Maus wurde während des Messvorgangs immer im selben Restrainer gehalten, in welchem sie nur ihren eigenen Geruch wahrnehmen konnte, da fremde Gerüche eine weitere Stressquelle darstellen könnten. Die Messung wurde dann, genau wie die Vorbereitung, in einer möglichst geräuscharmen Kulisse durchgeführt.

Dazu wurde bei 6 männlichen C57BL/6 Mäusen nach der Trainingsphase zwei Wochen, jeweils zur gleichen Uhrzeit, an jedem 2. Tag, der Blutdruck bestimmt. Die Mäuse wurden hierfür in die Restrainer gesetzt und in den auf 32°C vorgeheizten

Arbeitsbereich gebracht. Andere Temperaturen haben sich nicht bewährt, da sich die Mäuse bei niedrigeren Werten häufiger bewegten und bei höheren die Blutdruckwerte während des Messvorgangs nicht stabil waren. Während der fünfminütigen Äquilibrationszeit im temperierten Bereich sollten die Mäuse die Möglichkeit haben, sich innerhalb des Restrainers zu bewegen, um eine bequeme Position einnehmen zu können. Nach dieser Zeit wurden die Tiere mit Hilfe einer Stellschraube fixiert, um Bewegungsartefakte zu vermeiden.

4.1.1.2 Gewöhnungsphase der Versuchstiere

Die Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Tiere wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen jeden 2. Tag zur gleichen Uhrzeit in die größenverstellbaren Plexiglas-Restrainer gesetzt.



Abb. 4.1: Maus im Restrainer. Die Stellschraube ist hier so eingestellt, dass die Maus vor Beginn der Messung eine bequeme Position einnehmen kann.

Anschließend wurden die Druckmanschetten um das proximale Ende der Schwänze gelegt. Die nun verschlossenen Restrainer wurden in eine auf 32°C temperierte Acrylglasbox gestellt. Nach einer Äquilibrationszeit von 10 Minuten wurden die Druckmanschetten mehrmals aufgepumpt, um den Blutdruckmessvorgang zu simulieren.



Abb. 4.2: Model 179 Blood pressure analyzer (Schwanzarterienblutdruckmessgerät) Hugo Sachs, March-Hugstetten. Der Aufbau zeigt die Acrylglasbox mit Heizung und den darin positionierten Restrainern. Ferner ist das Meßgerät, bestehend aus Pumpe, Steuerung und Auswertungseinheit, dargestellt.

4.1.1.3 Studiendesign der Blutdruckmessung bei den Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Bei früheren Untersuchungen (Asico et al. 1998) wurde bei den Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäusen - unter Narkose - ein natriumabhängiger Hypertonus im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen gefunden. Um den möglichen Einfluss eines Narkosemittels ausschließen zu können, wurden bei den folgenden Experimenten Tiere im Wachzustand untersucht. Durch ein Cross-over Design sollte beobachtet werden, wie sich der Blutdruck der Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäuse unter dem Einfluss von abwechselnden NaCl-Diäten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen verhält. Dazu wurden jeweils 12 (-/-) und (+/+) Mäuse, mit

einem Gewicht von 22 bis 26 g, über einen Zeitraum von 5 Wochen untersucht. In der ersten Woche erhielten die Tiere eine Normalsalzdiät (0,6% NaCl, NS). Im Anschluss daran wurden die Mäuse in 2 Studienarme, bestehend aus jeweils 6 Knockout- und 6 Wildtyp-Tieren, randomisiert. Die erste Versuchsgruppe erhielt eine initiale Furosemid-Injektion (Lasix[®]) - 20 mg/ kg i.p. - gefolgt von einer 2-wöchigen Niedrigsalzdiät (0,2% NaCl, LS), während die zweite Gruppe eine Hochsalzdiät (4,6% NaCl, HS) und eine tägliche Deoxycorticosteronacetat- (DOCA) Injektion - 1mg/ kg i.p. - bekam (Dosierungen nach Mühlbauer & Osswald (1993)). Furosemid sollte das NaCl der Tiere weitgehend depletieren, wohingegen das DOCA, als Mineralocorticoid, die Natriumretention während des Experimentes fördern sollte. Nach diesen 2 Wochen erfolgte das Cross-over, d.h. die erste Gruppe, welche zuerst die Niedrigsalzdiät erhielt, bekam nun die HS-Diät zusammen mit der täglichen DOCA-Injektion, und die andere bekam die initiale Lasix-Injektion, gefolgt von der LS-Diät. Während der gesamten Versuchsdauer wurde an jedem 3. Tag der Blutdruck gemessen.

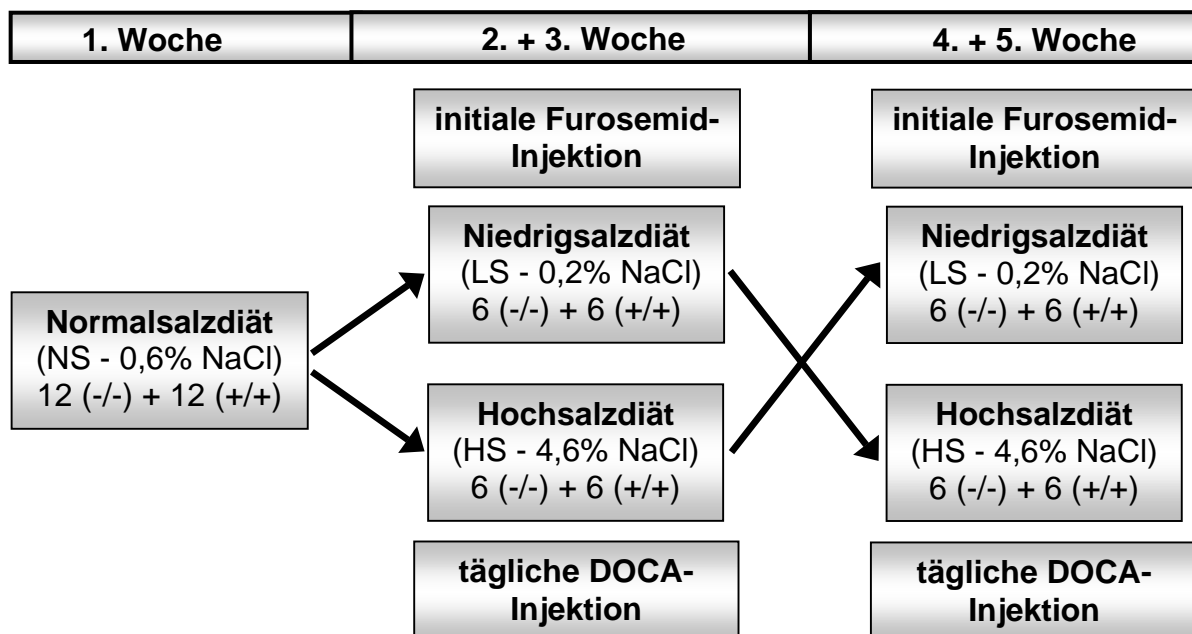


Abb. 4.3: Cross-over Studiendesign der Blutdruckmessung bei wachen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.

Um den Einfluss des Alters auf mögliche Blutdruckreaktionen des Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Phänotyps beobachten zu können, wurden sowohl 3 als auch 11 Monate alte Mäuse entsprechend dem dargestellten Protokoll untersucht.

4.1.1.4 Messvorgang

Während der Äquilibrationsphase, in welcher die Mäuse bereits in den Restrainern saßen, wurde das Blutdruckmessgerät kalibriert. Nach den 10 Minuten wurde der Freiraum der Tiere mit Hilfe der Stellschraube so weit eingeengt, dass sie sich während der Messung nur wenig bewegen konnten. Die Staumanschette wurde automatisch auf den zuvor eingestellten Maximaldruck von 180 mmHg aufgepumpt, wobei die Schwanzarterie abgeklemmt wurde. Anschließend wurde der Manschettendruck gleichmäßig abgelassen. Beim Erreichen des systolischen Blutdrucks begann die Schwanzarterie wieder zu pulsieren. Dieses Signal wurde durch einen optischen Sensor innerhalb der Manschette registriert und konnte zusätzlich an einer Leuchtdiode am Gerät beobachtet werden. Während der Messung wurden die Pulswellen und die Druckkurve mit Hilfe eines integrierten Thermoschreibers aufgezeichnet. Aus dem Verlauf der Druckkurve zusammen mit dem Pulssignal konnte der systolische Blutdruck der Mäuse ermittelt werden. Für jedes Tier und jeden Versuchstag wurden 5 bis 7 Messungen durchgeführt und aus diesen der Mittelwert gebildet.

4.1.2 Stoffwechselkäfigexperimente

4.1.2.1 Chronische Kochsalzbeladung von Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Dopamin wurde häufig als natriuretisches Hormon diskutiert (Ball & Lee 1977), (Casson et al. 1983), (Eklof 1997). Die von Asico et al. (1998) beschriebenen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäuse hatten unter Narkose infolge einer akuten Kochsalzbeladung weniger Natriumchlorid ausgeschieden als die korrespondierenden Wildtyp-Tiere. Um die Kapazität der Natriumurinausscheidung (U_{NaV}) der Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäuse im Vergleich zu ihren korrespondierenden Wildtyp-Tieren zu untersuchen, wurde ein Stoffwechselkäfigexperiment über 2 Wochen durchgeführt. Dabei wurden jeweils 6 Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und 6 Wildtyp-Mäuse im Alter von 3 und 11 Monaten, mit einem

Anfangsgewicht von 26 bis 28 g bzw. 30 bis 32 g, eine Woche auf Normalsalz- (NS, 0,6 % NaCl) und im Anschluss daran eine Woche lang auf Hochsalzdiät (HS, 4,6 % NaCl) gehalten. Während der Experimente wurde täglich Urin abgenommen und für die spätere Analyse asserviert. Des Weiteren wurden die jeweilige Futterraufnahme, das Trinkvolumen und das Tiergewicht bestimmt. Mit Hilfe der Flammenphotometrie wurde die Natrium- und Kaliumkonzentration im Urin gemessen und anschließend die jeweilige Ausscheidung berechnet.

Salzdiät	Normalsalzdiät (0,6 % NaCl)							Hochsalzdiät (4,6 % NaCl)						
	Messtag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Abb. 4.4: Studiendesign des 2-wöchigen Stoffwechselkäfigexperimentes

Die Tiere saßen einzeln auf einem Gitterrost in Stoffwechselkäfigen (Techniplast[®], Ehret, Freiburg). Darunter befand sich ein engmaschiges Sieb, welches Kot und Futterreste auffing. Der Urin wurde über einen konusförmigen Behälter, im unteren Abschnitt des Käfigs, in ein Urinsammelgefäß geleitet. Das Futter wurde am äußeren Rand des Gitters innerhalb des Käfigs fixiert und darunter auf dem konischen Abschnitt eine Barriere aus Klebeband angebracht, um Futterreste im Urin weitgehend zu vermeiden, da diese u.a. die Natriumkonzentration hätten verändern können. Die Stoffwechselkäfige befanden sich in einem konstant klimatisierten Raum (22°C und 60% rel. Luftfeuchtigkeit). Die Mäuse hatten während der gesamten Versuchsdauer freien Zugang zu der jeweiligen Diät und Trinkwasser.

4.1.2.2 Gewinnung der Urinproben

Der Urin wurde täglich gesammelt, das Volumen bestimmt, anschließend abzentrifugiert und der Überstand in Polyethylengefäßen (Safelock 2,0 ml,

Eppendorf, Hamburg) aliquotiert und bis zur Analyse der Proben bei -20°C eingefroren.

4.1.2.3 Bestimmung von Futtermenge, Trinkvolumen und Tiergewicht

Die Tiere wurden täglich gewogen, um Diäteeinflüsse beobachten zu können. Des Weiteren wurden Trinkvolumen und Futtermenge abzüglich der Verluste bestimmt und ggf. nachgefüllt.

4.1.2.4 Dopaminurinausscheidung (U_{DAV})

Um die Dopaminkonzentration im Urin zu bestimmen, wurden jeweils 6 Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse im Alter von 3 und 11 Monaten mit einem Gewicht von 21 bis 29 g bzw. 25 bis 39 g, welche zuvor mindestens 4 Wochen auf LS-, NS- oder HS-Diät gehalten wurden, für 12 h in Stoffwechsellkäfige gesetzt. Die Tiere hatten während dieser Zeit freien Zugang zu Trinkwasser, erhielten aber kein Futter. Die Versuche wurden zwischen 7 h morgens und 19 h abends durchgeführt, da die Mäuse sich während dieser Zeit in ihrer Ruhephase befanden und der Futterentzug weniger Einfluss auf den Metabolismus der Tiere hatte.

Dopamin als Katecholamin ist licht-, temperatur- und pH-empfindlich. Deshalb wurde in die Urinauffanggefäße Citratpuffer vorgelegt. Dabei war das zu erwartende Urinvolumen, welches zuvor in Vorexperimenten ermittelt wurde, maßgeblich für das vorzulegende Volumen des Citratpuffers. Dabei sollte die Endkonzentration des Puffers nach dem Experiment ca. 10 bis 15 % betragen.

Nach den 12 h wurde der Urin abgenommen, gewogen und bei -80°C bis zur Analyse im Gefrierschrank (-80°C , MDF-U70VC, Sanyo, MS-Laborgeräte, Wiesloch) gelagert. Bei dieser Temperatur war das Dopamin in den Proben bis zu 3 Monate lang stabil.

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn gewogen. Aus der Konzentration von Dopamin im Urin, Urinvolumen, Tiergewicht und Sammelzeitraum wurde die absolute Dopaminurinausscheidung ermittelt.

4.1.2.5 Dopaminkonzentration im Plasma ($[DA]_{\text{Plasma}}$)

Bei den selben Tieren wurde nach dem 12-stündigen Stoffwechselkäfigversuch Blut über die retroorbitale Vene abgenommen, um die Dopaminkonzentration im Plasma zu bestimmen. Mit Hilfe von NH_4 -heparinisierten Kapillaren wurde ca. 0,2 ml Blut in auf Eis gelagerten, heparinisierten Polyethylengefäßen (Safelock 0,5 ml, Eppendorf, Hamburg) aufgefangen und unmittelbar danach 4 min zentrifugiert (Zentrifuge 5412, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde das Plasma abgenommen, in auf Eis gelagerte Polyethylengefäße überführt und 30 %-ige Sulfosalicylsäure (60 μl Probe + 10 μl SSA) zugesetzt, um die Plasmaproteine zu fällen. Die Probe wurde geschüttelt (Vortexer REAX 1 DR, Heidolph, Schwabach) und 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in Polyethylengefäßen in flüssigem Stickstoff, bei -196°C eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

4.1.3 Einfluss von Angiotensin II auf den Blutdruck von Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

4.1.3.1 Versuchsdesign und -ablauf

Um den Zusammenhang zwischen dem Dopamin D_3 Rezeptor und dem Angiotensin (AT_1) Rezeptor in diesem Knockout-Modell zu prüfen, wurden narkotisierten Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen unterschiedliche Konzentrationen humanes AT II, als Bolus intravenös injiziert. Dabei wurden 0,25 bis 25,0 ng AT II/ kg Körpergewicht in aufsteigender Konzentration verabreicht. Um Kumulationseffekte zu vermeiden, wurden die Dosen im Abstand von 10 min gegeben. Diese Zeit wurde in Vorversuchen, aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Angiotensin II von ca. 15 bis

30 Sekunden, als ausreichend ermittelt. Vor der ersten AT II-Injektion wurde den Tieren eine 0,85 %-ige NaCl-Lösung (Vehikel, VHC) appliziert, um sicherzustellen, dass die Blutdruckveränderungen nicht durch Volumeneffekte zustande kommen. Nach der Maximaldosis wurde noch einmal eine niedrigere verabreicht, um auszuschließen, dass die zunehmenden Blutdrucksteigerungen durch eine Kumulation von AT II verursacht wurden. Die Injektionslösungen wurden so zubereitet, dass die entsprechende Konzentration in jeweils 100 µl enthalten war. Um sicherzustellen, dass sich keine Reste der Dosis im Todvolumen des Katheters befanden, wurde mit 100 µl 0,85 %-iger NaCl-Lösung nachgespült. Während der gesamten Versuchsdauer wurde das Drucksignal von einem Thermoschnellschreiber (Hugo Sachs, Hugstetten), mit einer Papiervorschubgeschwindigkeit von 5,0 mm/min, aufgezeichnet.

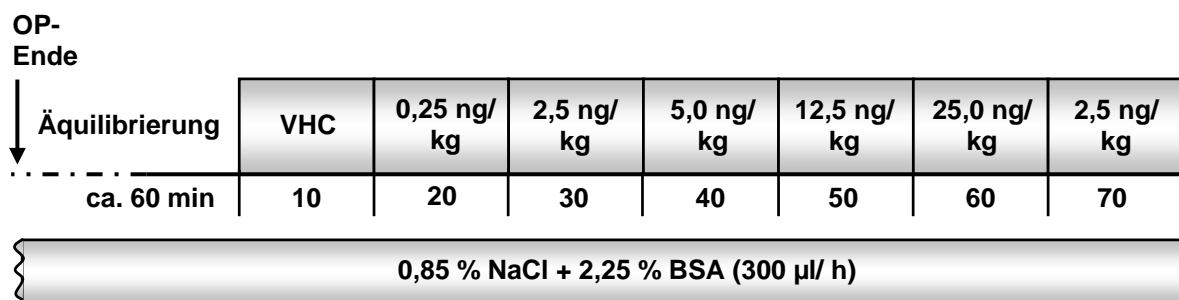


Abb. 4.5: Versuchsdesign und zeitlicher Ablauf der AT II-Injektionen bei Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen.

4.1.3.2 Narkose bei Mäusen

Um die Mäuse für die Experimente und die AT II-Injektionen vorzubereiten, wurden sie zunächst mit Pentobarbital-Natrium (Sigma, St. Louis, USA) narkotisiert. Die Substanz wurde dabei in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0,85 %-iger NaCl-Lösung zubereitet und in einer Dosierung von 100 mg/kg KG intraperitoneal injiziert. Die Narkosetiefe wurde vor und während der gesamten Versuchsdauer durch Abwesenheit von Reaktionen auf Schmerzreize und Ausbleiben des Lidreflexes sichergestellt. Vor Beginn des Experimentes wurde den Tieren ggf. eine Dosis von

20 mg/ kg KG i.p. nachinjiziert, um den Blutdruck während des Versuches nicht durch weitere Injektionen zu beeinflussen.

4.1.3.3 Präparation der Tiere

Die Versuchstiere wurden nach Eintreten der Narkose auf temperaturkontrollierte Operationstische (Fa. Effenberg, Pfaffing) gelegt, um ein Auskühlen zu vermeiden. Die Kerntemperatur wurde über eine rektal eingeführte Sonde überwacht und durch Rückkopplung über den beheizten Operationstisch bei 37,2°C konstant gehalten. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Lid-, Corneareflex und Schmerzreize, wurden die Tiere in Rückenlage gebracht und mit Hilfe von Seidenfäden am Tisch fixiert. Anschließend erfolgte mit einer Präparierschere (alle verwendeten Operationsinstrumente Fa. Aesculap, Tuttlingen) ein ungefähr 20 mm langer, medianer, suprasternaler Hautschnitt im ventralen Halsbereich. Die Hautfaszie wurde durchtrennt, die beiden Speicheldrüsen stumpf zur Seite luxiert und die infrahyale Muskulatur gespalten. Daraufhin erfolgte die Darstellung der Trachea, welche mit einer vorbereiteten Ligatur (alle Fäden: Seidenfäden 5/0 metric 1 schwarz, Fa. Suprama, Berlin) kaudal umschlungen wurde. Die Luftröhre wurde unter Schonung der umliegenden Gefäße und Nerven etwas angehoben und mit einer Federschere zwischen zwei Knorpelspangen eingeschnitten. In die Öffnung wurde ein vorbereiteter Trachealtubus (alle Katheter SIMS Portex tubing®, Hythe Kent, UK) von 15 mm Länge (Außendurchmesser (OD) 0,86 mm und Innendurchmesser (ID) 1,27 mm), ungefähr 5 mm in das Tracheallumen ventral vorgeschoben und anschließend mit Hilfe der vorbereiteten Ligatur fixiert. Die Atmung durch das Tracheostoma erfolgte spontan.

Im Folgenden wurde die Vena jugularis dexter unter dem Stereomikroskop (VMT 10x®, Fa. Olympus, Japan) stumpf dargestellt, durch eine Ligatur kranial abgebunden und gespannt. Eine zweite Ligatur wurde vorbereitet und kaudal um die Vene gelegt. Anschließend wurde das Gefäß mit Hilfe einer Gefäßschere inzidiert, ein mit Infusionslösung gefüllter Polyethylenkatheter (OD 0,96 mm ; ID 0,58 mm), welcher zuvor etwas dünner gezogen wurde, ungefähr 5 mm weit in das Gefäßlumen kaudal

vorgeschoben und mit dem vorbereiteten Faden fixiert. Um Dichtigkeit und korrekte Lage des Katheters zu überprüfen, wurde ein Bolus von ungefähr 50 µl infundiert und anschließend die Infusionspumpe (Braun, Melsungen) gestartet.

Im Anschluß erfolgte die Präparation der Arteria carotis. Dazu wurde die umliegende Muskulatur gespreizt und das Gefäß vom umliegenden Bindegewebe befreit. Darauf hin wurde der Nervus vagus vorsichtig von der Arterie abpräpariert. Das nun freiliegende Gefäß wurde kranial ligiert und gespannt. Anschließend wurde eine Arterienklemme so weit wie möglich kaudal gesetzt, unmittelbar davor eine Schlinge um die Arterie gelegt und das Gefäß so weit wie möglich kranial mit einer Gefäßschere inzidiert. Durch die entstandene Öffnung wurde ein vorbereiteter Polyethylenkatheter (OD 0,96; ID 0,58), welcher zuvor etwas dünner gezogen wurde, etwa 8 mm weit in das Gefäßlumen geschoben und mit der vorgelegten Ligatur fixiert. Mit einer zweiten Ligatur wurde der Katheter nochmals gesichert. Schließlich konnte die Arterienklemme entfernt und durch den Katheter das Signal für den Blutdruck und die Herzfrequenz über einen Druckabnehmer (Druckaufnehmer Maxxim Medical, World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) auf einen Thermoschreiber weitergeleitet werden. Nach Reposition der Gefäße und der Speicheldrüsen wurde der Halsbereich mit drei Einzelknopfnähten (Ethilon II Blau Polyamid 6 monofil, Johnson & Johnson, Brüssel) verschlossen.

Für die Katheterisierung der Harnblase erfolgte ein suprapubischer Hautschnitt ungefähr 5 mm kranial der Peniswurzel, entlang der Linea alba. Die Muskulatur wurde gespreizt, durch die entstehende Öffnung die Harnblase herausluxiert und mit einem Faden umschlungen. Anschließend wurde die Blase eingeschnitten, ein vorbereiteter Polyethylenkatheter (ID 0,4 mm; OD 0,8 mm) eingeführt und mit der Ligatur so fixiert, dass das entstehende Todvolumen in der Harnblase möglichst klein war. Nach Reposition der Harnblase im Bauchraum wurde die Operationswunde durch zwei Einzelknopfnähte verschlossen.

Für die weitere Versuchsdurchführung wurde das Tier in Seitenlage auf den beheizten Operationstisch gelegt. Über einen Schlauch, der in Kopfhöhe der Mäuse auf dem Tisch fixiert wurde, erhielten die Tiere mit Sauerstoff angereicherte Atemluft.

Über den Blasenkatheter erfolgte die Urinsammlung in PE-Gefäßen (Eppendorf AG, Hamburg).

4.1.3.4 Bolusgaben verschiedener Dosen von humanem Angiotensin II

Die Tiere erhielten während des gesamten Experimentes eine 0,85 %-ige NaCl-Lösung mit 2,25 % bovinem Serum Albumin (Roth, Karlsruhe) über den venösen Katheter infundiert. Nach einer ungefähr 30-minütigen Äquilibrationszeit wurde der Versuch gestartet und die Mäuse erhielten ihre erste Bolusinjektion. Dazu wurde der venöse Katheter an einem Verbindungsstück von der Infusionspumpe getrennt und die Vehikel- oder Angiotensin II-Dosis injiziert. Anschließend wurde der Katheter durch eine nochmalige Vehikelinjektion gespült und über das Verbindungsstück wieder an die Infusionspumpe angeschlossen.

4.2 Isolierung, Anreicherung und Superfusion der juxtaglomerulären Zellen

4.2.1 Isolierung und Anreicherung der juxtaglomerulären Zellen

Die Isolierung der Zellen erfolgte in Anlehnung an die Methode von Della Bruna et al. (1991). Als Versuchstiere wurden männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 300 – 400 g verwendet. Für jedes Experiment wurden 2 Tiere durch cervikale Dislokation getötet, dekapitiert und ausgeblutet. Durch einen medianen Längsschnitt wurde die Bauchdecke geöffnet, die Nieren entfernt und diese in Puffer 1 (siehe 3.5.3) bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die Nieren wurden dekapsuliert, gewogen, längs halbiert und das Nierenbecken entfernt. Mit Hilfe einer Rasierklinge (Wilkinson Sword) wurde das Nierengewebe zerkleinert. Das Gewebematerial wurde von Bindegewebsresten befreit und weiter zerkleinert. Anschließend wurde die Masse in ein mit 60 ml Puffer 1 gefülltes, doppelwandiges Inkubationsgefäß überführt. Unter Zusatz von 15 mg Collagenase A (Boehringer, Mannheim) und 40 mg Trypsin (Sigma, Taufkirchen) wurde das Gewebematerial unter

Carbogenbegasung (95 % O₂ + 5 % CO₂) und vorsichtigem Rühren 1 h lang bei 37°C enzymatisch dissoziiert.

Die Gewebesuspension wurde über ein Nylonsieb (Verseidag Techfab, Walbeck) mit einer Maschenweite von 22,4 µm gegeben, wobei die reninsezernierenden Zellen von Gewebestückchen, Tubulus- und Gefäßfragmenten getrennt werden konnten. Das Filtrat wurde auf 200 ml mit Puffer 1 aufgefüllt, in 4 Polypropylen-Tubes (50 ml, Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt und anschließend bei 700 x g 10 min lang zentrifugiert (Heraeus Christ UJ III E, Hanau). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets resuspendiert, die Tubes wieder jeweils auf 50 ml mit Puffer 1 aufgefüllt und anschließend nochmals 10 min lang bei 700 x g abzentrifugiert. Durch diese beiden Waschschrte wurden die Enzyme entfernt. Die Pellets wurden wieder resuspendiert, gepoolt und in insgesamt 8 ml RPMI 1640 Medium aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde durch einen kontinuierlichen Percoll®-Gradienten weiter aufgetrennt. Dazu wurden 4 Polycarbonatröhrchen (Beckman, Fullerton CA, USA) mit 0,6 ml physiologischer Kochsalzlösung, 5,4 ml Percoll® (Amersham Biosciences, Freiburg) und 14 ml Puffer 1 befüllt und vorsichtig gemischt. Auf diese vorbereiteten Lösungen wurden jeweils 2 ml der Zellsuspension gegeben und bei 27 000 x g und 4°C für 25 min zentrifugiert (Festwinkelrotor 50.2 TI, Ultrazentrifuge Beckman L-70, Beckman, Fullerton, CA, USA), wobei 4 Banden entstanden. Die unterste Bande enthielt Erythrozyten, während sich in den beiden oberen überwiegend Zelltrümmer befanden. Die Bande III, oberhalb der Erythrozyten, enthielt die höchste Reninaktivität (Finkbeiner, 1997) und somit den größten Anteil an juxtaglomerulären Zellen. Die Banden III aus den 4 Polycarbonatröhrchen wurden in einem Polypropylen-Tube gepoolt, mit Puffer 1 aufgefüllt und 10 min bei 700 x g zentrifugiert, um die Zellen vom Percoll® zu reinigen. Der Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, anschließend das Pellet resuspendiert und mit Puffer 1 auf 1800 µl ergänzt. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension über ungefähr 1 h bei 37°C im Trockenschrank äquilibriert.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Auf dem Boden der Neubauer-Zählkammer (Karl Hecht KG, Sondheim) befindet sich ein Raster aus Quadraten. Jeweils 16 dieser kleinen Quadrate bilden ein großes Quadrat, welches durch 2 Doppellinien abgegrenzt ist. Die Kammer selbst ist 0,1 mm tief. Die Seitenlänge eines Quadrates ist 0,05 mm lang, woraus sich zunächst eine Fläche von $0,0025 \text{ mm}^2$ und zusammen mit der Höhe ein Volumen von $0,00025 \text{ mm}^3$ über einem kleinen Quadrat ergibt.

Es wurden bei jedem Experiment 5 große Quadrate, bestehend aus jeweils 16 kleinen Quadraten ausgezählt. Das entsprechende Volumen ergibt sich somit aus

$$5 \times (16 \times 0,00025 \text{ mm}^2) \times 0,1 \text{ mm} = 0,02 \mu\text{l}$$

Die Gesamtzellzahl (GZZ) wird auf folgende Weise berechnet:

$$\text{GZZ} = \text{Zellzahl} \times 50\,000 \text{ (bezogen auf 1 ml)} \times \text{Volumen der Zellsuspension (in ml)}$$

4.2.3 Bestimmung der Viabilität der reninsezernierenden Zellen

Um zu zeigen, dass nach der Isolierung, nach einer Äquilibrierungszeit von ungefähr 60 min sowie nach einer Superfusionszeit von weiteren 120 min die juxtaglomerulären Zellen noch lebensfähig sind, und Dopamin als Stimulans bzw. Ascorbinsäure als Antioxidanz (siehe 4.2.7) die Zellen nicht zerstört, wurde mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY[®] (Schärfe System, Reutlingen) die Viabilität der Zellen geprüft.

Zur Messung wurden die Zellen in einer speziellen isotonen Elektrolytlösung (CASY[®]ton, Schärfe System, Reutlingen) suspendiert. Diese Suspension wurde durch eine Meßspore mit einem definierten Durchmesser gesaugt. Während der

Messung wurde über 2 Platinelektroden ein Spannungsfeld an die Meßpore angelegt. Die mit der Elektrolytlösung gefüllte Meßpore stellte einen definierten Widerstand dar. Beim Durchtritt einer intakten Zelle durch die Pore, verdrängt diese ein bestimmtes Volumen der Elektrolytlösung. Da die intakte Zelle als Isolator betrachtet werden kann, änderte sich der Widerstand innerhalb der Messpore entsprechend. Tote Zellen, bei denen die Membran keine elektrische Barriere mehr darstellt, wurden mit der Größe ihres Zellkerns erfaßt. Dieser Parameter wurde vorher mit Hilfe von mit 70 %-igem Ethanol abgetöteten Zellen festgelegt.

4.2.4 Beschreibung der Superfusionsapparatur

Die frisch isolierten juxtaglomerulären Zellen wurden in Superfusionskammern überführt, die von Herrn Klaus Stieler (Pharmakologisches Institut, Tübingen) entwickelt und gebaut wurden.

Der schematische Aufbau der Kammern ist in Abb. 4.6 dargestellt. Sie bestehen aus einem Ober- und einem Unterteil, welche aus inertem Acrylglas gefertigt wurden. Das Unterteil besteht aus einer halbkugelförmigen Bohrung, die in eine Kanüle mit einem Innendurchmesser von 0,60 mm mündet, durch welche während des Versuches das Superfusat in das Auffanggefäß gespült wurde. Auf diese Bohrung wurde ein Nylonsieb (Verseidag Techfab, Walbeck) mit einer Maschenweite von 22,4 µm gelegt, um sich ablösende Fasern von dem aufliegenden Diethylaminoethylcellulose-Filter (Whatman, Maidstone, England) aufzufangen und ein Verstopfen der Kanüle zu vermeiden. Auf den Filter wurde ein Quadring aus Silikon als Dichtung gelegt. Im Oberteil befindet sich ebenfalls eine halbkugelförmige Bohrung, welche in einen Entlüftungskanal mündet. Durch zwei Rändelschrauben wurden Ober- und Unterteil dicht verschlossen. Durch eine weitere Bohrung und über eine abgeschnittene Kanüle mit einem Innendurchmesser von 0,60 mm, an welche ein Polyethylenschlauch (Reiff, Reutlingen) mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm angeschlossen ist, gelangte die Superfusionslösung in die Kammer. Über den Entlüftungskanal wurde das Kammerinnere entlüftet und durch eine weitere Schraube diese Bohrung und damit die Kammer dicht verschlossen.

Der Polyethylenschlauch wurde luftblasenfrei an die mit Superfusionspuffer gefüllten Injektionsspritzen (2 ml Plastipak, Becton Dickinson, Heidelberg) angeschlossen. Die Kammern wurden in einen beheizten Aluminiumblock eingesetzt, der im Kammerinneren eine konstante Temperatur von 37°C gewährleistet. Der Heizblock war über Polyethylenschläuche (Innendurchmesser 1,0 cm) mit einem temperierbaren Wasserbad (Dr. Wobser GmbH + Co KG, Königshofen) verbunden. Wegen der schlechten Wärmeleitfähigkeit des Acrylglases befand sich die Superfusionspumpe (Braun, Melsungen) mit dem beheizten Aluminiumblock in einer verschließbaren Acrylglasbox, welche zusätzlich über einen Heizlüfter die Luft im Innenraum bei 37°C konstant hielt. Dadurch wurde in den Superfusionskammern die gewünschte Temperatur erreicht. Des Weiteren wurde durch die Umluftbeheizung die Pufferlösung in den Spritzen, welche in die Superfusionspumpe eingesetzt waren, auf 37°C temperiert.

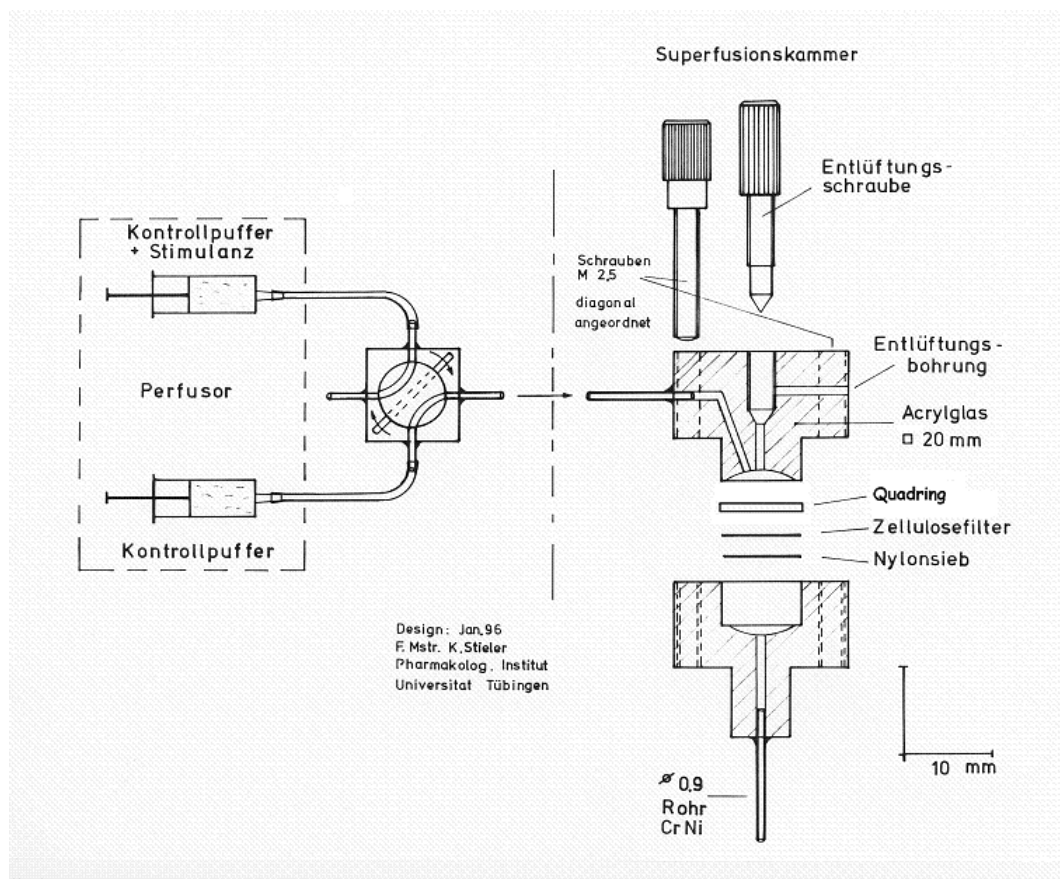


Abb. 4.6: Schematischer Aufbau der Superfusionsapparatur mit Längsschnitt durch eine Superfusionskammer.

4.2.5 Validierung der Superfusionskammern

Bevor die einzelnen Experimente beginnen konnten, wurden die Superfusionskammern validiert. Um die Gleichmäßigkeit der 20 Kammern zu überprüfen, wurden diese mit dem Nylonsieb und dem Cellulosefilter bestückt, die Silikondichtung eingelegt und Ober- und Unterteil zusammengeschaubt. Anschließend wurden die Kammern mit Aqua demin. befüllt, entlüftet, verschlossen und an mit Aqua demin. gefüllte Spritzen, welche bereits in die Superfusionspumpe eingelegt waren, angeschlossen. Die Pumpen wurden gestartet und das Effluat über eine Stunde alle 10 min in zuvor abgewogenen Polyethylengefäßen aufgefangen und abgenommen. Die Gefäße wurden danach zurückgewogen und aus der Differenz das Effluatvolumen bestimmt.

Des Weiteren wurde die Temperatur innerhalb der Superfusionskammern mit Hilfe eines NTC-Widerstandes überprüft. Dazu wurde der NTC zuvor in einem Wasserbad mit einem Thermometer kalibriert und anschließend in eine Superfusionskammer eingebaut. Wegen der schlechten Leitfähigkeit der Luft, wurde die Kammer mit Aqua demin. befüllt, in den beheizten Aluminiumblock gesetzt und der Heizlüfter der Plexiglasbox eingeschaltet. Es wurden sowohl die Geräteeinstellungen als auch die Zeit ermittelt, nach welcher innerhalb der Kammer eine Temperatur von 37°C erreicht wurde. Nach ungefähr 1 h war die vorgegebene Temperatur in den Kammern und der Plexiglasbox erreicht. Aus diesem Grund wurden diese eine Stunde vor dem Versuch vorgeheizt. Da die Superfusionslösung und die Zellsuspension ebenfalls eine Temperatur von 37°C aufwiesen, als sie in die Kammern gefüllt wurden, konnte die Superfusion nach der Befüllung der Kammern ohne Verzögerung gestartet werden.

4.2.6 Bestimmung der Vorlaufzeit

Um zu bestimmen, nach welcher Zeit das gesamte Volumen der Superfusionskammer mit der entsprechenden Konzentration der zu untersuchenden Substanz gesättigt war, wurde die Vorlaufzeit der Kammern ermittelt. Dazu wurden

10 Kammern mit Aqua demin. befüllt, entlüftet, verschlossen und an Spritzen angeschlossen, welche mit 0,85 %-iger NaCl-Lösung (150 mmol/ l) befüllt waren. Anschließend wurde die Superfusion gestartet und die Effluat alle 10 min in Polyethylengefäßen aufgefangen. Als Zeitpunkt der Kammersättigung wurde die Zeit bestimmt, nach der sämtliches Aqua demin. durch die NaCl-Lösung verdrängt worden war. Die NaCl-Konzentration wurde flammenphotometrisch bestimmt.

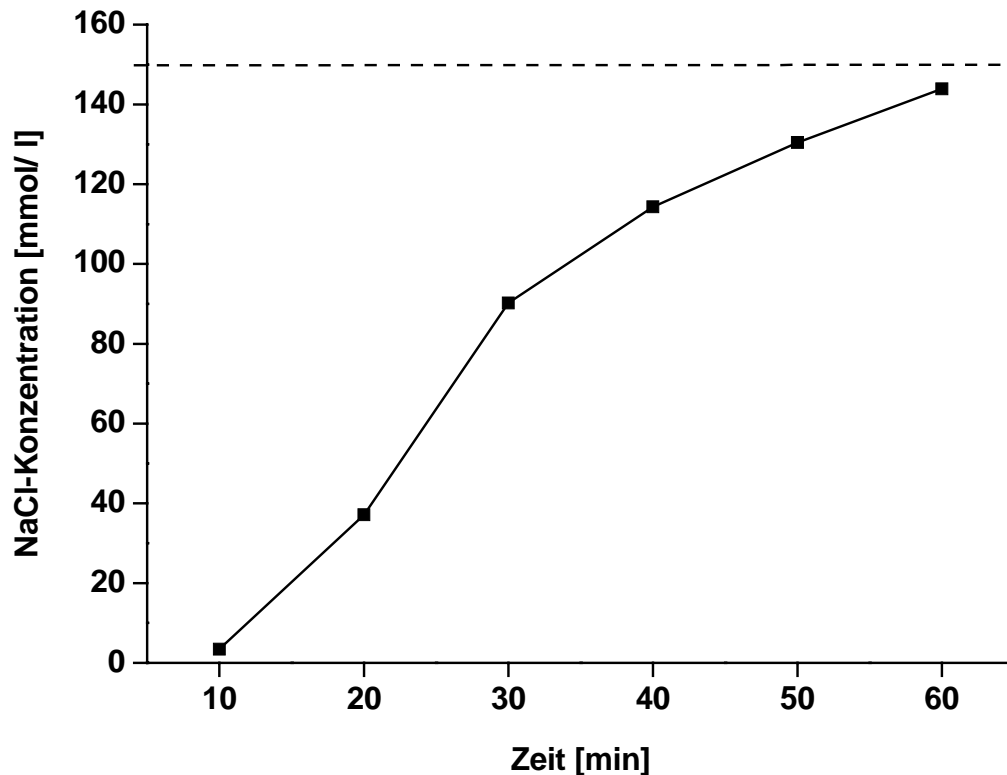


Abb. 4.7: Ermittlung der Vorlaufzeit der Kammern mit 0,85 %-iger NaCl-Lösung als Superfusionsmedium. Nach einer Vorlaufzeit von ungefähr 60 min lag die Konzentration bei ungefähr 150 mmol/ l und das Kammervolumen war mit der NaCl-Lösung gesättigt.

4.2.7 Superfusion

Die Superfusion erfolgte mit zwei Superfusionspumpen (Braun, Melsungen) mit einer Förderrate von 7 μ l/ min. In einer Pumpe konnten 10 Spritzen eingespannt werden,

so dass 20 Kammern simultan superfundiert werden konnten. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4.8 dargestellt.

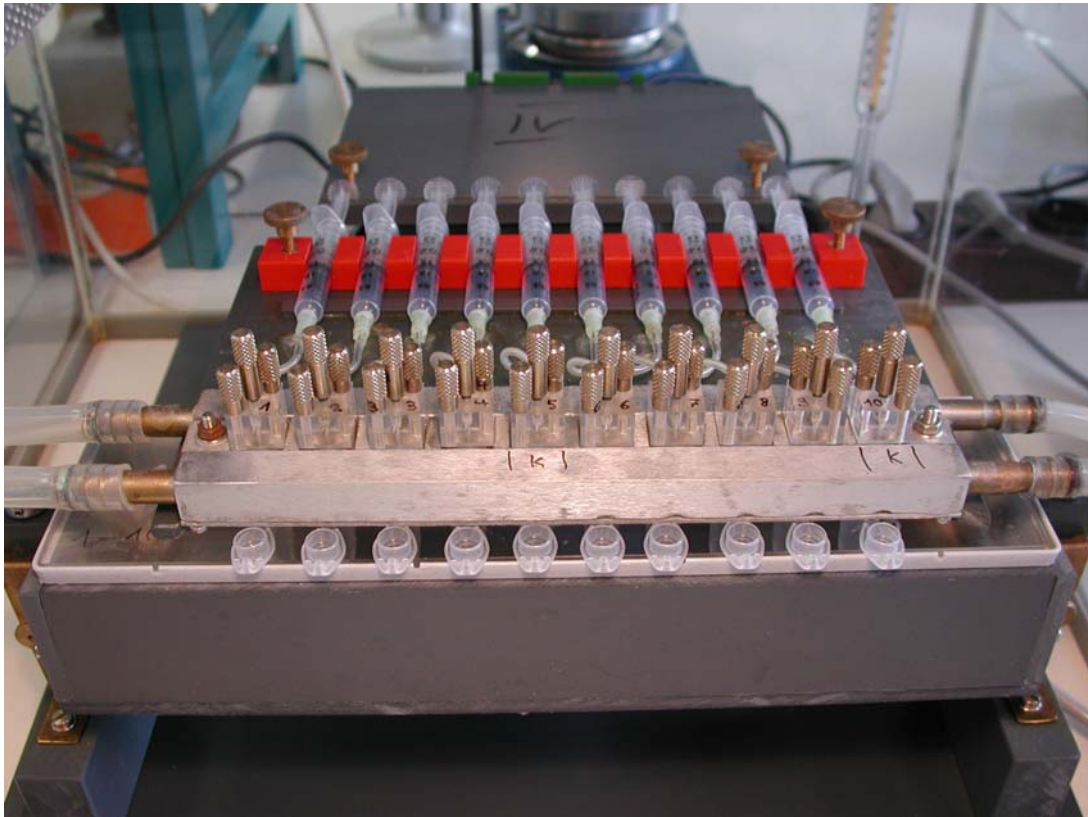


Abb. 4.8: Versuchsaufbau der Superfusionsapparatur für die isolierten juxtaglomerulären Zellen. Dargestellt ist die Superfusionspumpe mit montiertem Aluminiumheizblock und den darin befindlichen Kammern, welche mit den in die Pumpe eingespannten Spritzen verbunden sind. Der Heizblock wird auf 37°C temperiert. Unterhalb des Aluminiumblocks wird in den auf Eis gelagerten Eppendorfgläsern das jeweilige Effluat gesammelt. Um den Aufbau befindet sich eine beheizte Plexiglasbox, um die Zellen in den Kammern und die Superfusionslösung in den Spritzen auf gleichmäßiger Temperatur zu halten.

Als Superfusionsmedium wurde ein modifizierter Ringer-Bicarbonatpuffer verwendet (Puffer 2, siehe 3.5.3). Dieser wurde vor Versuchsbeginn für ungefähr eine Stunde bei 37°C in einem doppelwandigen Inkubationsgefäß mit Carbogen begast, um den pH-Wert der Lösung von ca. 8,0 auf 7,4 einzustellen. Dieser Puffer diente als Kontrollmedium. Die zu untersuchenden Substanzen wurden dem Kontrollpuffer in der entsprechenden Konzentration zugesetzt, wobei dem Dopamin und den anderen

empfindlichen Substanzen Ascorbinsäure in einer Konzentration von 0,1 % hinzugefügt wurde.

In jedes Unterteil der Superfusionskammern wurde mit Hilfe einer Pipette (Eppendorf, Hamburg) und silikonisierten Pipettenspitzen (Greiner bio-one, Frickenhausen) 50 µl der äquilibrierten Zellsuspension gefüllt. Die Zellsuspension wurde dabei unter vorsichtigem Schütteln resuspendiert, um die Zellen möglichst gleichmäßig auf die 20 Kammern zu verteilen. Die Kammeroberteile wurden aufgesetzt und beide Teile mit zwei Schrauben fixiert. Anschließend wurden die Kammern mit Kontrollpuffer aufgefüllt, entlüftet und dicht verschlossen. Danach wurden die Kammern über die Polyethylenschläuche an die Superfusionsspritzen angeschlossen und die Superfusion gestartet.

Die Effluat wurden in auf Eis gelagerten Eppendorfgläsern aufgefangen und in 10 bis 20 min Intervallen abgenommen. Bis zur Bestimmung der Reninaktivität wurden die Proben bei -20°C gelagert.

4.2.8 Bestimmung der Reninrestaktivität auf den Filtern

Nach der Superfusion wurden die Pumpen abgeschaltet und die Superfusionsspritzen von den Kammern getrennt. Anschließend wurden die Schrauben gelöst und die beiden Kammerteile geöffnet. Aus dem Unterteil wurden mit einer Pinzette die Filter entnommen und auf ein Zellstoffpapier gelegt, um den restlichen Superfusionspuffer aufzusaugen. Die Filter wurden dann in mit 200 µl Triton X-100/ PBS gefüllten Eppendorfgläsern überführt, ungefähr 1 min geschüttelt und zusammen mit den Efluat bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Durch die Reninrestaktivität konnte man, unter Berücksichtigung der superfundierten Substanzen, auf die Gleichmäßigkeit der Kammerbefüllung rückschließen.

4.2.9 Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zellsuspension, welche für die Superfusion herangezogen wurde, erfolgte mit der Methode nach LOWRY (1951). Folgende Lösungen wurden benötigt:

- Lösung 1: 2 % Na_2CO_3 (188 mM) in 0,1 N NaOH
- Lösung 2: 1 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (40 mM) in Aqua demin.
- Lösung 3: 2 % Kalium-Natriumtartrat $\times 4 \text{H}_2\text{O}$ (71 mM) in Aqua demin.
- Lösung 4: 49 ml Lösung 1 + je 0,5 ml Lösung 2 und 3
- Lösung 5: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz mit Aqua demin 1+1 verdünnt

Dazu wurden jeweils 4 x 50 μl der Zellsuspension in Polyethylengefäßen gesammelt und 1 min lang bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und zu jeweils 100 μl in einem Eppendorfgefäß gesammelt, Puffer 5 hinzugefügt und wie oben beschrieben aufbewahrt. Zu den Pellets wurden jeweils 100 μl 1 N NaOH zugegeben und so lange geschüttelt, bis die Zellen resuspendiert waren. Für die nachfolgende Proteinbestimmung wurden je 20 μl aus 2 verschiedenen Aliquoten entnommen.

Zu den 20 μl Probe wurden jeweils 80 μl 1 N NaOH, 100 μl Aqua demin. und 1,0 ml Lösung 4 gegeben und gut geschüttelt. 10 min später wurden jeweils 100 μl Lösung 5 zugegeben und anschließend durchmischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 630 nm im Photometer gemessen.

Anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes, nach welchem die Extinktion zur Konzentration proportional ist, wurde mittels einer Standardkurve die Proteinkonzentration ermittelt. Als Standard diente eine Albuminlösung (1 mg BSA/ml Aqua demin.) in den Konzentrationen von 10, 20, 50 und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Albumin.

Die Proteinbestimmung nach Lowry basiert auf zwei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt wird in alkalischer Lösung ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet (Biuretreaktion – Nachweis der Peptidbindung). Anschließend reduziert dieser Komplex durch anwesende Tyrosin- und/ oder Tryptophanreste die Phosphormolybdän-

Phosphorwolframsäure (Folin-Ciocalteus Reagenz), wobei eine intensive Blaufärbung entsteht. Dieses Reagenz ist nur in saurem Milieu beständig. Die Reduktion erfolgt jedoch bei einem pH-Wert von 10. Nach Zusatz des Folin Reagenzes zur alkalischen Kupfer-Protein-Lösung muß sofort kräftig gemischt werden, damit die Reduktion vor der Zersetzung des Folin Reagenzes stattfindet.

4.2.10 Gewinnung von Angiotensinogen

Um die Reninaktivität mittels Radioimmunoassay bestimmen zu können, muss das Reninsubstrat Angiotensinogen gewonnen werden. Dieses wird dann einer definierten Menge der zu untersuchenden Reninprobe zugesetzt und anschließend bei 37°C 90 min lang inkubiert. Während dieser Zeit wird aus dem α_2 -Globulin Angiotensinogen, durch die Protease Renin, das Decapeptid Angiotensin I abgespalten.

Zur Gewinnung des Reninsubstrates wurden nüchterne, männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 300 g – 400 g mit einer Ketamin/ Xylazin-Narkose (45 mg/ kg Ketamin und 10 mg/ kg Xylazin) betäubt. Nachdem die Tiere narkotisiert waren, wurden sie auf einen thermostatisierten Operationstisch gelegt. Eine Rektalsonde diente der Messung der Kerntemperatur, welche konstant bei 37,2°C gehalten wurde. Die Narkosetiefe wurde durch Abwesenheit einer Schmerzreaktion und Ausbleiben des Lidreflexes gesichert. Anschließend wurde ein suprapubischer medianer Hautschnitt entlang der Linea alba durchgeführt. Die Darmschlingen wurden vorsichtig aus dem Bauchraum luxiert und auf die Seite gelegt. Beide Nieren wurden stumpf präpariert und dargestellt. Durch zwei Ligaturen wurden die Vena und Arteria renalis abgebunden und anschließend durchtrennt. Nach der bilateralen Nephrektomie wurden die Darmschlingen wieder in den Bauchraum reponiert und zuerst die Muskelschicht und danach die Hautschichten mit jeweils ungefähr 12 Einzelstichen verschlossen. Die Tiere wurden zurück in die Käfige gelegt und bis zum Aufwachen mit einer Rotlicht-Lampe bestrahlt, um Auskühlung zu vermeiden. Die Tiere hatten nach der Operation freien Zugang zu Wasser und Futter. In den folgenden 24 h wurde in dem Raum, in welchem die Tiere

gehalten wurden, das Licht angeschaltet belassen, damit die nachtaktiven Ratten in ihrer Ruhephase verbleiben. Während dieser Zeit akkumulierte Angiotensinogen, welches aufgrund der fehlenden Nieren und damit des fehlenden Renins nicht in AT I umgewandelt wurde.

Nach diesen 24 h wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet, anschließend dekapitiert und das Blut in auf Eis gelagerten Bechergläsern, in welchen ein EDTA/TRIS-Puffer (siehe 3.5.3) vorgelegt war, aufgefangen. Das Blut wurde anschließend gepoolt und bei 3 000 rpm 15 min lang zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde ein Dialyseschlauch (Visking[®] dialysis tubing 27/ 32, Serva, Heidelberg) in Aqua demin. 10 min lang vorgequollen. Nach der Zentrifugation wurde das Plasma in den Dialyseschlauch gefüllt und anschließend 24 h lang gegen Maleatpuffer (Puffer 4, siehe 3.5.3) dialysiert. Bei diesem Vorgang wurde das osmotische Gleichgewicht zwischen dem im Dialyseschlauch befindlichen Plasma und dem Maleatpuffer eingestellt, wobei sämtliche Flüssigkeit, welche nicht durch die Plasmaproteine - u.a. Angiotensinogen - zurückgehalten wurde, in den umgebenden Puffer diffundierte.

Nach den 24 h wurde das Plasma über Mull filtriert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Zur Bestimmung der idealen Verdünnung des Substrates wurde dieses in unterschiedlichen Konzentrationen mit Maleatpuffer verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden Doppelproben pipettiert, wobei zu einer der beiden Proben ein reninreicher Überstand gegeben und anschließend 90 min lang bei 37°C inkubiert wurde, während die andere Probe lediglich bei 4°C inkubiert wurde. Danach wurden die Proben, wie unter 5.5.1 beschrieben, gemessen.

Aus den Reninaktivitäten der 37°C und der 4°C Werte wurde die Differenz ermittelt. Die Verdünnung, bei welcher die Differenz am größten war, wurde für die folgenden Experimente verwendet.

5. ANALYTIK

5.1 Analyse der Proben aus den Stoffwechselläufig- und den chronischen NaCl-Beladungsexperimenten

5.1.1. Bestimmung der Na⁺- und K⁺-Konzentration im Plasma und Urin

Die Kationen Na⁺ und K⁺ wurden mit Hilfe eines Flammenphotometers (Flammenphotometer ELEX 6361, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Dazu wurden jeweils 10 µl der zu untersuchenden Urinproben zu 2 ml einer Lithiumlösung (Standard Lithiumlösung, Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Die Gefäße wurden anschließend verschlossen und geschüttelt. Bei den Plasmaproben wurden 10 µl Plasma in 1 ml der Lithiumlösung pipettiert und danach sorgfältig geschüttelt. Des Weiteren wurden jeweils Standardlösungen für die Urinproben (200 mmol/l Na⁺, 200 mmol/l K⁺) und die Plasmaproben (130 mmol/l Na⁺, 130 mmol/l K⁺) hergestellt. Mit den Standards wurde das Flammenphotometer kalibriert. Eine 150 mM NaCl-Lösung diente zur Überprüfung der Kalibrierung. Die Proben mussten ggf. 1+1 mit Aqua demin. verdünnt werden, falls sie außerhalb des kalibrierten Bereiches lagen.

5.1.2. Bestimmung von Cl⁻ im Plasma und Urin

Die Bestimmung von Cl⁻ im Plasma und Urin erfolgte coulometrisch mit Hilfe eines Chloridmeters (Chloridmeter 6610, Eppendorf, Hamburg). Dabei werden von einer Silberanode Ag⁺-Kationen freigesetzt. Diese reagieren mit den Cl⁻ Anionen in der Lösung und fallen als AgCl-Niederschlag aus. Das bei der Oxidation des Ag⁰ zum Ag⁺ freiwerdende Elektron wird detektiert. Zur Messung wurden jeweils 50 µl des zu bestimmenden Plasmas oder Urins in eine Analysenlösung gegeben. Diese bestand aus 15 ml einer 92,4 mM HNO₃/ 1,02 M Essigsäurelösung und 1 ml einer Gelatinelösung (Gelatinelösung 0030 303.008, Eppendorf, Hamburg). Zur Überprüfung der Geräteeinstellungen wurden vor der Messung 50 µl einer Standardlösung mit 100 mmol/l KCl in die Messlösung pipettiert. Zur Messung der Proben wurden dann jeweils 50 µl in die Analysenlösung gegeben. Lagen die Werte der Proben außerhalb des kalibrierten Bereiches, wurden sie mit Aqua demin. 1+1 verdünnt.

5.1.3 Messung der Osmolalität der Plasma- und Urinproben

Die Osmolalität der Plasma- und Urinproben wurde über die Gefrierpunktserniedrigung gemessen (Osmomat O 30, Cryoscopic Osmometer Gonotec GmbH, Berlin). Da sowohl die Osmolalität als auch die Gefrierpunktserniedrigung kolligative Eigenschaften sind, hängen diese proportional zusammen. Für die Messung wurde das Gerät mit jeweils 500 µl Standardlösung mit den Konzentrationen 300, 750 und 1800 mosmol/ kg und Aqua demin. kalibriert. Anschließend erfolgte die Messung der Proben. Es wurde jeweils der Mittelwert aus zwei Messungen ermittelt.

5.1.4 Bestimmung der somatischen Charakteristika und Blutprobengewinnung von Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Nach dem die Mäuse bis zum Alter von 3 bzw. 11 Monaten, 6 Wochen bzw. 6 Monate, auf Niedrig-, Normal- oder Hochsalzdiät gehalten worden waren, wurden sie zunächst gewogen (Sauter ASE, Sauter, Engen) mit Diethylether (Roth, Karlsruhe) narkotisiert und anschließend durch Herzpunktion getötet. Dabei wurde mittels Hämatokritkapillaren Blut gesammelt und wie unter 5.1.5 beschrieben verfahren. Des Weiteren wurden ca. 500 µl Blut in heparinisierte Eppendorfgefäße gefüllt, sofort 4 min lang bei 12 000 x g zentrifugiert, das Plasma abgenommen und für weitere Untersuchungen bei -20°C eingefroren.

Im Anschluß daran wurden die Nieren entnommen, dekapsuliert, das Nierenfeuchtgewicht bestimmt, mit einer speziell hierfür gefertigten Zange gequetscht und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Bestimmung des Dopamingehaltes im Nierengewebe (siehe 5.3) wurden die Nieren bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Zuletzt wurde das Herz entfernt und das Feuchtgewicht bestimmt.

5.1.5 Hämatokrit

Zur Bestimmung des Hämatokrits wurde jeweils eine Glaskapillare (Mikrohämatokritkapillaren 75 µl, Brand GmbH&CO, Wertheim) mit ungefähr 50 µl Blut gefüllt und mit Versiegelungskit (Hämatokrit Versiegelungskit, Brand, Wertheim) verschlossen. Die Kapillaren wurden anschließend bei 13 000 x g 4 min lang zentrifugiert. Danach konnte der Hämatokrit als prozentualer Anteil der korpuskulären Bestandteile des Gesamtblutvolumens, durch Anlegen der Kapillare an eine Schablone direkt abgelesen werden.

5.2 Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate mit Hilfe der Kreatinin-Clearance

Die Analyse von Kreatinin im Urin und Plasma wurde modifiziert nach Thienpont et al. (1995) durchgeführt. Die dort vorgestellte Methode wurde für menschliches Plasma entwickelt. Der dabei vorgeschlagene interne Standard Thymin konnte nicht verwendet werden, da die Substanz im Urin von Mäusen physiologisch vorhanden ist, was durch Spiken der jeweiligen Proben mit Thymin-Standard nachgewiesen wurde. Da aber keine aufwendigen Extraktionsschritte notwendig waren, wurde auf den internen Standard verzichtet und die Chromatogramme mit externen Kreatinin-Standards ausgewertet. Kreatinin im Plasma und Urin wurde durch Spiken der Proben mit Kreatinin-Standard, eindeutig identifiziert.

Zum Aufbau der Anlage siehe 3.2. Für jede Messung wurden 60 µl Probe automatisch injiziert. Die Detektion erfolgte photometrisch und die Steuerung der Anlage, sowie die Auswertung erfolgte über die Software Peaksimple (SRI Inc., Indianapolis, IN, USA). Als mobile Phase wurde ein Gradient von Laufmittel A und Laufmittel B (siehe 3.5.2) verwendet. Die Flussrate lag bei 1,0 ml/ min und der Druck zwischen 14 und 16 MPa.

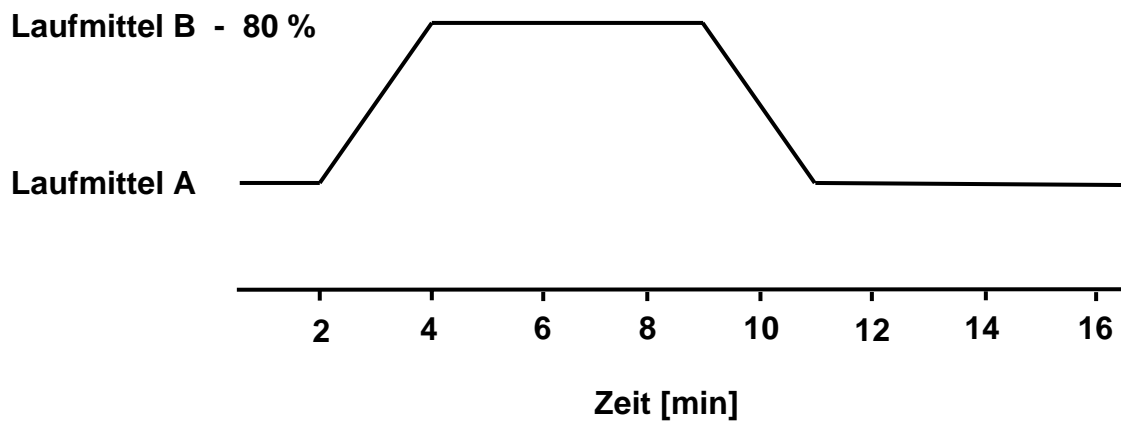


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Gradienten aus Laufmittel A und B. Zu Beginn wird 100 % Laufmittel A verwendet. Nach 2 min wird über einen Zeitraum von 2 min Laufmittel A gegen Laufmittel B ausgetauscht, bis zu einem Gradienten von 20 % Laufmittel A und 80 % Laufmittel B. Nach 5 Minuten wird die Zumischung von Laufmittel A wieder bis auf 100 % erhöht.

Die Plasmaproben wurden aufgetaut und in Filtereinheiten (Vivaspin 500 µl, Vivascience AG, Hannover) überführt, welche Proteine und sonstige Plasmabestandteile, die größer als 5 000 Dalton waren, zurückhielten. Diese Filtereinheiten wurden dann für 1 h bei 15 000 g zentrifugiert (Zentrifuge 5412, Eppendorf, Hamburg). Das dabei erhaltene Filtrat wurde in Polyethylenvials (Polyethylenvials, Roland Vetter, Ammerbuch) gefüllt und in den Autoinjektor gestellt.

Die Urinproben wurden aufgetaut, 1+19 mit H₂O verdünnt, in die Polyethylenvials gefüllt und in den Autoinjektor gestellt.

5.3 Bestimmung von Dopamin im Urin, Plasma und Nierengewebe

Zur Gewinnung der Urin- bzw. Plasmaproben siehe 4.1.2.4 und 4.1.2.5. Die Analysen wurden auf zwei verschiedenen HPLC-Anlagen durchgeführt, wobei die Anlage für die Bestimmung von Dopamin (DA) im Urin und im Nierengewebe, im Folgenden als „Makro-HPLC“, und die für die Bestimmung von DA im Plasma, als „Mikro-HPLC“ bezeichnet wird.

Die Katecholamine wurden elektrochemisch durch Oxidation in das entsprechende Ortho-Chinon umgewandelt und dabei von der elektrochemischen Messzelle detektiert. Der daraus entstehende Stromfluss, welcher proportional zur Konzentration der jeweiligen Katecholamine war, wurde in der Messzelle elektronisch verstärkt, wobei die Selektivität durch das entsprechende Arbeitspotential, welches an die Messzelle angelegt wurde bestimmt werden konnte (Küster 2000), (Bauersfeld et al., 1984). In den nachfolgend beschriebenen Analysen wurde ein Potential von 0,6 V benutzt.

Die im folgenden beschriebenen Methoden wurden von (Küster 2000) durch Wiederfindungsexperimente von Dopamin qualifiziert und validiert.

5.3.1 Makro-HPLC-Anlage

Zum Aufbau der Anlage siehe 3.2. Von jeder Probe wurden 30 µl automatisch in die Anlage injiziert. Die Detektion erfolgte elektrochemisch und die Steuerung der Anlage, sowie die Auswertung erfolgte über die Software Axxi-Chrom 737 (Axxiom Chromatography, Calabasus, USA). Als Mobile Phase wurde das „Laufmittel für die Makro-HPLC“ verwendet (siehe 3.5.1). Die Flussrate lag bei 1,0 ml/ min und der Druck bei ungefähr 11 bis 12 MPa. Das Elektrodenpotential des Detektors lag bei 0,6 V, der Offset bei ~ 150 nA, der Filter bei 15 s.

5.3.1.1 Extraktion und Bestimmung von Dopamin in den Urinproben

Zur Messung wurden die Urinproben langsam aufgetaut, durch Vortexen gemischt und sofort auf Eis gestellt. Von den Proben wurden jeweils 2 Aliquote von 500 µl, bei geringer Urinausscheidung 250 µl, entnommen und in neue Eppendorfgefäße überführt. Zusammen mit den Proben wurden 2 Standardproben mit definierten Mengen an Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin (100 ng/ ml) nach dem gleichen Verfahren extrahiert. Zu den Doppelproben wurden jeweils 50 µl DHBA (3,4-

Dihydroxybenzylamin, Sigma, Taufkirchen) als interner Standard, sowie 1 ml vorgekühlter TRIS-Puffer (siehe 3.5.1) pipettiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 2 N NaOH-Lösung auf einen Wert von 8,6 eingestellt. Jeder Probe wurden danach 100 mg Aluminiumoxid zugefügt, welches zuvor über 4 h bei 200°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend abgekühlt wurde. Dabei sollte das evtl. an das Al₂O₃ gebundene Wasser, welches die Extraktion behindert hätte, entfernt werden.

Bei einem pH-Wert von 8,6 können die Katecholamine an das Al₂O₃ adsorbiert werden. Diese Dispersion wurde anschließend 10 min lang auf einem Schüttler (IKA-Vibrax Schüttler) bei einer Rate von 1 400 rpm geschüttelt, danach 10 min lang bei 15 000 x g abzentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge 12 - 24, Hettich, Tuttlingen) und der Überstand verworfen. Im folgenden Waschschrift wurde den Proben jeweils 1 ml vorgekühltes Aqua demin. zugesetzt und wie oben beschrieben 10 min lang geschüttelt und dann abzentrifugiert. Bei einem weiteren Waschschrift wurde das Al₂O₃ mit jeweils 1 ml Aqua demin. in spezielle Extraktionssäulen auf Cellulosefilter (Poröse Platten aus PTFE 10 µ, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg) überführt. Die Säulen wurden unten verschlossen und für 10 min bei 1 400 rpm geschüttelt. Danach wurden die Säulen unten wieder geöffnet und 10 min lang bei 1 000 x g zentrifugiert (Rotaxia/ K, Hettich, Tuttlingen). Das erhaltene Filtrat wurde verworfen. Anschließend wurden die Extraktionssäulen unten wieder verschlossen und zu dem Aluminiumoxid 300 µl vorgekühlte 0,1 M H₃PO₄ hinzugefügt und die Proben 10 min auf dem Schüttler gemischt. Die Katecholamine wurden bei diesem pH-Wert vom Aluminiumoxid eluiert. Danach wurden die Säulen unten geöffnet und so in Polyethylenvials (Roland Vetter, Ammerbuch) gestellt, dass das Zentrifugat bei der anschließenden 10-minütigen Zentrifugation - bei 1 000 x g - erhaltene Filtrat, in die Vials floss. Diese wurden dann verbördelt und in den vorgekühlten Probensamplern (S 5200 Sample Injector, Sykam, Fürstfeldbruck) gestellt. 30 µl des Efluates wurden vom Autoinjektor in die HPLC-Anlage injiziert und gemessen. Die frisch extrahierten Proben konnten bei 4°C bis zu 24 h ohne Verluste aufbewahrt werden.

5.3.1.2 Extraktion und Bestimmung von Dopamin im Nierengewebe

Um Dopamin aus dem Gewebe zu isolieren, wurden die Nieren in flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert. Die Gewebestücke wurden anschließend mit dem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Dem Homogenisat wurden 2 ml einer 4 %-igen eisgekühlten Sulfosalicylsäure zugegeben um die Proteine zu fällen. Der Mischung wurde entsprechend dem Nierengewicht DHBA als interner Standard in der Konzentration zugegeben, dass sich pro 1 g Nierengewicht 1 ng DHBA in der Lösung befand. Diese wurde anschließend 10 Minuten lang bei 4 000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden je Probe 500 µl abgenommen und diese dann entsprechend wie die Urinproben extrahiert (5.3.1.1).

5.3.2 Mikro-HPLC-Anlage

Die Mikro-HPLC bestand aus einer Hochdruckpumpe (S 1100 Micro Pumpenkopf, Sykam, Fürstenfeldbruck) mit einem zusätzlichen Pulsationsdämpfer, einem elektrochemischen Detektor (EP 30, Biometra, Fürstenfeldbruck) und einer Glas Carbon Elektrode (ANTEC Micro VT-03, Analytical Technology, Leiden, Niederlande) mit einem 25 µm Spacer. Die Proben wurden von Hand mit Hilfe einer Hamilton Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) über ein Ventil (9725 VS, Rheodyne, Cotati, USA) und eine Probenschleife mit einem Volumen von 20 µl injiziert. Die Trennung der Katecholamine erfolgte mit einer C-18 reversed Phase Säule (GROM-SIL 120 ODS-4, 3 µ, 75 x 1 mm, Grom, Herrenberg), welche mit einer ANTEC Elektrode (Analytical Technology, Leiden, Niederlande) in einem Faraday'schen Käfig gelagert war, um externe elektrische Interferenzen und Temperaturschwankungen auszuschließen. Die Steuerung der Anlage und die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Axxi-Chrom 737. Als Mobile Phase wurde die unter 3.5.1 beschriebene Lösung, mit einer Flussrate von 0,25 ml/ min verwendet. Der Druck während der Analyse lag zwischen 9 und 11 MPa. Das Elektrodenpotential des Detektors lag bei 0,6 V, der Offset bei 0,05-0,1 nA, der Filter bei 15 s.

5.3.2.1 Extraktion und Bestimmung von Dopamin in den Plasmaproben

Das Aluminiumoxid wurde wie oben beschrieben vor jedem Versuch getrocknet. Für die Quantifizierung des Dopamins wurden den Plasmaproben 30 µl einer 0,5 ng/ml Epininstammlösung als interner Standard hinzugefügt und dann gemischt. Der pH-Wert wurde anschließend mit TRIS-Puffer auf 8,6 eingestellt. Daraufhin wurden 4 mg Al₂O₃ hinzugefügt. Die Proben wurden danach 10 Minuten lang bei 1 400 rpm geschüttelt. Während dieser Zeit wurde das freie Dopamin an das Al₂O₃ adsorbiert. Im Anschluss daran wurden die Proben 4 mal mit 1 ml Aqua demin. gewaschen und das Dopamin mit 34 µl des Elutionsmittels (0,2 M HClO₄/ 0,4 M H₃BO₃) versetzt. Die Lösung wurde 5 Minuten bei 1 400 rpm geschüttelt. Dabei wurde das Dopamin vom Al₂O₃ eluiert. Im Anschluss daran wurden die Proben 10 Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei –20°C bis zur Injektion eingefroren. Mit Hilfe einer Hamilton Spritze wurden 27 µl in die HPLC-Anlage injiziert.

5.4 Bestimmung der Aldosteronkonzentration im Plasma

Um die Aldosteronkonzentration im Plasma der Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse zu bestimmen, wurden die Tiere 6 Wochen bzw. 6 Monate auf Niedrig-, Normal- oder Hochsalzdiät gehalten. Als die Tiere im Alter von 3 bzw. 11 Monaten waren, wurden sie mit Diethylether betäubt und Blut über die retroorbitale Vene abgenommen. Die Proben wurden abzentrifugiert, das Plasma abgenommen und bei –20°C bis zur Analyse gelagert.

Die Plasmaaldosteronkonzentration wurde mit Hilfe eines handelsüblichen Radioimmunoassays (Aldosteron Radioimmunoassay Kit No. 1664, Immunotech, Marseilles, Frankreich) bestimmt.

5.5 Bestimmung der Plasmapreninaktivität

Zur Bestimmung der Plasmapreninaktivität der Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse wurde bei 3 und 11 Monate alte Tieren, welche auf Niedrig-, Normal- oder Hochsalzdiät gehalten wurden, Blut über die retroorbitale Vene abgenommen und sofort im HEPES/ TRIS-Puffer (siehe 3.5) aufgenommen. Die Proben wurden sofort abzentrifugiert und bis zur Analyse bei –20°C gelagert. Für die Bestimmung der Plasmapreninaktivität wurden die Plasmaproben 1+39 mit Maleatpuffer (siehe 3.5.3) verdünnt. Danach wurden die Proben wie unter 5.5.1 beschrieben, behandelt.

5.5.1 Bestimmung der Reninaktivität mittels Radioimmunoassay (RIA)

Das Prinzip eines Radioimmunoassays beruht auf der Bindung eines radioaktiv markierten Antigens (Tracer) und des zu bestimmenden Antigens an einen spezifischen Antikörper (Antigen-Antikörper-Reaktion). Dabei konkurriert der Tracer mit dem Antigen um die Bindungsstellen am Antikörper.

Die Bestimmung der Reninaktivität erfolgte mit einem spezifischen RIA für Angiotensin I, dem Produkt des Renins bei der Umsetzung von Angiotensinogen (Albinus et al. 1998). Dieses wurde aus dem Plasma von bilateral nephrektomierten Ratten, wie oben beschrieben, gewonnen (siehe 4.2.10). 4 µl des Substrates und 10 µl einer Proteaseinhibitorlösung (siehe 3.5.3) wurden in Polystyrolröhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) zusammen mit 10 µl der zu analysierenden Probe gefüllt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Ein Ansatz wurde anschließend 90 min lang bei 37°C im Wasserbad (Julabo SW – 20 C, Bachofer, Reutlingen) inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt die enzymatische Umsetzung von Angiotensinogen durch Renin in Angiotensin I (AT I). Dabei wurde umso mehr Angiotensin I gebildet, je mehr Renin in der Probe vorlag. Ein zweiter Ansatz wurde bei 4°C gelagert. Bei dieser Temperatur fand die Umsetzung nicht oder nur in einem sehr geringen Ausmaß statt. Die 4°C Werte wurden bei der Auswertung von den 37°C Werten als Hintergrund abgezogen.

Die enzymatische Reaktion bei 37°C wurde nach 90 min im Eisbad gestoppt. Zu den Proben wurde anschließend 80 µl ¹²⁵Iod-markiertes Angiotensin I, welches in Puffer 3 bis zu einer Konzentration von 1 µCi/ 40 ml verdünnt wurde, gegeben. Danach wurde ein spezifischer Angiotensin I – Antikörper, welcher 1:60 000 in Puffer 3 (siehe 3.5.3) verdünnt wurde, zu den Proben pipettiert. Der Antikörper wurde aus Kaninchenserum von Herrn Prof. Dr. E. Hackenthal, Heidelberg gewonnen. Danach wurden sämtliche Proben geschüttelt und anschließend 18 h lang bei 4°C äquilibriert. Während dieser Zeit konkurrierten das ¹²⁵I-Angiotensin I mit dem enzymatisch gebildeten Angiotensin I um die Bindungsstellen am Antikörper, welcher in einer definierten Menge im Unterschuß vorlag.

Die Trennung des gebundenen Anteils des AT I und des ¹²⁵I-AT I vom ungebundenen erfolgt mit Hilfe von gecoateter Kohle (Norit A, Serva, Heidelberg). Dabei wurden 100 µl der Charcoal-Suspension (siehe 3.5.3) zu den Proben pipettiert, anschließend 10 min bei 4°C inkubiert und danach 10 min lang bei 4°C und 1 500 x g zentrifugiert. Durch das Coaten der Kohle mit dem α-Globulin verbleibt der Antigen-Antikörper-Komplex im Überstand, während sich die nicht gebundenen Anteile im Pellet befinden. Vom Überstand wurden 230 µl in Polystyrolröhrchen pipettiert und im γ-Counter (Cobra Auto-Gamma, Canberra Packard, Frankfurt) gemessen. Eine hohe Reninaktivität im Efluat führt zu mehr AT I, welches nun mehr ¹²⁵I-AT I aus der Antikörperbindung verdrängt. Als Folge davon ist die gemessene Aktivität (in cpm) im Überstand kleiner.

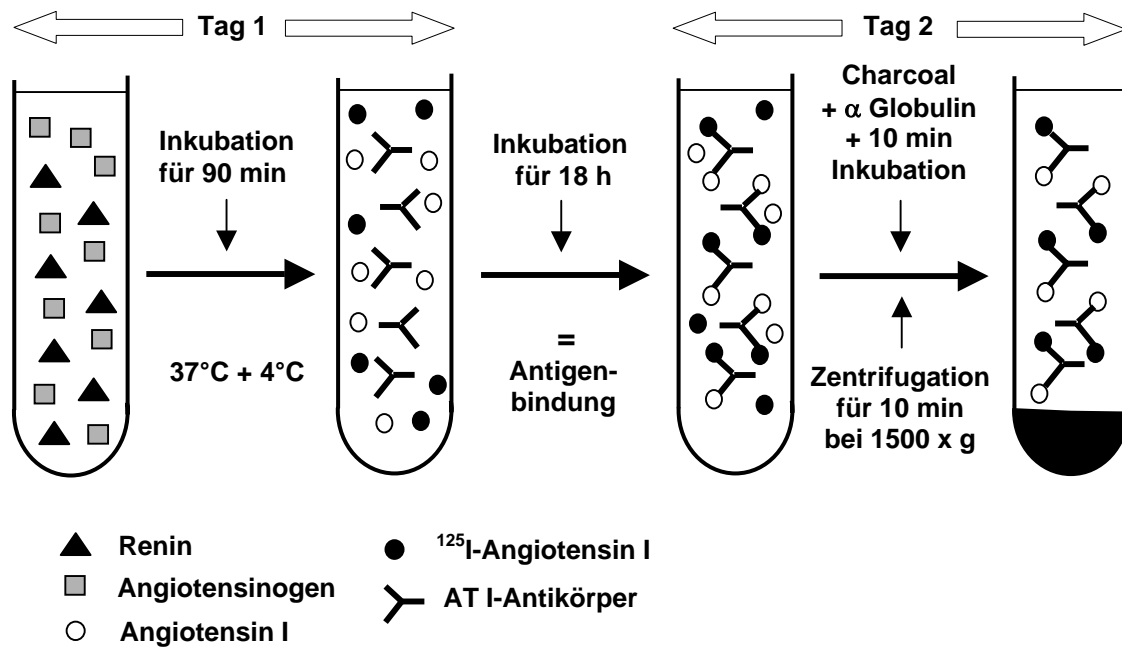


Abb. 5.2: Schematische Darstellung des Renin Radioimmunoassays (siehe 5.5.1). Am 1. Tag wurden die Proben zusammen mit dem Substrat und dem Proteaseinhibitor bei 4°C und 37°C für 90 min inkubiert. Anschließend wurden Tracer und Antikörper hinzugefügt und der Ansatz mindestens 18 h lang bei 4°C inkubiert. Während dieser Zeit fand die Antigen-Antikörperbindung statt. Am 2. Tag wurde die gecoatete Charcoal zugegeben, inkubiert, abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde anschließend im γ -Counter gemessen.

6. BERECHNUNGEN UND STATISTIK

6.1 Berechnung der Natrium- und Kaliumurinausscheidung ($U_{Na}V$ und U_KV)

Die Berechnung der Natrium- und Kaliumurinausscheidung ($U_{Na}V$ und U_KV) eines 24 h-Stoffwechselfähigkeitsversuches erfolgte nach der Formel:

$$U_{Na}V = \frac{[Na^+]_{Urin} \times UV}{KG} \times 100$$

$U_{Na}V$ = Natriumurinausscheidung [$\mu\text{mol}/ (24 \text{ h} \times 100 \text{ g})$]

$[Na^+]_{Urin}$ = Natriumkonzentration im Urin [mmol/ l]

UV = Urinvolumen [ml]

KG = Körpergewicht [g]

Die Berechnung der Kalium-, der Dopaminurinausscheidung und der Chloridausscheidung im Urin erfolgte analog wie beim Natrium.

6.2 Berechnung der glomerulären Filtrationsrate

Die Berechnung der GFR erfolgte mit Hilfe der Kreatinin-Clearance nach folgender Formel:

$$GFR = \frac{[Kreatinin]_{Urin} \times UV}{[Kreatinin]_{Plasma} \times KG} \times 100$$

GFR = Glomeruläre Filtrationsrate [$\text{ml}/ (24 \text{ h} \times 100 \text{ g KG})$]

$[Kreatinin]_{Plasma}$ = Kreatininkonzentration im Plasma [$\mu\text{mol}/ \text{l}$]

$[Kreatinin]_{Urin}$ = Kreatininkonzentration im Urin [$\mu\text{mol}/ \text{l}$]

UV = Urinvolumen [ml]

KG = Körpergewicht [g]

6.3 Berechnung der Reninaktivität

Die Reninaktivität wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Reninaktivität} = \frac{(\text{AT I}_{37^{\circ}\text{C}} - \text{Blank}) - (\text{AT I}_{4^{\circ}\text{C}} - \text{Blank})}{1,5 \text{ h}} \times 2,4 \times \text{PF}$$

Reninaktivität: [ng AT I/ (ml x h x mg Protein)]

AT I_{37°C}: bei 37°C gebildete Menge Angiotensin I

AT I_{4°C}: bei 4°C gebildete Menge Angiotensin I

Blank: Menge an Angiotensin I, welche bereits im vorgelegten Substrat vorhanden war

1,5 h: 1,5 Stunden Inkubationszeit bei 37°C bzw. 4°C

2,4: durch den RIA bedingter Verdünnungsfaktor (10 µl Probe + 14 µl Substrat/ Proteaseinhibitor)

PF: Proteinfaktor

6.4 Statistik

Bei den Tierexperimenten wurden aus den jeweiligen Subgruppen die Mittelwerte gebildet. Zusätzlich wurden jeweils die SEMs (standard error of the mean) angegeben. Die statistische Bewertung erfolgte mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Posttest. Bei direkten Gruppenvergleichen wurde zur statistischen Auswertung der ungepaarte, zweiseitige Student-t-Test verwendet.

Die Reninaktivität wurde in ng Angiotensin I/ (ml x h x mg Protein) angegeben. Die Mittelwerte wurden aus den einzelnen Superfusionskammern der verschiedenen Präparationen berechnet. Die n-Zahl entsprach der Anzahl der superfundierten Kammern. Wenn mehrere Versuche zusammengefasst wurden, wurde eine zweite n-Zahl vor die erste gestellt, welche die Anzahl der Experimente angab (z.B. n=3/ 9, bedeutet, 3 Experimente mit insgesamt 9 Kammern).

Die Einzelerperimente wurden als Verlaufsdiagramm über die Zeit dargestellt, wobei die Reninaktivitäten zu den jeweiligen Zeitpunkten miteinander verglichen wurden. Dabei wurden die Mittelwerte aus den superfundierten Kammern eines Experimentes gebildet und die SEMs angegeben. Die statistischen Signifikanzen wurden in diesem Fall mit Hilfe des ungepaarten, zweiseitigen Student-t-Tests ermittelt.

Bei der Zusammenfassung der einzelnen Experimente wurden die Mittelwerte aus den Sammlerperioden zwischen 60 und 80 Minuten und die jeweiligen SEMs berechnet. Diese wurden dann mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) statistisch geprüft.

Bei beiden statistischen Modellen wurde ein Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ($p < 0,05$) als signifikant betrachtet.

7. Ergebnisse

7.1 Tierexperimenteller Teil

7.1.1 Blutdruckmessung bei wachen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Der systolische Blutdruck (SBP) wurde auf 3 verschiedenen NaCl-Diäten bei 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen bestimmt (siehe 4.1.1.4). Der Blutdruck wurde während der gesamten Versuchsdauer 3 mal pro Woche gemessen.

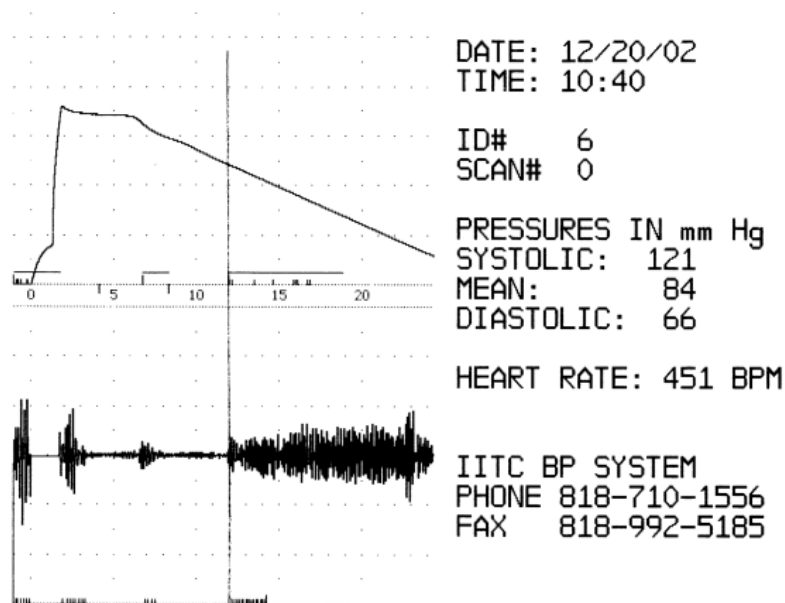


Abb. 7.1: Ausdruck einer repräsentativen Blutdruckmessung. Im oberen Teil des Diagramms ist der Druckverlauf in der Manschette, im unteren Teil die Pulskurve dargestellt. Durch Fällen eines Lots kann der Druck zusätzlich graphisch ausgewertet werden.

Abb. 7.1 zeigt den Ausdruck einer Blutdruckbestimmung. Durch das Aufpumpen der Druckmanschette, welche um den Schwanz einer Maus gelegt war, wurde die Arterie gestaut und damit das Pulssignal unterbrochen. Der Druck in der Manschette wurde anschließend langsam abgelassen. Ein Pulssignal trat zu dem Zeitpunkt auf, als der systolische Blutdruck dem Druck in der Manschette entsprach. Mit Hilfe der Amplitude des Pulssignals wurde vom Gerät der mittlere arterielle Druck (MAP) bestimmt und daraus, zusammen mit dem systolischen Wert, der diastolische ermittelt. Da der MAP bei den Schwanzdruckmessungen und damit auch die diastolischen Blutdruckwerte relativ instabil waren, sind in den vorliegenden Ergebnissen nur die systolischen Blutdruckwerte dargestellt.

7.1.1.1 Blutdruckwerte der 3 Monate alten Mäuse

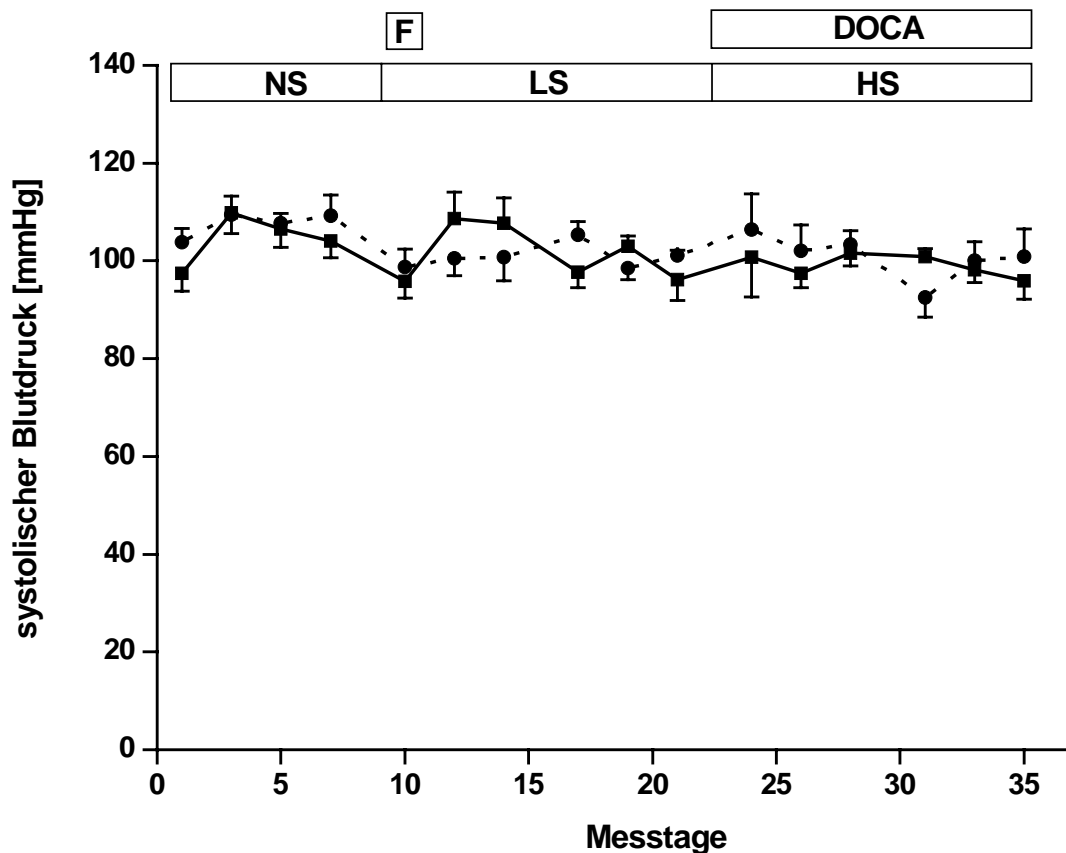


Abb. 7.2: Verlaufsdiagramm der systolischen Blutdruckwerte von **3 Monate** alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) \blacksquare ($n=6$) und (-/-) \bullet ($n=6$) Mäusen auf Normalsalzdiät (0,6 % NaCl, NS), danach auf Niedrigsalzdiät (0,2 % NaCl, LS), nach initialer Furosemid-Applikation (F), und schließlich auf Hochsalzdiät (HS, 4,6 % NaCl), zusammen mit einer täglichen Deoxycorticosteronacetat- (DOCA) Injektion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Die systolischen Blutdruckwerte der 3 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (-/-) Mäuse lagen, den gesamten Versuchszeitraum betrachtet, zwischen 92,5 und 109,5 mmHg und die der Wildtypen zwischen 95,8 und 109,8 mmHg. Während des gesamten Versuchsverlaufs zeigten sich keine großen Unterschiede zwischen den 3 Monate alten (-/-) und (+/+) Tieren des ersten Studienarms (NS-LS-HS). Weder die initiale Furosemid-Applikation noch die tägliche DOCA-Injektion verursachten bemerkenswerte Veränderungen der Blutdruckwerte zwischen den verschiedenen Salzdiäten.

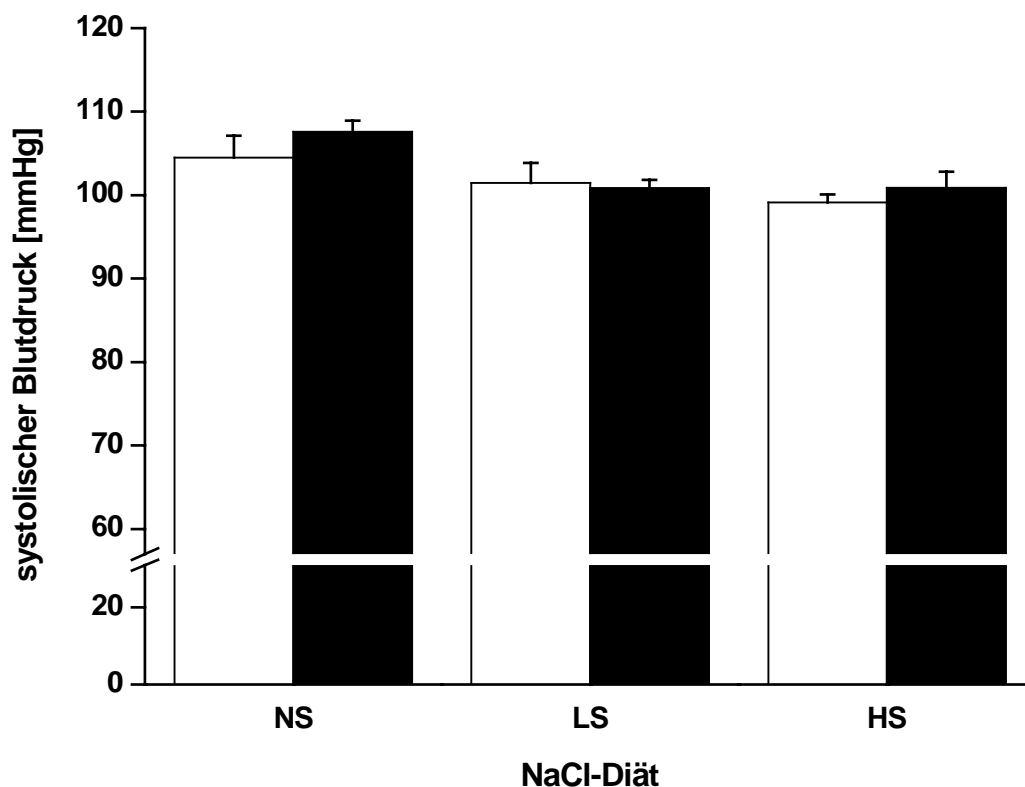


Abb. 7.3: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Verlaufsdiagramm der systolischen Blutdruckwerte des 1. Studienarmes von **3 Monate** alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) □ ($n=6$) und (-/-) ■ ($n=6$) Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte.

Das Diagramm 7.3 zeigt die gepoolten und gemittelten Blutdruckwerte der jeweiligen Diätabschnitte. Die 3 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (-/-) Mäuse des 1. Studienarmes hatten in der ersten Woche auf Normalsalzdiät einen mittleren systolischen Blutdruck von $107,6 \pm 1,3$ mmHg und die entsprechenden (+/+) Tiere von $104,5 \pm 2,6$ mmHg. Nach dem Umsetzen der Tiere von Normal- auf Nidrigsalzdiät nahmen die Blutdruckwerte bei den Knockout-Tieren um 6,3 % auf $100,8 \pm 1,0$ mmHg und bei den Wildtyp-Tieren um 2,9 % auf $101,5 \pm 2,4$ mmHg ab. Nach dem Diätwechsel von Niedrig- auf Hochsalz blieb der systolische Blutdruck der (-/-) Mäuse nahezu unverändert bei $100,9 \pm 1,9$ mmHg, während der Wert der (+/+) Tiere um weitere 2,3 % auf $99,1 \pm 0,9$ mmHg sank. Die gemittelten Werte über die jeweiligen Diätabschnitte zeigen, dass keine Blutdruckunterschiede zwischen 3 Monate alten Knockout- und Wildtyp-Mäusen des ersten Studienarmes zu erkennen waren.

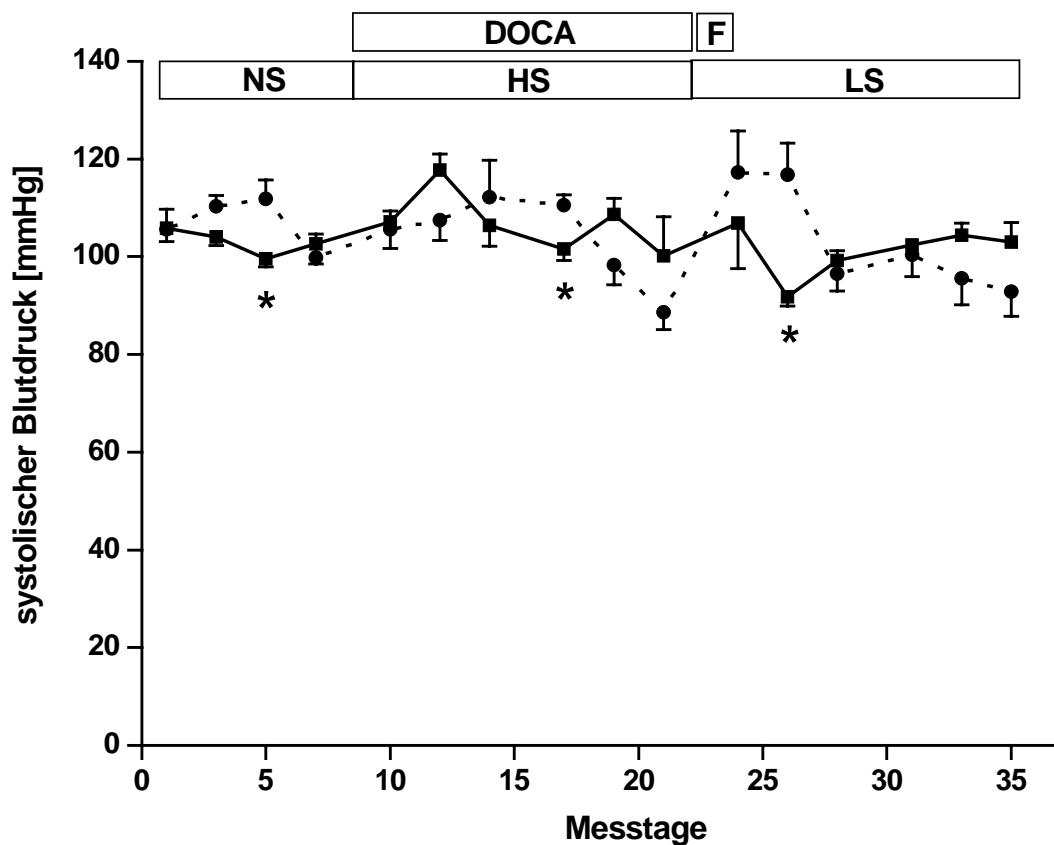


Abb. 7.4: Verlaufsdiagramm der systolischen Blutdruckwerte von **3 Monate** alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) \blacksquare (n=6) und (-/-) \bullet (n=6) Mäusen auf Normalsalz-, danach auf Hochsalz-, zusammen mit einer täglichen DOCA-Injektion, und abschließend auf Niedrigsalzdiät, nach initialer Furosemid-Applikation (F). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. *) $p < 0,05$ vs. D₃ Rezeptor (+/+).

Die systolischen Blutdruckwerte des 2. Studienarmes der 3 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) Mäuse, im Diagramm 7.4 dargestellt, lagen über den gesamten Versuchsverlauf gemittelt zwischen 88,6 und 117,2 mmHg und die der Wildtypen zwischen 91,8 und 117,7 mmHg. Zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen zeigten sich über den gesamten Versuchsverlauf keine Unterschiede. Nach dem Umsetzen von Normalsalz- auf Hochsalzdiät reagierten die Wildtypen mit einem kurzen Anstieg des Blutdruckes, welcher aber im Verlauf der Diätphase wieder sank. Die (-/-) Mäuse zeigten nach dem Umsetzen von Hochsalz- auf Niedrigsalzdiät einen Anstieg der Blutdruckwerte, welche allerdings im Verlauf des Experimentes zunächst auf das Niveau der Wildtypen und schließlich noch weiter abfielen.

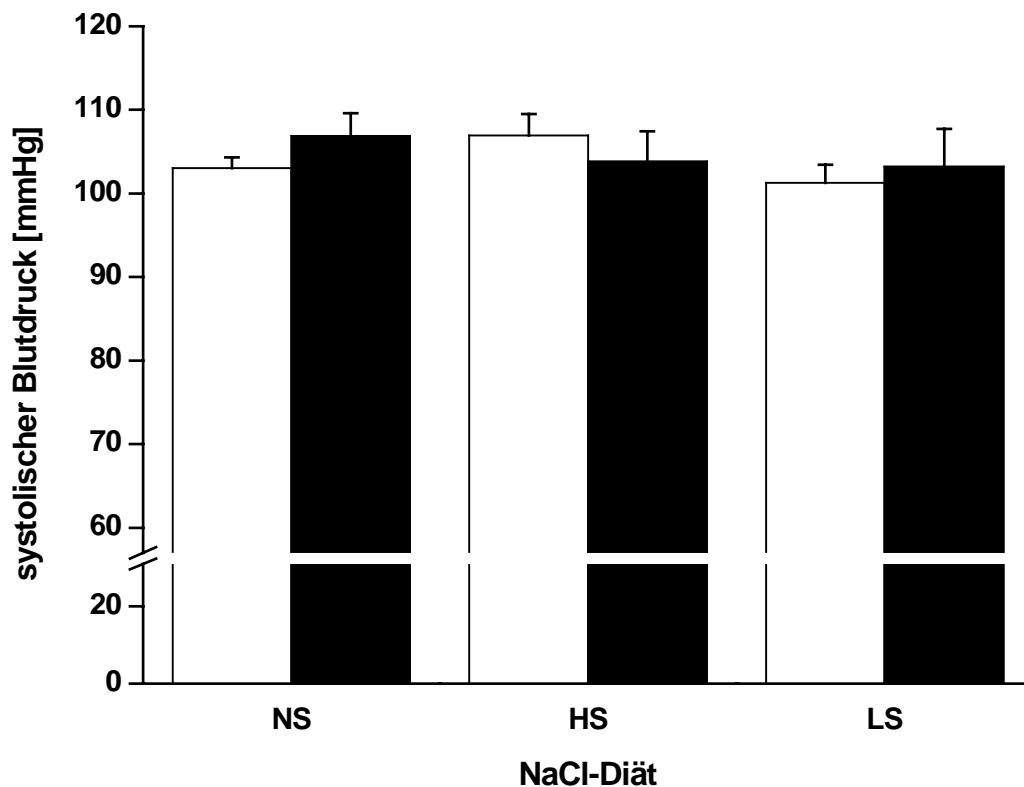


Abb. 7.5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Verlaufsdiagramm der systolischen Blutdruckwerte des 2. Studienarmes von **3 Monate** alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) □ ($n=6$) und (-/-) ■ ($n=6$) Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte.

Im Diagramm 7.5 sind die gepoolten Mittelwerte der jeweiligen Diätabschnitte des 2. Studienarmes der 3 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse dargestellt. Die Knockout-Tiere hatten auf Normalsalzdiät einen mittleren systolischen Blutdruck von $106,9 \pm 2,7$ mmHg und die korrespondierenden Wildtypen einen Wert von $103,0 \pm 1,3$ mmHg. Nach dem Diätwechsel von Normal- auf Hochsalz fielen die Werte der (-/-) Tiere um 2,9 % auf $103,8 \pm 3,6$ mmHg, während die der (+/+) Mäuse um 3,8 % auf $107,0 \pm 2,5$ mmHg anstiegen. Nach dem Umsetzen von Hochsalz- auf Niedrigsalzdiät veränderte sich der Blutdruck der Knockout-Tiere mit $103,2 \pm 4,5$ mmHg nur geringfügig, wohingegen die Werte der Wildtypen um 5,29 % auf $101,3 \pm 2,2$ mmHg sanken.

7.1.1.2 Blutdruckwerte der 11 Monate alten Mäuse

Da das dopaminerge System einem Alterungsprozess unterliegen soll (Ricci 1990), (Ricci et al. 1996), war die zweite Hypothese, welche mit den Experimenten geprüft werden sollte, den möglichen Einfluss des Alters auf die Blutdruckwerte der Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse zu beobachten. Deshalb wurden parallel zu den 3 auch die 11 Monate alten Tiere nach dem oben genannten Studienprotokoll (siehe 4.1.1.3) untersucht.

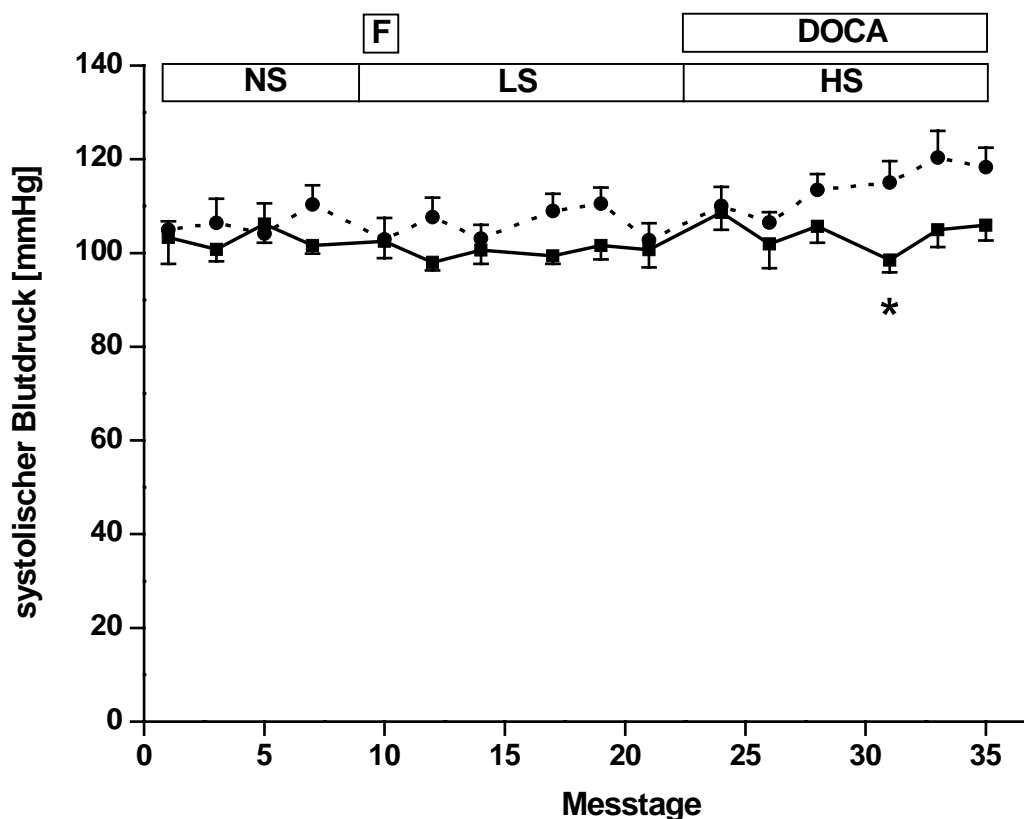


Abb. 7.6: Verlaufsdigramm der systolischen Blutdruckwerte von **11 Monate** alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) \blacksquare (n=6) und (-/-) \bullet (n=6) Mäusen auf Normalsalz-, danach auf Niedrigsalz-, nach initialer Furosemid-Applikation (F), und schließlich auf Hochsalzdiät, zusammen mit einer täglichen DOCA-Injektion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. *) $p < 0,05$ vs. D₃ Rezeptor (+/+).

Das Diagramm 7.6 zeigt die systolischen Blutdruckwerte des ersten Studienarmes der 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse. Die Blutdruckwerte lagen, den gesamten Versuchszeitraum betrachtet, bei den Knockout-Tieren zwischen 102,8 und 120,3 mmHg und bei den korrespondierenden (+/+) Mäusen

zwischen 98,0 und 108,7 mmHg. Nach dem Diätwechsel von Normal- auf Niedrigsalz war weder bei den Knockout- noch bei den Wildtyp-Tieren eine bemerkenswerte Blutdruckveränderung zu beobachten. Nach dem Umsetzen von Niedrig- auf Normalsalz stiegen die Werte der (-/-) Mäuse an, während die, der (+/+) Tiere weitgehend konstant blieben.

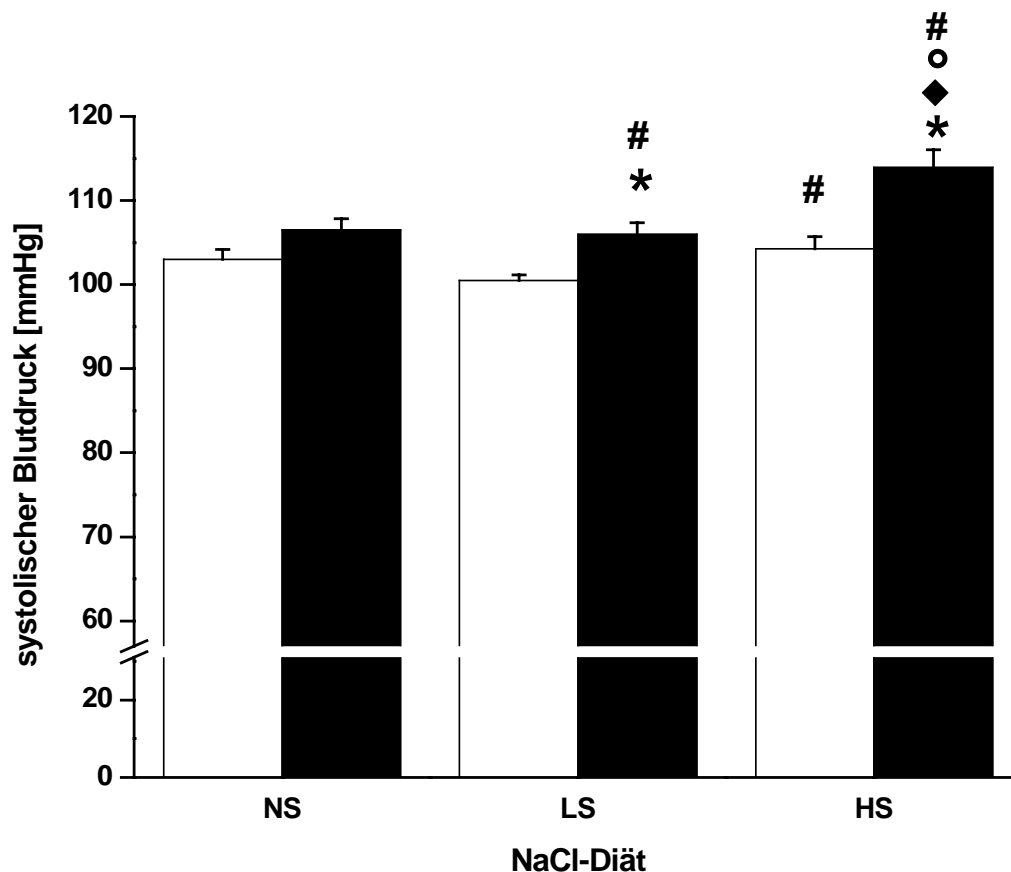


Abb. 7.7: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Verlaufsdiagramm der systolischen Blutdruckwerte des 1. Studienarmes von **11 Monate** alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) □ ($n=6$) und (-/-) ■ ($n=6$) Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. *) $p < 0,05$ vs. D_3 Rezeptor (+/+), ♦) $p < 0,05$ vs. respektive NS-Gruppe, °) $p < 0,05$ vs. respektive LS-Gruppe, #) $p < 0,05$ vs. respektive junge Tiere des entsprechenden Studienarmes.

Auf Normalsalzdiet waren zwischen den (-/-) Mäusen, mit einem Druck von $106,5 \pm 1,4$ mmHg und den Wildtyp-Tieren, mit $103,0 \pm 1,2$ mmHg, zunächst keine großen Unterschiede zu erkennen. Nach dem Umsetzen von Normal- auf Niedrigsalzdiet sank der Blutdruck der Knockout-Mäuse um 0,5 % auf $106,0 \pm 1,4$ mmHg, und der,

der (+/+) Tiere um 2,4 % auf $100,5 \pm 0,7$ mmHg, wodurch sich die beiden Genotypen nun signifikant unterschieden. Nach dem Wechsel von Normal- auf Hochsalz vergrößerte sich der Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen noch weiter. Der Druck der (-/-) Tiere stieg um 7,5 % auf $113,9 \pm 2,1$ mmHg, wohingegen die Werte der Wildtypen lediglich um 3,8 % auf $104,3 \pm 1,5$ mmHg anstiegen.

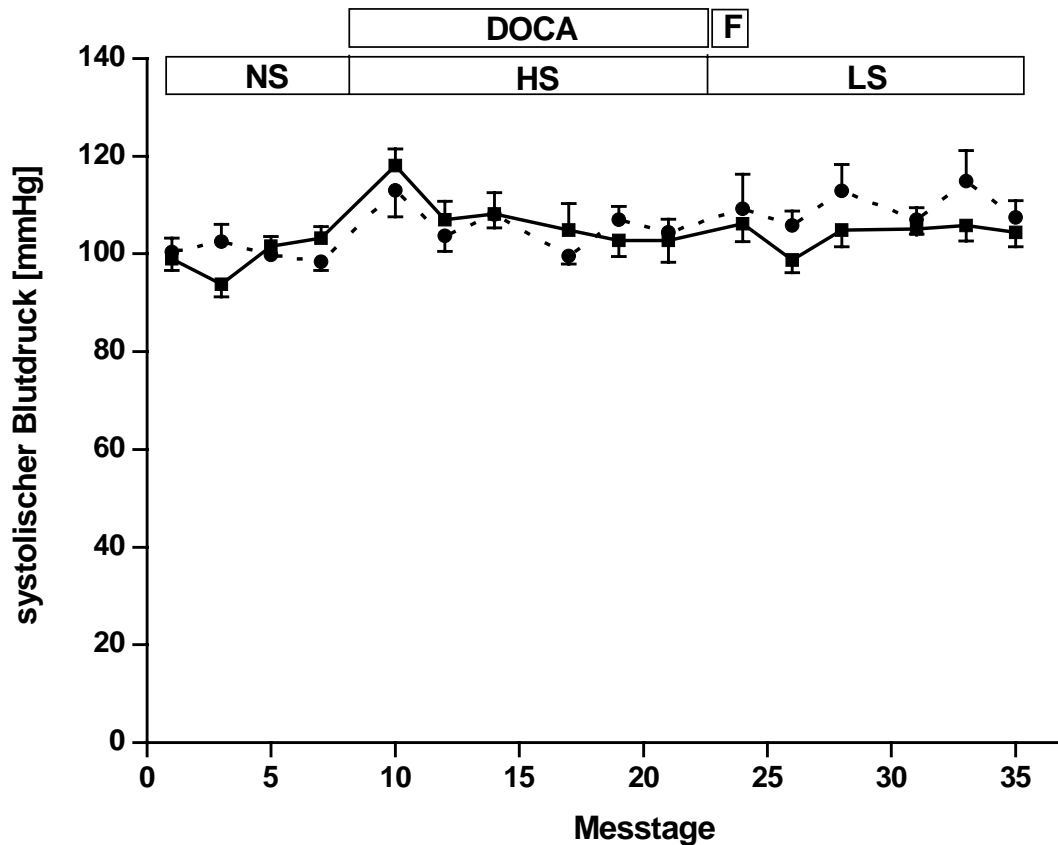


Abb. 7.8: Verlaufsdiagramm der systolischen Blutdruckwerte von **11 Monate** alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) \blacksquare (n=6) und (-/-) \bullet (n=6) Mäusen auf Normalsalz-, danach auf Hochsalz-, zusammen mit einer täglichen DOCA-Injektion, und schließlich auf Niedrigsalzdiät, nach initialer Furosemid-Applikation (F). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Im zweiten Studienarm der 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse zeigten sich, im Diagramm 7.8 dargestellt, in der ersten Woche auf Normalsalzdiät kaum Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Nach dem Umsetzen von Normal- auf Hochsalzdiät stiegen die Blutdruckwerte beider Tiergruppen auf ähnliche Weise kurzfristig an, sanken aber in den folgenden Tagen

auf jeweils relativ gleichbleibende Blutdruckwerte. In der letzten Diätperiode stiegen die Blutdruckwerte der (-/-) Mäuse im Verlauf etwas an, wohingegen die (+/+) Tiere im Vergleich zum vorangegangenen Abschnitt augenscheinlich ähnliche Werte zeigten. Die Knockout-Mäuse hatten während des gesamten Verlaufes einen gemittelten systolischen Blutdruck zwischen 98,4 mmHg und 114,9 mmHg und die entsprechenden Wildtypen hatten Werte zwischen 93,9 mmHg und 118,1 mmHg.

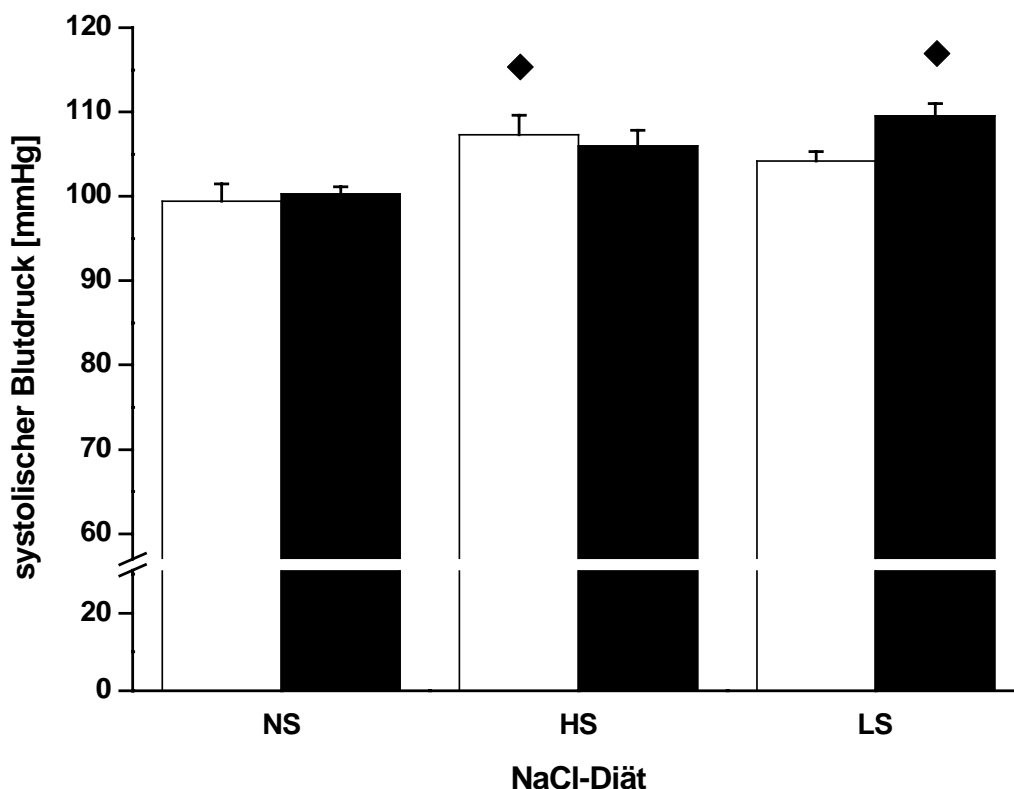


Abb. 7.9: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Verlaufsdigramm der systolischen Blutdruckwerte des 2. Studienarmes von **11 Monate** alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) □ ($n=6$) und (-/-) ■ ($n=6$) Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. ♦) $p < 0,05$ vs. respektive NS-Gruppe.

Abbildung 7.9 zeigt die Zusammenfassung der Diätabschnitte des 2. Studienarmes der 11 Monate alten Tiere. Wie bereits im Verlaufsdigramm zu erkennen war, waren die systolischen Blutdruckwerte auf Normalsalzdiät, mit $100,3 \pm 0,9$ mmHg bei den (-/-) Tieren und $99,4 \pm 2,1$ mmHg bei den (+/+) Mäusen, sehr ähnlich. Nach dem Umsetzen von Normal- auf Hochsalzdiät stieg der Blutdruck der Knockout-Mäuse um 5,7 % auf $106,0 \pm 1,9$ mmHg und der, der Wildtypen um 7,9 % auf $107,3 \pm 2,3$

mmHg. Nach dem Diätwechsel von Hochsalz- auf Nidrigsalzdiät stieg der Druck der Knockout-Tiere um 3,4 % auf $109,6 \pm 1,5$ mmHg noch weiter an, während der Blutdruck der korrespondierenden Wildtypen um 2,9 % auf $104,2 \pm 1,1$ mmHg sank. Die Werte der (-/-) Tiere waren zwar höher als die der Kontrollen (im Paarvergleich signifikant), erreichten aber bei der Varianzanalyse nicht das Signifikanzniveau.

		3 Monate		11 Monate	
		(+/+) (n=6)	(-/-) (n=6)	(+/+) (n=6)	(-/-) (n=6)
	Diät				
1. Studienarm	LS	$101,5 \pm 2,4$	$100,8 \pm 1,0$	$100,5 \pm 0,7$	$106,0 \pm 1,4^{*,\#}$
	NS	$104,5 \pm 2,6$	$107,6 \pm 1,3$	$103,0 \pm 1,2$	$106,5 \pm 1,4$
	HS	$99,1 \pm 0,9$	$100,9 \pm 1,9$	$104,3 \pm 1,5^{\#}$	$113,9 \pm 2,1^{*,\circ,\diamond,\#}$
2. Studienarm	LS	$101,3 \pm 2,2$	$103,2 \pm 4,5$	$104,2 \pm 1,1$	$109,6 \pm 1,5^{\diamond}$
	NS	$103,0 \pm 1,3$	$106,9 \pm 2,7$	$99,4 \pm 2,1$	$100,3 \pm 0,9$
	HS	$107,0 \pm 2,5$	$103,8 \pm 3,6$	$107,3 \pm 2,3^{\diamond}$	$106,0 \pm 1,9$

Tab. 7.1: Zusammenfassung der systolischen Blutdruckwerte von 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) und (-/-) Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der jeweiligen Diätabschnitte. *) $p < 0,05$ vs. D_3 Rezeptor (+/+), °) $p < 0,05$ vs. respektive LS Gruppe, ♦) $p < 0,05$ vs. respektive NS-Gruppe, #) $p < 0,05$ vs. 3 Monate alte Tiere.

Tab. 7.1 zeigt den Altersvergleich der 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse. Im ersten Studienarm waren die Blutdruckwerte der 11 Monate alten (-/-) Tiere auf Nidrigsalzdiät signifikant höher als die der entsprechenden jüngeren auf der selben Diät. Auf HS-Diät hatten sowohl die (-/-) als auch die (+/+) Mäuse einen signifikant höheren Blutdruck als die korrespondierenden 3 Monate alten Tiere. Auf den anderen Diäten und im 2. Studienarm gab es zwar Unterschiede, die aber weder das Signifikanzniveau erreichten, noch eine eindeutig erkennbare Tendenz bzgl. des Altersunterschiedes zeigten.

7.1.2 Stoffwechselläufigexperimente

Um die Natriumurinausscheidung dieses Knockout-Modells zu bestimmen, wurde die $U_{Na}V$ bei wachen Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen mit Hilfe von Stoffwechselläufigexperimenten untersucht (siehe 4.1.2). Dazu wurden jeweils 6 (-/-) und 6 (+/+) Tiere im Alter von 3 und 11 Monaten eine Woche auf Normalsalz-, und im Anschluss daran, eine weitere auf Hochsalzdiät gehalten. Während der Experimente wurde täglich Urin abgenommen, die Futteraufnahme, das Trinkvolumen und das Tiergewicht bestimmt. Aus der Natriumkonzentration im Urin wurde die $U_{Na}V$ berechnet.

7.1.2.1 Natriumurinausscheidung bei chronischer Kochsalzbelastung bei 3 Monate alten Tieren

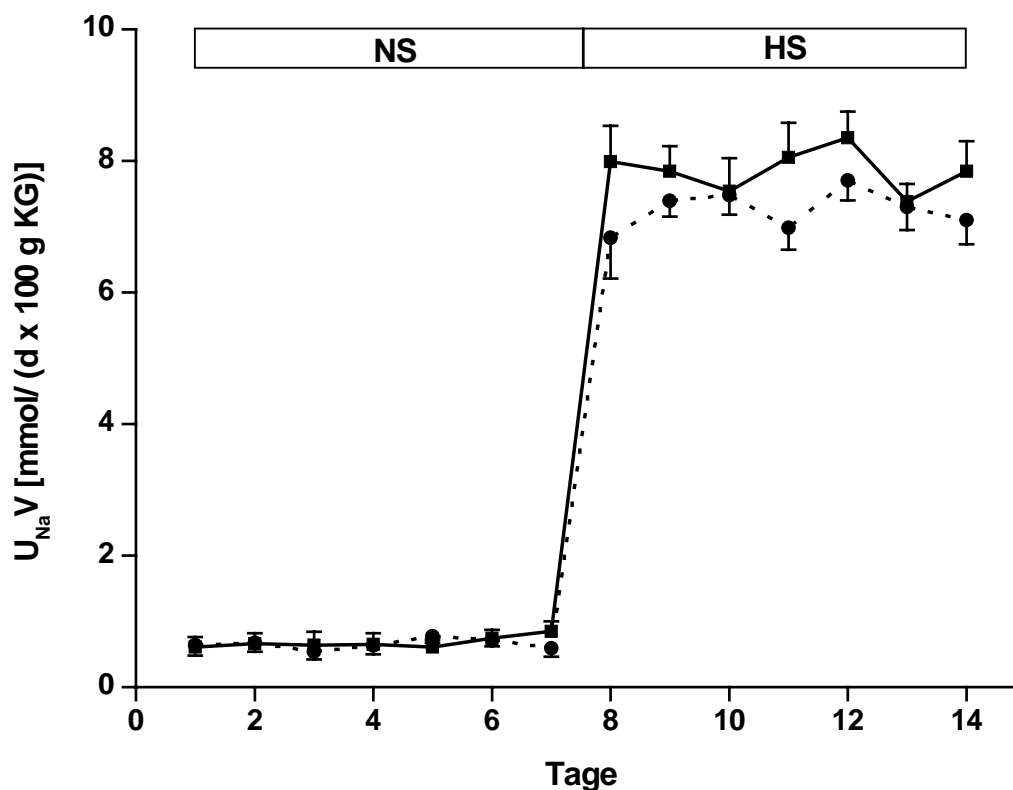


Abb. 7.10: Natriumurinausscheidung der **3 Monate** alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) \blacksquare ($n=6$) und (-/-) \bullet ($n=6$), 1 Woche auf Normalsalz- (0,6 % NaCl, NS) und anschließend 1 Woche auf Hochsalzdiät (4,6 % NaCl, HS). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 7.10 zeigt die Natriumurinausscheidung der 3 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse. In der ersten Woche, auf Normalsalzdiät, unterschied sich die U_{Na}V der Genotypen im Verlauf des Experimentes kaum, wobei die Werte der (-/-) Tiere zwischen 0,54 und 0,77 mmol/ (d x 100 g KG) und die der (+/+) Mäuse zwischen 0,61 und 0,85 mmol/ (d x 100 g KG) lagen. Nach dem Umsetzen von Normal- auf Hochsalzdiät stieg die Natriumurinausscheidung bei den beiden Gruppen erwartungsgemäß an, wobei die (-/-) Mäuse über nahezu die ganze Diätperiode, mit Werten zwischen 6,8 und 7,7 mmol/ (d x 100 g KG), eine tendenziell niedrigere U_{Na}V aufwiesen als die korrespondierenden Kontrolltiere mit Werten zwischen 7,4 und 8,4 mmol/ (d x 100 g KG).

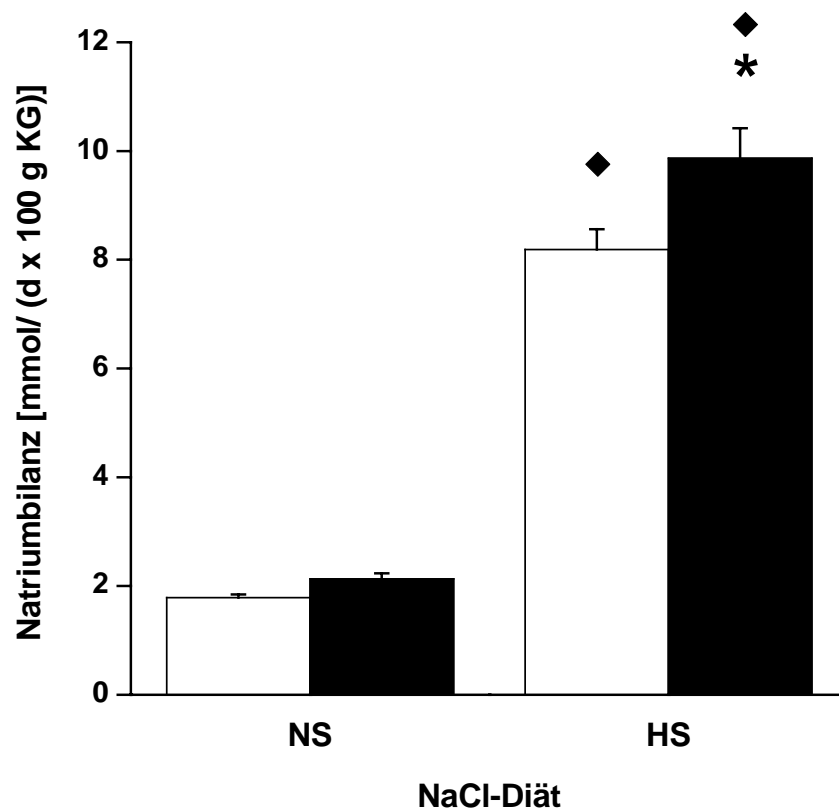


Abb. 7.11: Bilanzierte Natriumaufnahme und -urinausscheidung der **3 Monate** alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) □ (n=6) und (-/-) ■ Mäuse (n=6). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. *) p<0,05 vs. D₃ Rezeptor (+/+), ♦) p<0,05 vs. respektive NS Gruppe.

Die Natriumbilanz, also die Natriumaufnahme durch das Futter abzüglich der Natriumurinausscheidung über die jeweiligen Diätabschnitte zusammengefaßt, zeigt

das Diagramm 7.11. Die Natriumaufnahme durch das nahezu natriumfreie Trinkwasser, sowie die Exkretion über die Fäces oder andere Ausscheidungsmechanismen wurden bei diesem Experiment nicht berücksichtigt. Die Natriumbilanz war sowohl auf Normalsalz- als auch auf Hochsalzdiät positiv, was den alternativen Ausscheidungswegen für das Natrium entsprechen dürfte. Auf Normalsalzdiät war die Bilanz der Knockout-Mäuse im Mittel bei $2,1 \pm 0,1$ mmol/ (d x 100 g KG) geringfügig höher als die der entsprechenden (+/+) Tiere mit $1,8 \pm 0,1$ mmol/ (d x 100 g KG) und erreichte im Gruppenvergleich (t-Test) zwar das Signifikanzniveau, allerdings nicht im Vergleich mit der Varianzanalyse (ANOVA). Nach dem Wechsel auf Hochsalzdiät stieg die Bilanz sowohl bei den (-/-) als auch bei den (+/+) Mäusen um ungefähr das 3,6-fache auf $9,9 \pm 0,6$ bzw. $8,2 \pm 0,4$ mmol/ (d x 100 g KG) an, wodurch sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen ergab.

7.1.2.2 Natriumurinausscheidung bei chronischer Kochsalzbelastung bei 11 Monate alten Tieren

Um Altersunterschiede bzgl. der Natriumurinausscheidung bei den Mäusen beobachten zu können, wurden dieselben Untersuchungen (siehe 7.1.2) bei 11 Monate alten Tieren durchgeführt.

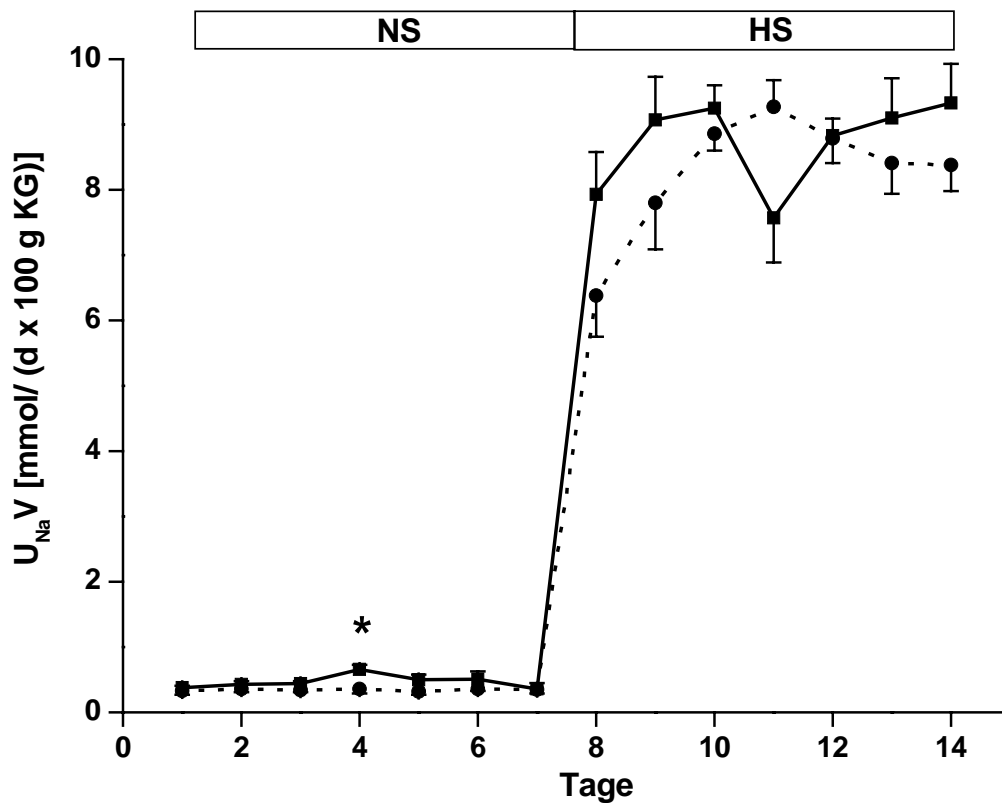


Abb. 7.12: Natriumurinausscheidung der 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) \blacksquare (n=6) und (-/-) \bullet (n=6) Mäuse (n=6), 1 Woche auf Normalsalzdiät (0,6 % NaCl, NS) und anschließend 1 Woche auf Hochsalzdiät (4,6 % NaCl, HS). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. *) $p < 0.05$ vs. D_3 Rezeptor (+/+).

Die U_{NaV} der 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse ist in Abb. 7.12 dargestellt. In der ersten Woche auf Normalsalzdiät lag die Natriumurinausscheidung bei den (-/-) Tieren zwischen 0,32 und 0,36 mmol/ (d x 100 g KG) und bei den (+/+) Mäusen zwischen 0,36 und 0,66 mmol/ (d x 100 g KG). Nach dem Wechsel von Normal- auf Hochsalzdiät stieg die U_{NaV} wiederum erwartungsgemäß bei beiden Genotypen an und lag zwischen 6,38 und 9,27 mmol/ (d x 100 g KG) bei den Knockout-Mäusen und zwischen 7,57 und 9,33 mmol/ (d x 100 g KG) bei den korrespondierenden Wildtyp-Tieren. Dabei war die Natriumurinausscheidung bei den (+/+) Mäusen über den größten Teil der Diätperiode höher als bei den (-/-) Tieren.

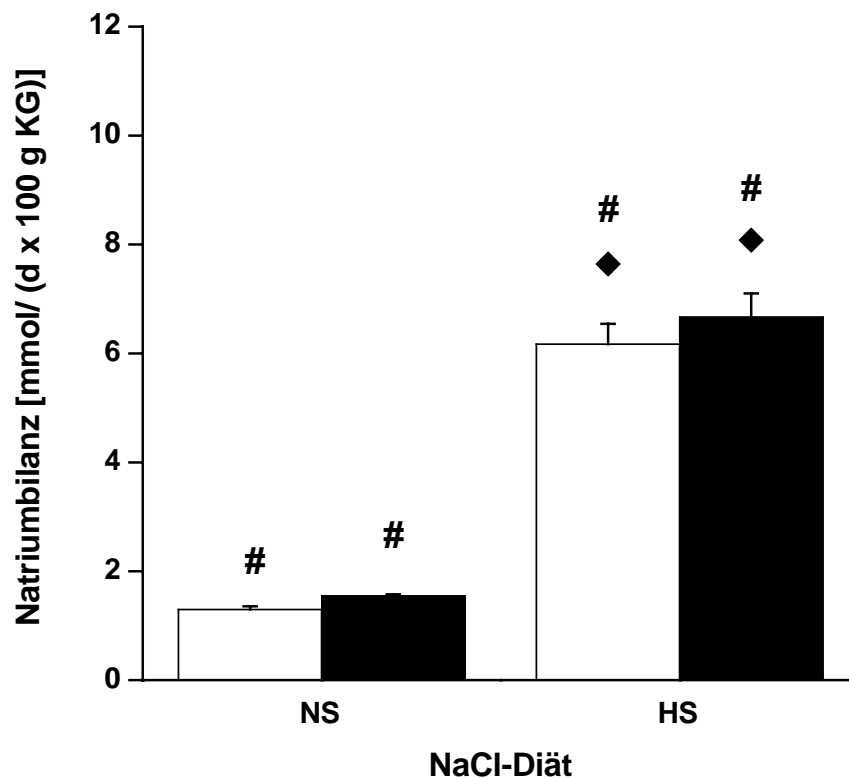


Abb. 7.13: Bilanzierte Natriumaufnahme und -urinausscheidung der **11 Monate** alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) □ (n=6) und (-/-) ■ Mäuse (n=6). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. ♦) $p < 0,05$ vs. respektive NS-Gruppe, #) $p < 0,05$ vs. respektive 3 Monate alte Tiere.

Die Natriumbilanz der 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse ist in Abb. 7.13 dargestellt. Diese war bei den älteren Tieren ebenfalls positiv, was den alternativen Ausscheidungswegen für das Natrium entsprechen dürfte. Die Werte der älteren Mäuse waren sowohl auf Normalsalz- als auch auf Hochsalzdiät niedriger als bei den entsprechenden jüngeren Tieren. In der ersten Woche des Experimentes auf Normalsalzdiät war die Bilanz der (-/-) Mäuse mit $1,5 \pm 0,03$ mmol/ (d x 100 g KG) geringfügig höher als bei den (+/+) Tieren mit $1,3 \pm 0,05$ mmol/ (d x 100 g KG). Beim Diätwechsel stiegen die Werte der Knockout-Mäuse um das 3,5-fache auf $6,7 \pm 0,37$ mmol/ (d x 100 g KG) an und waren tendenziell höher als bei den korrespondierenden Kontrollen, welche um das 3,8-fache auf $6,2 \pm 0,37$ mmol/ (d x 100 g KG) anstiegen.

		3 Monate		11 Monate	
Diät		(+/+) (n=6)	(-/-) (n=6)	(+/+) (n=6)	(-/-) (n=6)
U _{Na} V [mmol/ (d x 100 g KG)]	NS	0,68 ± 0,03	0,65 ± 0,03	0,47 ± 0,04 [#]	0,35 ± 0,01 [#]
	HS	7,86 ± 0,12 [◆]	7,25 ± 0,11 ^{*◆}	8,70 ± 0,26 ^{◆#}	8,27 ± 0,36 ^{◆#}
Natriumbilanz [mmol/ (d x 100 g KG)]	NS	1,79 ± 0,06	2,13 ± 0,10	1,30 ± 0,05 [#]	1,55 ± 0,03 [#]
	HS	8,19 ± 0,38 [◆]	9,87 ± 0,55 ^{*◆}	6,17 ± 0,37 ^{◆#}	6,67 ± 0,44 ^{◆#}

Tab. 7.2: Übersicht über die zusammengefassten U_{Na}V-Werte und die Natriumbilanz von 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) und (-/-) Mäusen über jeweils eine Woche auf Normalsalz- und Hochsalzdiät. Mittelwerte ± SEM. *) p<0,05 (-/-) vs. (+/+) des gleichen Alters, ◆) p<0,05 vs. respektive NS-Gruppe, #) p<0,05 vs. respektive 3 Monate alte Tiere.

Tab. 7.2 zeigt die Übersicht der Natriumurinausscheidung und der Natriumbilanz von den 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen. Auf Normalsalzdiät war die U_{Na}V der 3 Monate alten (-/-) und (+/+) Tiere sehr ähnlich. Beim Umsetzen auf Hochsalzdiät war die Natriumurinausscheidung der (-/-) Mäuse signifikant niedriger als bei den Wildtypen. Die älteren (-/-) Mäuse zeigten auf der Normalsalzdiät eine niedrigere Natriumurinausscheidung als die korrespondierenden Wildtypen, wobei dieser Unterschied allerdings nicht das Signifikanzniveau erreichte. Auch auf Hochsalzdiät war die Differenz nicht statistisch signifikant, wobei die beiden Tiergruppen auf dieser Diät allerdings eine höhere U_{Na}V hatten als die jüngeren Tiere. Auf NS Diät hatten die 3 Monate alten (-/-) und (+/+) Mäuse eine signifikant höhere Natriumurinausscheidung als die älteren. Die einzelnen Ergebnisse der Natriumbilanz wurden bereits unter 7.1.2.1 und 7.1.2.2 dargestellt. An dieser Stelle soll noch erwähnt werden, dass die älteren Tiere sowohl auf Normal- als auch auf Hochsalzdiät eine signifikant niedrigere Natriumbilanz aufwiesen als die jüngeren. Dieser Umstand liegt unter anderem daran, dass die älteren Mäuse weniger Futter und damit auch weniger Natrium zu sich genommen hatten, was etwa 10 bis 20 % des Effektes verursachen könnte.

7.1.2.3 Weitere untersuchte Variablen der Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse vor und während der chronischen Kochsalzbeladung

	Diät	3 Monate		11 Monate	
		(+/+) (n=6)	(-/-) (n=6)	(+/+) (n=6)	(-/-) (n=6)
U _K V [mmol/ 24 h/ 100 g KG]	NS	2,97±0,06	2,75±0,06	2,36±0,06 [#]	2,42±0,09 [#]
	HS	2,90±0,10	2,82±0,06	2,96±0,07 [◆]	2,92±0,06 [◆]
U _{Cl} V [mmol/ 24 h/ 100 g KG]	NS	1,33±0,04	1,34±0,04	0,87±0,03 [#]	0,84±0,03 [#]
	HS	8,31±0,17 [◆]	7,64±0,14 ^{*◆}	7,57±0,27 ^{◆#}	7,31±0,16 [◆]
Urinvolumen [ml/ 24 h/ 100 g KG]	NS	8,1±0,25	6,6±0,21 [*]	6,1±0,18 [#]	5,3±0,23 [#]
	HS	23,8±0,6 [◆]	20,3±0,33 ^{*◆}	27,8±0,66 ^{◆#}	22,8±0,42 ^{*◆#}
Trinkvolumen [ml/ 24 h/ 100 g KG]	NS	20,6±0,3	20,9±0,6	17,1±0,2 [#]	16,7±1,1 [#]
	HS	41,2±0,7 [◆]	42,1±0,4 [◆]	44,7±0,8 ^{◆#}	40,2±0,7 ^{*◆#}
Futtermenge [g/ 24 h/ 100 g KG]	NS	23,9±0,5	26,9±0,8 [*]	17,1±0,6 [#]	18,3±0,3 [#]
	HS	23,3±0,6	24,8±0,8	21,6±0,5 [◆]	21,7±0,6 ^{◆#}
Tiergewicht [g]	NS	28,3±0,08	26,2±0,08 [*]	31,7±0,06 [#]	29,8±0,05 ^{*#}
	HS	28,0±0,06 [◆]	25,94±0,05 ^{*◆}	31,92±0,12 [#]	29,7±0,11 ^{*#}
Osmolalität des Urins [osm/ kg]	NS	2,03±0,05	2,28±0,05 [*]	2,60±0,21 [#]	2,5±0,04 [#]
	HS	1,27±0,02 [◆]	1,37±0,11 [◆]	1,16±0,02 ^{◆#}	1,33±0,02 [◆]

Tab. 7.3: Weitere untersuchte Parameter von 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) (n=6) und (-/-) (n=6) Mäusen vor und während der chronischen Kochsalzbeladung. Die Tiere wurden über jeweils 1 Woche auf Normalsalz- (NS) und Hochsalzdiät (HS) gehalten. Mittelwerte ± SEM. *) p<0,05 (-/-) vs. (+/+) des gleichen Alters, ◆) p<0,05 vs. respektive NS-Gruppe, #) p<0,05 vs. respektive 3 Monate alte Tiere.

Die Kaliumurinausscheidung der Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse blieb weitgehend konstant über den Verlauf der jeweiligen Experimente. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knockout- und Wildtyp-Tieren, aber zwischen den Diätperioden und Altersgruppen. Die Chloridausscheidung folgte weitgehend der Natriumurinausscheidung. Es waren keine großen Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen, dafür aber zwischen den 3 und den 11 Monate alten Mäusen, insbesondere bei den Tieren auf Normalsalzdiet. Die

Chloridausscheidung über den Urin war bei den älteren Tieren insgesamt wenig, aber teilweise signifikant niedriger als bei den entsprechenden jüngeren.

Auch die Urinausscheidung beider Altersgruppen stieg erwartungsgemäß beim Umsetzen von Normal- auf Hochsalzdiät an. Das Urinvolumen der Knockout-Mäuse war stets niedriger als das der jeweiligen (+/+) Tiere. Auf Normalsalzdiät war das Urinvolumen bei den 11 Monate alten (-/-) und (+/+) Mäusen niedriger als das der jeweiligen 3 Monate alten Tiere, während die Verhältnisse auf Hochsalzdiät genau umgekehrt waren. Das Trinkvolumen der Tiere stieg auf Hochsalzdiät erwartungsgemäß an. Es zeigten sich zwar sowohl auf Hoch- als auch auf Normalsalzdiät Unterschiede zwischen den 3 und den 11 Monate alten Mäusen, wobei allerdings keine einheitliche Tendenz zu erkennen war. Die 3 Monate alten Mäuse hatten auf beiden Diäten mehr Futter zu sich genommen als die älteren. Lediglich auf Normalsalzdiät hatten die jüngeren (-/-) Mäuse deutlich mehr gefressen als die korrespondierenden Wildtypen. Das Gewicht der 11 Monate alten Tiere war erwartungsgemäß höher als das der entsprechenden jüngeren Tiere, wobei die Knockout-Mäuse leichter waren als die entsprechenden Wildtypen des gleichen Alters. Die Osmolalität nahm aufgrund des Verdünnungseffektes durch das erhöhte Urinvolumen, verursacht durch den Diätwechsel von Normal- auf Hochsalz, bei beiden Altersgruppen sowohl bei den Knockout- als auch bei den Wildtyp-Mäusen ab. Dabei waren die Werte der 3 Monate alten Tiere auf NS-Diät niedriger als die der entsprechend älteren, wohingegen auf Hochsalzdiät die Werte der 11 Monate alten Tiere niedriger waren als die der jüngeren.

7.1.3 Somatische Charakteristika von Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Bei den weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss der verschiedenen, chronisch verabreichten NaCl-Diäten auf die physiologischen Parameter, Körper-, Herz- und Nierengewicht, Hämatokrit sowie die Natriumkonzentration im Plasma bei 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäusen untersucht, welche 6 Wochen bzw. 6 Monate auf den jeweiligen Kochsalzdiäten gehalten wurden.

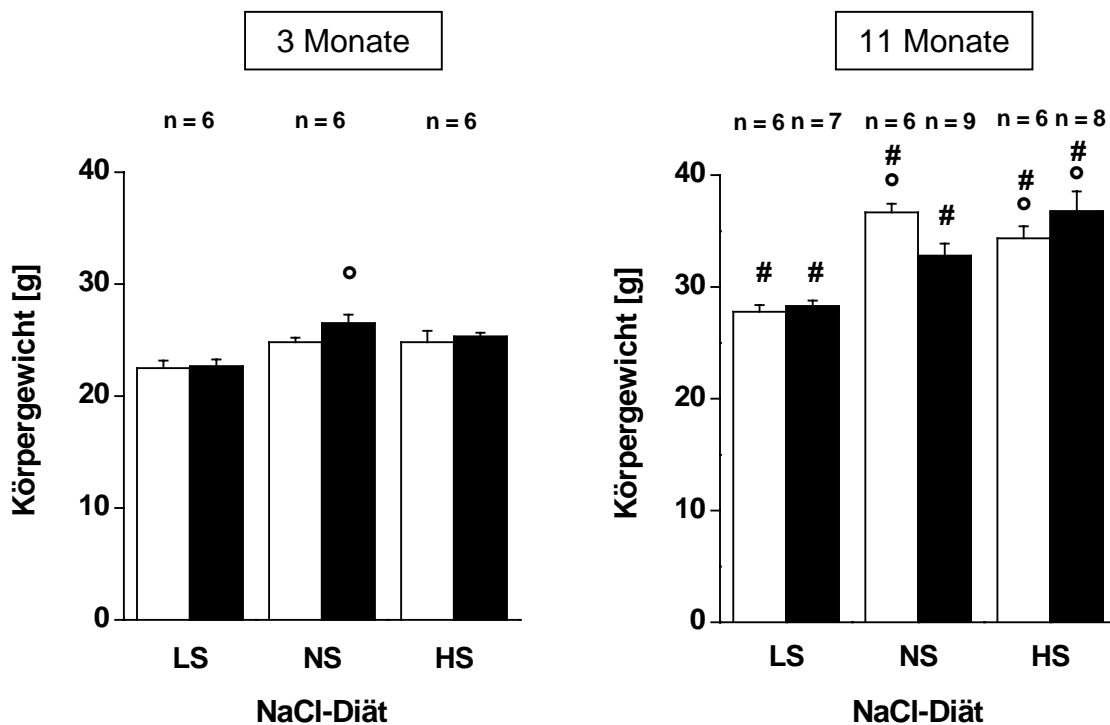


Abb. 7.14: Körpergewichte von 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) □ und (-/-) ■ Mäusen auf Niedrigsalz- (0,2 % NaCl, LS), Normalsalz- (0,6 % NaCl, NS) und Hochsalzdiät (4,6 % NaCl, HS). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. °) $p < 0,05$ vs. respektive LS-Gruppe, #) $p < 0,05$ vs. 3 Monate alte Tiere.

Zwischen den altersgleichen Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Tieren auf den verschiedenen NaCl-Diäten waren keine großen Unterschiede zu erkennen. Allerdings waren die Körpergewichte auf Normal- und auf Hochsalzdiät, bei den 3 Monate alten Mäusen eher tendenziell und bei den 11 Monate alten Tieren teilweise signifikant, höher als bei den niedrigsalzernährten Mäusen. Die Werte auf NS- und HS-Diät lagen zwischen $24,8 \pm 1,0$ g und $26,5 \pm 0,8$ g bei den jüngeren und zwischen $32,8 \pm 1,1$ g und $36,8 \pm 1,8$ g bei den älteren Tieren, während die Körpergewichte auf Niedrigsalzdiät zwischen $22,5 \pm 0,7$ g und $22,7 \pm 0,6$ g bei den 3 und zwischen $27,8 \pm 0,6$ g und $28,3 \pm 0,5$ g bei den 11 Monate alten Mäusen lagen. Die Gewichtszunahme der älteren Tiere gegenüber den jüngeren war auf Niedrigsalzdiät mit einer Differenz von 5,6 g bei den (-/-) Tieren und 5,3 g bei den (+/+) Mäusen geringer als auf den beiden anderen Diäten, mit Gewichtszunahmen zwischen 6,3 und 11,8 g, was auf einen Einfluss der NaCl-Diät auf die Zunahme des Körpergewichtes der Tiere hinweisen könnte.

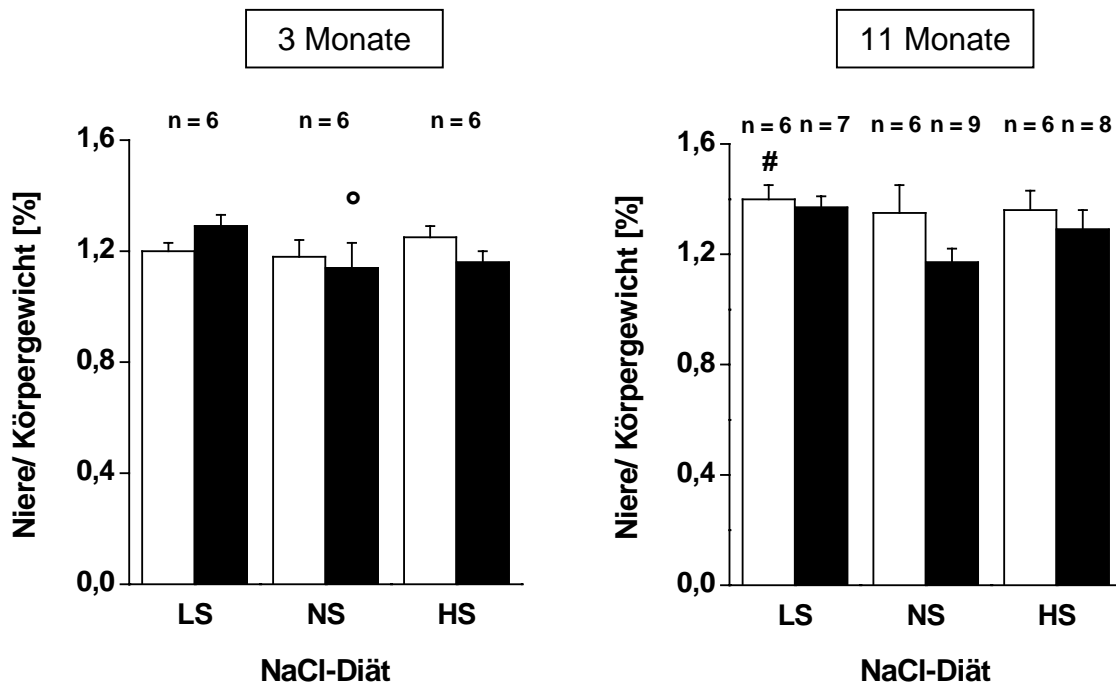


Abb. 7.15: Nieren-/ Körper-Gewichtsverhältnis von 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) \square und (-/-) \blacksquare Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Das Gewicht von beiden Nieren wurde ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. °) $p < 0,05$ vs. respektive LS-Gruppe, #) $p < 0,05$ vs. 3 Monate alte Tiere.

Bei den Nieren-/ Körper-Gewichtsverhältnissen waren weder zwischen den Dopamin D_3 Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäusen noch zwischen den verschiedenen verabreichten NaCl-Diäten große Unterschiede zu erkennen. Die Verhältnisse der (-/-) Mäuse waren, abgesehen von den jüngeren Tieren auf LS-Diät, tendenziell niedriger als die der Wildtypen. Die Werte der 3 Monate alten Tiere lagen zwischen $1,14 \pm 0,04$ % und $1,29 \pm 0,04$ % und die der 11 Monate alten Mäuse zwischen $1,17 \pm 0,05$ % und $1,40 \pm 0,05$ %. Die älteren Tiere hatten insgesamt - jeweils bezogen auf den gleichen Genotyp und Diät - tendenziell höhere Werte als die jüngeren, wobei der Unterschied bei den (+/+) Mäusen auf Niedrigsalzdiät signifikant war. Somit war die Zunahme der Nierengewichte geringfügig größer als die der jeweiligen Körpergewichte.

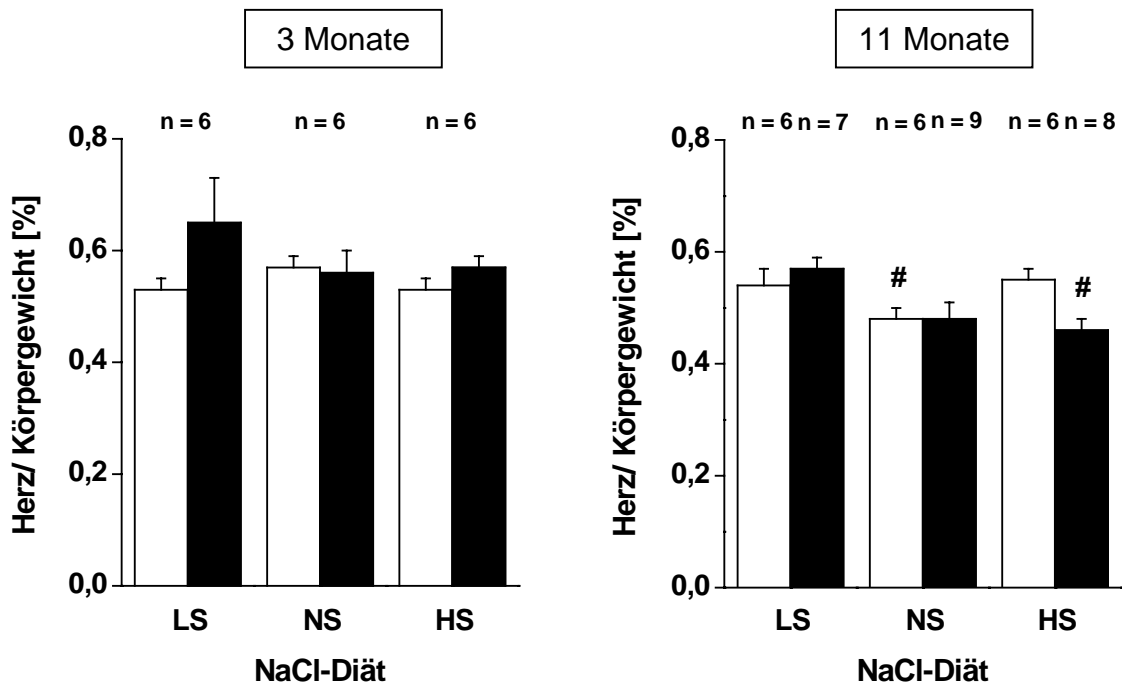


Abb. 7.16: Herz-/Körper-Gewichtsverhältnis von 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) □ und (-/-) ■ Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte.

#) $p < 0,05$ vs. 3 Monate alte Tiere.

Bei den Herz-/ Körper-Gewichtsverhältnissen der Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse zeigten sich, sowohl bei den 3 als auch bei den 11 Monate alten Tieren, keine großen Unterschiede zwischen den Genotypen. Auch die Unterschiede zwischen den Salzdiäten waren mit Werten zwischen $0,53 \pm 0,02$ % und $0,65 \pm 0,08$ % bei den jüngeren Tieren und zwischen $0,46 \pm 0,02$ % und $0,57 \pm 0,02$ % bei den älteren Mäusen, klein. Die Verhältnisse der 11 Monate alten Knockout-Mäuse waren alle (teilweise signifikant) niedriger als die der jeweiligen 3 Monate alten Tiere, auf der entsprechenden Diät.

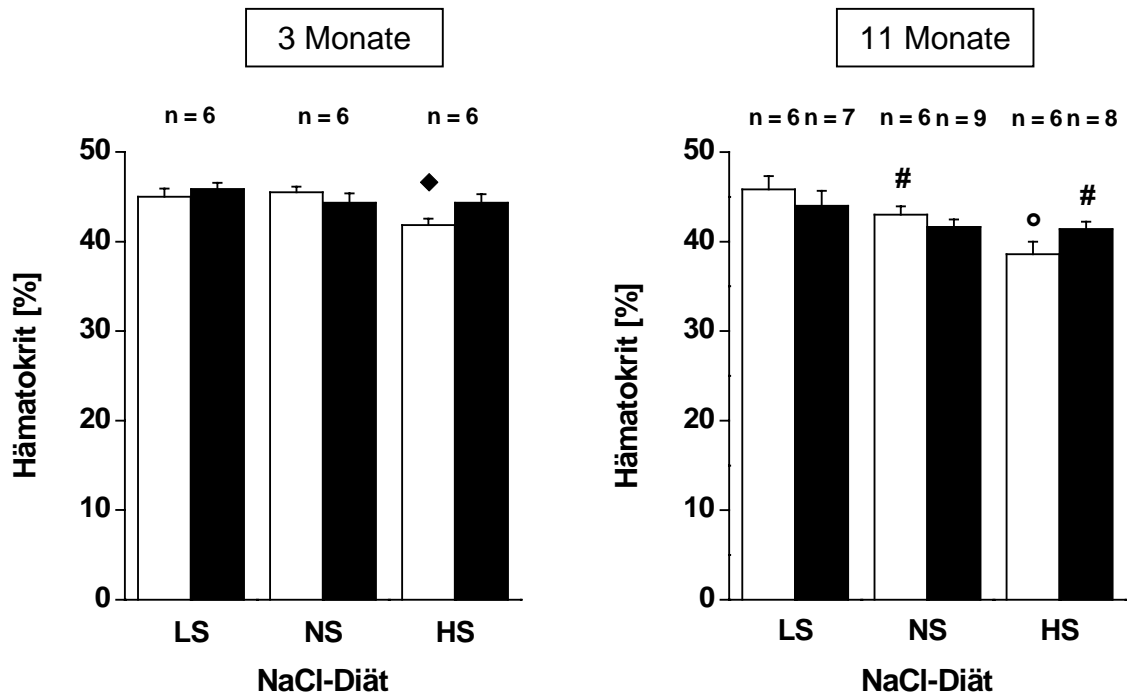


Abb. 7.17: Hämatokrit von 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) □ und (-/-) ■ Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. °) $p < 0,05$ vs. respektive LS-Gruppe, ♦) $p < 0,05$ vs. respektive NS-Gruppe, #) $p < 0,05$ vs. 3 Monate alte Tiere.

Die Hämatokrit Werte der Dopamin D_3 Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse unterschieden sich, sowohl bei den 3 als auch bei den 11 Monate alten Tieren, nur wenig. Auch die unterschiedlichen NaCl-Diäten beeinflussten die jeweiligen Hämatokrit Werte nur unwesentlich. Die Werte der jungen Mäusen lagen im Mittel zwischen $41,8 \pm 0,7$ % und $45,8 \pm 0,7$ % und die der älteren zwischen $38,6 \pm 1,4$ % und $45,8 \pm 1,5$ %. Auffallend waren die niedrigeren Werte der hochsalzernährten (+/+) Mäuse beider Altersgruppen. Die Unterschiede zwischen den 3 und den 11 Monate alten Tieren waren ebenfalls gering. Lediglich die 11 Monate alten (+/+) Tiere auf Normalsalz- und die (-/-) Mäuse auf Hochsalzdiät hatten einen signifikant niedrigeren Hämatokrit als die jeweiligen jüngeren Tiere.

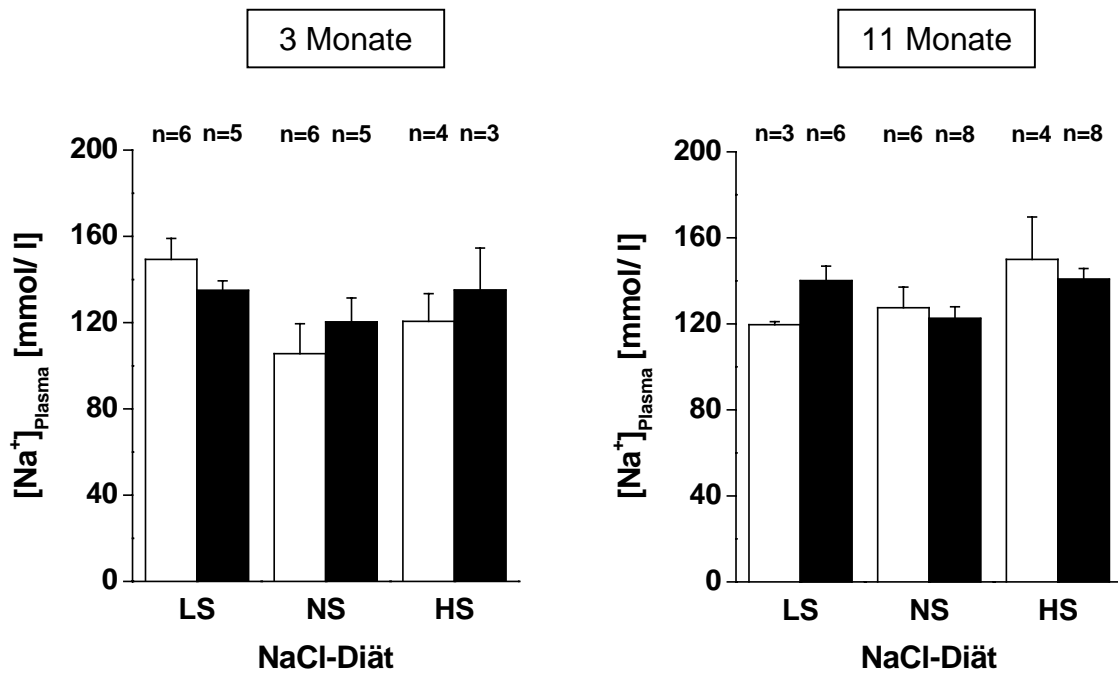


Abb. 7.18: Natriumkonzentration im Plasma von 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) □ und (-/-) ■ Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte.

Bei der Natriumkonzentration im Plasma gab es weder zwischen den beiden Genotypen noch zwischen den verschiedenen Kochsalzdiäten große Unterschiede. Die Werte lagen bei den jüngeren Mäusen im Mittel zwischen $105,7 \pm 13,9$ mmol/l und $149,3 \pm 9,7$ mmol/l und bei den älteren zwischen $119,6 \pm 1,4$ mmol/l und $149,9 \pm 19,8$ mmol/l. Die Tatsache, dass zwischen den beiden Genotypen keine großen Unterschiede zu erkennen waren, zeigt, dass die Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäuse kein Natrium im Plasma akkumulieren. Auch zwischen den 3 und 11 Monate alten Mäusen waren keine großen Unterschiede zu erkennen.

7.1.4 Glomeruläre Filtrationsrate von wachen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate bei wachen 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen, auf Niedrig-, Normal- und Hochsalzdiät, wurde zunächst Kreatinin mit Hilfe der HPLC (siehe 5.2) im Plasma und Urin der Tiere bestimmt. Aus den beiden Variablen wurde die Kreatinin-Clearance und damit die GFR berechnet.

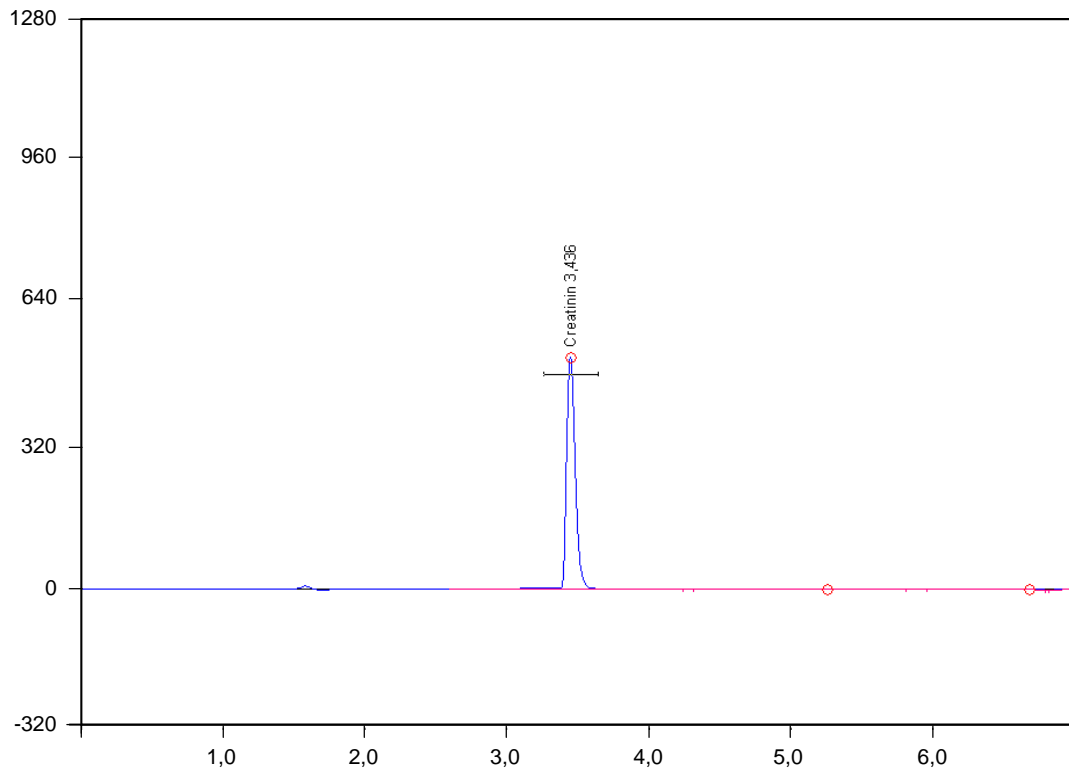


Abb. 7.19: Beispielchromatogramm eines Kreatininstandards (150 μM). Kreatinin wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 240 \text{ nm}$ detektiert.

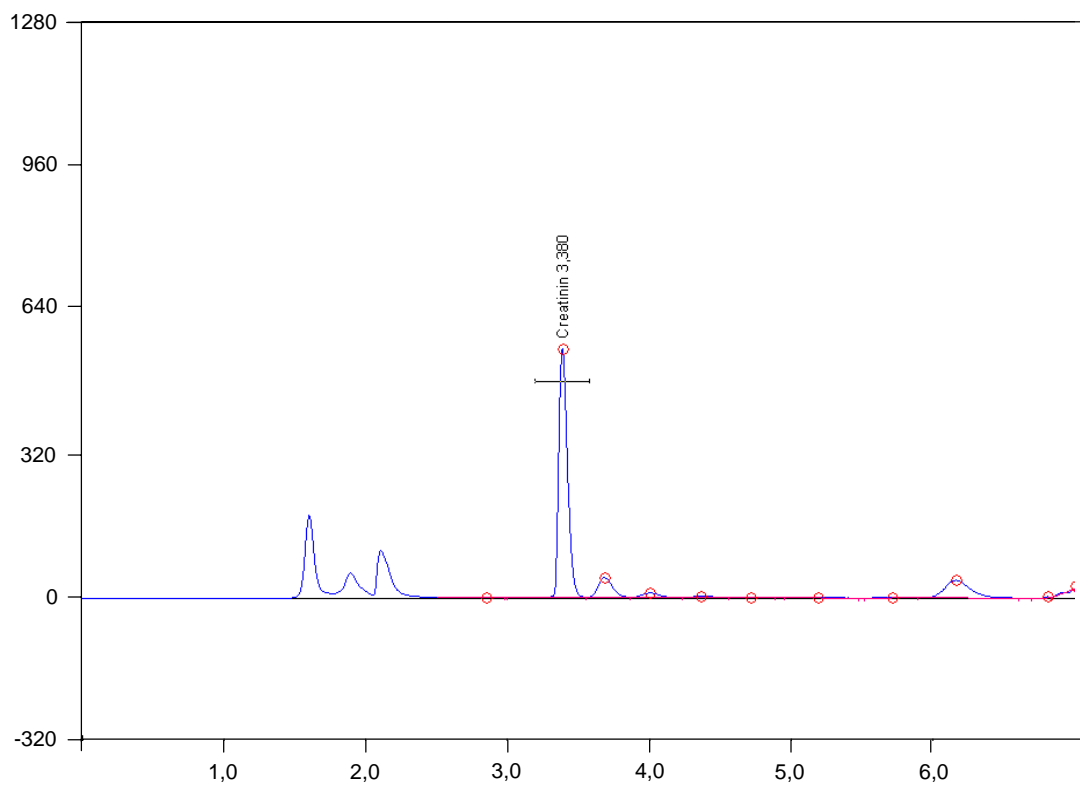


Abb. 7.20: Beispielchromatogramm einer Urinprobe einer Dopamin D_3 Rezeptor Knockout-Maus. Kreatinin wird zwischen der 3. und 4. Minute eluiert.

7.1.4.1 Kreatininurinausscheidung und -konzentration im Plasma

	Diät	3 Monate		11 Monate	
		(+/+)	(-/-)	(+/+)	(-/-)
U_{KreaV} [$\mu\text{mol}/(\text{d} \times 100 \text{ g KG})$]	LS	7,02 \pm 0,65	5,66 \pm 0,68	13,70 \pm 3,25	10,08 \pm 1,88
	NS	13,21 \pm 1,20	11,68 \pm 1,33	11,53 \pm 1,36	8,02 \pm 1,21
	HS	23,99 \pm 1,31 ^{°♦}	17,79 \pm 2,59 [°]	19,01 \pm 2,77	12,22 \pm 1,95
Kreatinin _{Plasma} [$\mu\text{mol}/\text{l}$]	LS	5,51 \pm 0,72	6,76 \pm 0,60	6,69 \pm 0,45	5,91 \pm 1,22
	NS	6,05 \pm 0,77	6,38 \pm 0,66	6,48 \pm 0,38	6,21 \pm 0,45
	HS	9,51 \pm 0,44 ^{°♦}	10,00 \pm 0,80 [♦]	8,62 \pm 0,32	8,90 \pm 1,11

Tab. 7.4: Übersicht über die Kreatininurinausscheidung und -konzentration im Plasma von 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) (n=5-6) und (-/-) (n=5-6) Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. [°]) $p < 0,05$ vs. respektive LS-Gruppe, [♦]) $p < 0,05$ vs. respektive NS-Gruppe

Bei 3 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäusen folgte die Kreatinin-Urinausscheidung (U_{KreaV}) dem Salzgehalt der Diät: Auf Niedrigsalzdiät am geringsten, auf Hochsalzdiät am höchsten. Die Unterschiede waren teilweise statistisch signifikant. Bei den Knockout-Tieren zeigte sich die gleiche Salzabhängigkeit, die Werte waren jedoch tendenziell niedriger als bei den Wildtypen. Die 11 Monate alten Mäusen wiesen ebenfalls die höchste U_{KreaV} unter Hochsalzdiät auf, beim Vergleich von Normal- und Niedrigsalzdiät war die Salzabhängigkeit jedoch nicht zu sehen. Auch bei den 11 Monate alten Mäusen waren die Werte der (-/-) Tiere tendenziell niedriger als bei den Wildtypen. Die älteren Mäuse hatten auf Niedrigsalzdiät im Mittel eine fast doppelt so hohe U_{KreaV} wie die jüngeren Tiere, wobei diese Unterschiede nicht signifikant waren. Auch bei den beiden anderen Salzdiäten war kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Weder der Vergleich von Knockout- und Wildtyp-Tieren, noch der, der beiden Altersgruppen zeigte große Unterschiede bezüglich der Kreatininkonzentration im Plasma. Während beim Vergleich der Normal- und der Niedrigsalz-Diäten nur

geringfügige Unterschiede zu erkennen waren, fanden sich auf Hochsalzdiät teilweise signifikant höhere Werte als auf den beiden anderen Diäten.

7.1.4.2 Glomeruläre Filtrationsrate, mittels Kreatininclearance bestimmt

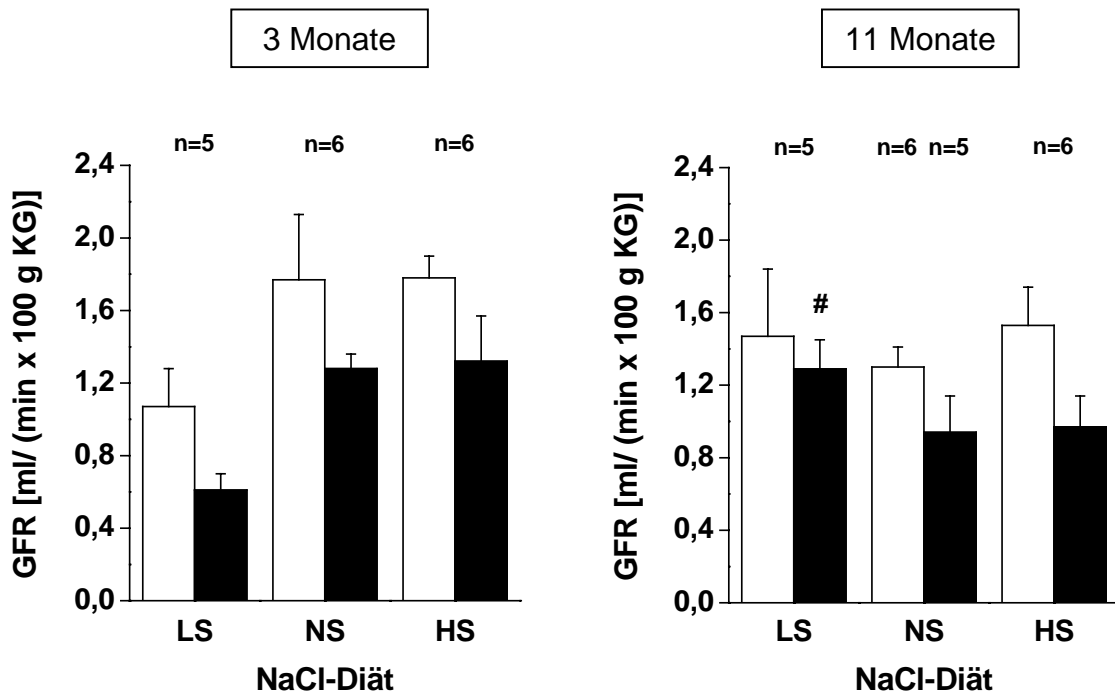


Abb. 7.21: Glomeruläre Filtrationsrate von 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) \square und (-/-) \blacksquare Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte.
#) $p < 0,05$ vs. respektive junge Tiere.

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) war bei den 3 Monate alten Knockout-Mäusen unter allen 3 Kochsalzdiäten niedriger als bei den Wildtypen, die Unterschiede erreichten jedoch nicht statistische Signifikanz (Abb. 7.21). Unter Niedrigsalzbedingungen war die GFR mit $0,61 \pm 0,09$ und $1,07 \pm 0,21$ ml/ (min x 100 g KG) bei den (-/-) bzw. (+/+) Mäusen tendenziell niedriger als unter Normalsalz- ($1,28 \pm 0,08$ bzw. $1,77 \pm 0,36$ ml/ (min x 100 g KG) und Hochsalzbedingungen ($1,32 \pm 0,25$ bzw. $1,78 \pm 0,12$ ml/ (min x 100g KG).

Auch bei den 11 Monate alten (-/-) Mäusen war die gegenüber (+/+) Tieren grundsätzlich niedrigere GFR (tendenziell, nicht signifikant), zu beobachten. Im Gegensatz zu den jungen Tieren war hier jedoch nicht die niedrigste GFR unter Niedrigsalzernährung festzustellen, vielmehr waren die GFR Werte der beiden Genotypen unter den jeweiligen Salzbedingungen ähnlich und betragen zwischen $0,94 \pm 0,20$ und $1,53 \pm 0,21$ ml/ (min x 100 g KG).

7.1.5 Dopaminbestimmung im Urin, Plasma und Nierengewebe von Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen mittels HPLC

Um den Einfluss des fehlenden Dopamin D₃ Rezeptors auf den Plasmadopamingehalt, den Dopamingehalt im Nierengewebe und die Dopaminurinausscheidung zu untersuchen, wurden von Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäusen, welche zuvor für 4 Wochen auf Niedrig-, Normal- oder Hochsalzdiät gehalten wurden, Urin gesammelt, Blut abgenommen und anschließend die Tiere getötet und die Nieren entnommen. Die Dopaminurinausscheidung und der Dopamingehalt im Nierengewebe wurden mit Hilfe des Makro-HPLC- und der Dopamingehalt im Plasma mit Hilfe des Mikro-HPLC-Verfahrens bestimmt (siehe 5.3).

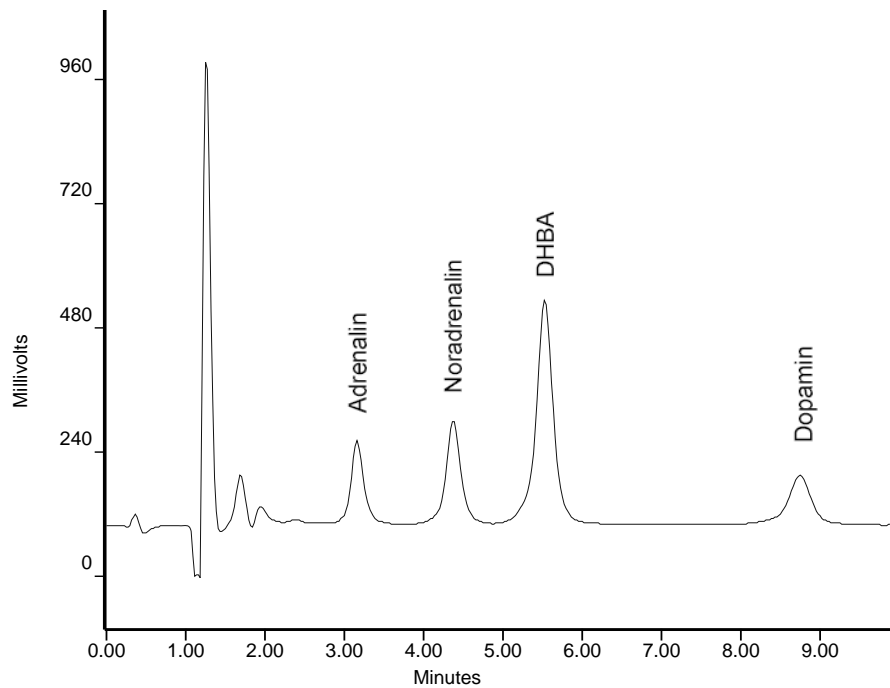


Abb. 7.22: Chromatogramm der Katecholamin-Standards mittels Makro-HPLC bestimmt. Das Elektrodenpotential des Detektors lag bei 0,6 V, der Offset bei 150 nA und der Filter bei 20 s.

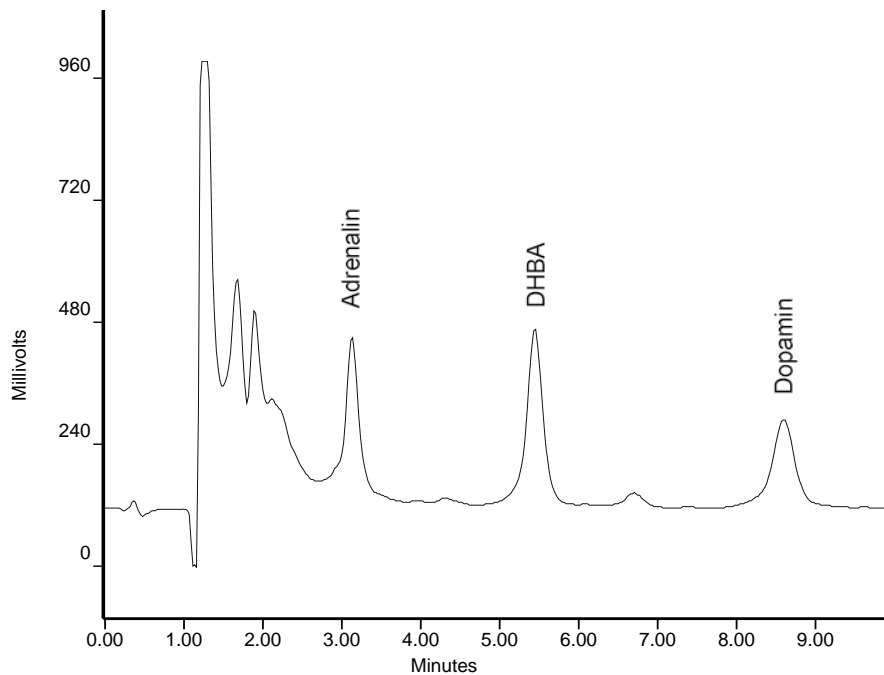


Abb. 7.23: Beispielchromatogramm von Katecholaminen im Urin einer Dopamin D_3 Rezeptor Knockout-Maus, mittels Makro-HPLC bestimmt.

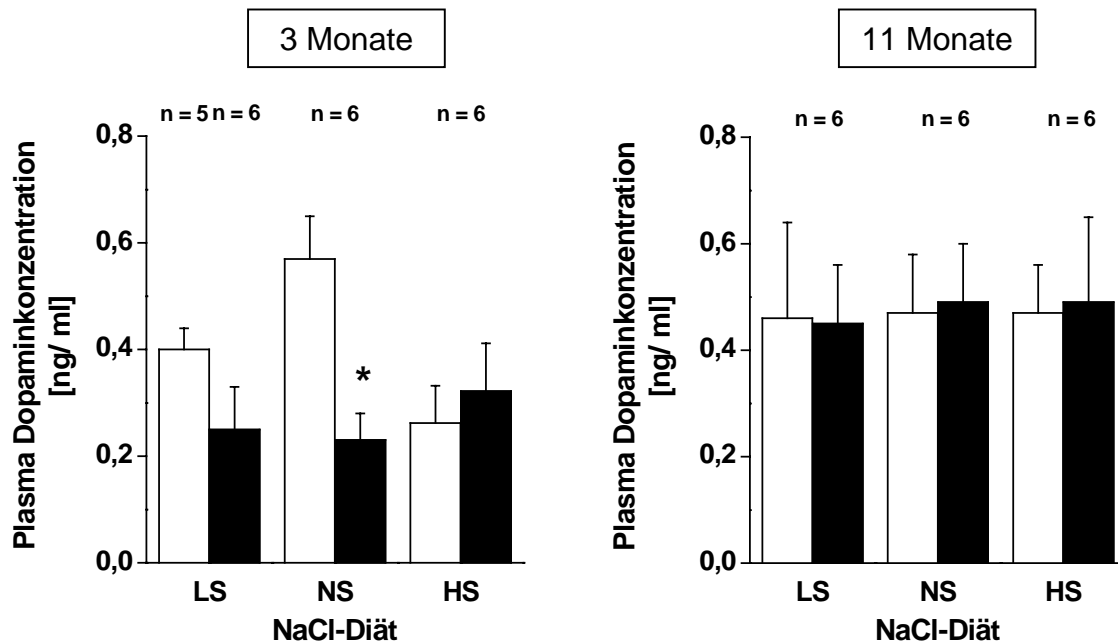


Abb. 7.24: Dopaminkonzentration im Plasma von 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) □ und (-/-) ■ Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. *) $p < 0,05$ vs. D_3 Rezeptor (+/+).

Die Plasma Dopaminkonzentrationen der 3 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor Knockout-Mäuse zeigten keine großen Unterschiede auf den 3 verschiedenen NaCl-Diäten. Die Werte lagen zwischen $0,23 \pm 0,05$ ng/ ml und $0,32 \pm 0,1$ ng/ ml. Die Unterschiede bei den altersgleichen Kontrolltieren auf den verschiedenen Diäten waren etwas größer (tendenziell, nicht signifikant). Bei den niedrigsalzernährten (+/+) Mäusen war die Plasma Dopaminkonzentration im Mittel bei $0,40 \pm 0,05$ ng/ ml, bei denjenigen auf Normalsalzdiät bei $0,57 \pm 0,08$ ng/ ml und bei den Mäusen auf Hochsalzdiät bei $0,26 \pm 0,07$ ng/ ml. Die Unterschiede zwischen den 3 Monate alten Genotypen waren, abgesehen von den Mäusen auf NS-Diät, nicht besonders groß. Die Unterschiede zwischen den 11 Monate alten (-/-) und (+/+) Tieren waren noch kleiner. Weder zwischen den verabreichten Salzdiäten, noch zwischen den beiden Genotypen gab es signifikante Unterschiede. Die Werte lagen zwischen $0,45 \pm 0,12$ ng/ ml und $0,49 \pm 0,12$ ng/ ml bei den Knockout- und zwischen $0,46 \pm 0,20$ ng/ ml und $0,47 \pm 0,10$ ng/ ml bei den entsprechenden Wildtyp-Tieren. Allerdings waren die Plasma Dopaminkonzentrationen der 11 Monate alten Mäuse, abgesehen von den normalsalzernährten (+/+) Tieren, höher als die der jüngeren auf der entsprechenden NaCl-Diät, erreichten aber nicht das Signifikanzniveau.

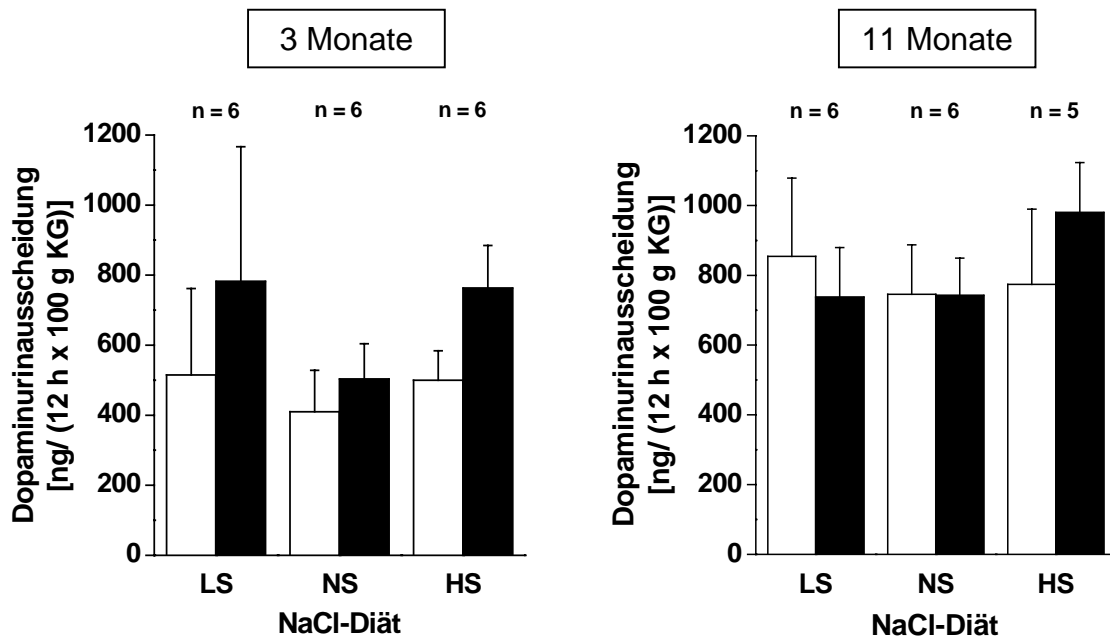


Abb. 7.25: Dopaminurinausscheidung von 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) □ und (-/-) ■ Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte.

Die Dopaminurinausscheidung der 3 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) Mäuse war mit Werten zwischen 503 ± 100 und 781 ± 384 ng/ (12 h x 100 g KG) tendenziell höher als die der altersgleichen Kontrolltiere mit Werten zwischen 410 ± 118 und 515 ± 246 ng/ (12 h x 100 g KG). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Diäten waren bei den jüngeren Tieren nicht signifikant verschieden, wobei sowohl die (-/-) als auch die (+/+) Tiere auf Normalsalz eine tendenziell niedrigere Ausscheidung zeigten als auf den beiden anderen Diäten. Bei den 11 Monate alten Mäusen waren kaum Unterschiede zwischen den Genotypen und den verabreichten NaCl-Diäten zu erkennen. Bei den älteren Knockout-Tieren lag die Dopaminurinausscheidung zwischen 737 ± 142 und 980 ± 143 ng/ (12 h x 100 g KG). Bei den gleichaltrigen (+/+) Mäusen waren die Werte zwischen 745 ± 141 und 854 ± 224 ng/ (12 h x 100 g KG). Die älteren Mäuse hatten, abgesehen von den Knockout-Tieren auf Niedrigsalzdiät, insgesamt eine höhere Dopaminurinausscheidung – jeweils auf den entsprechenden Genotyp und Salzdiät bezogen - als die jüngeren, erreichten aber nicht das Signifikanzniveau.

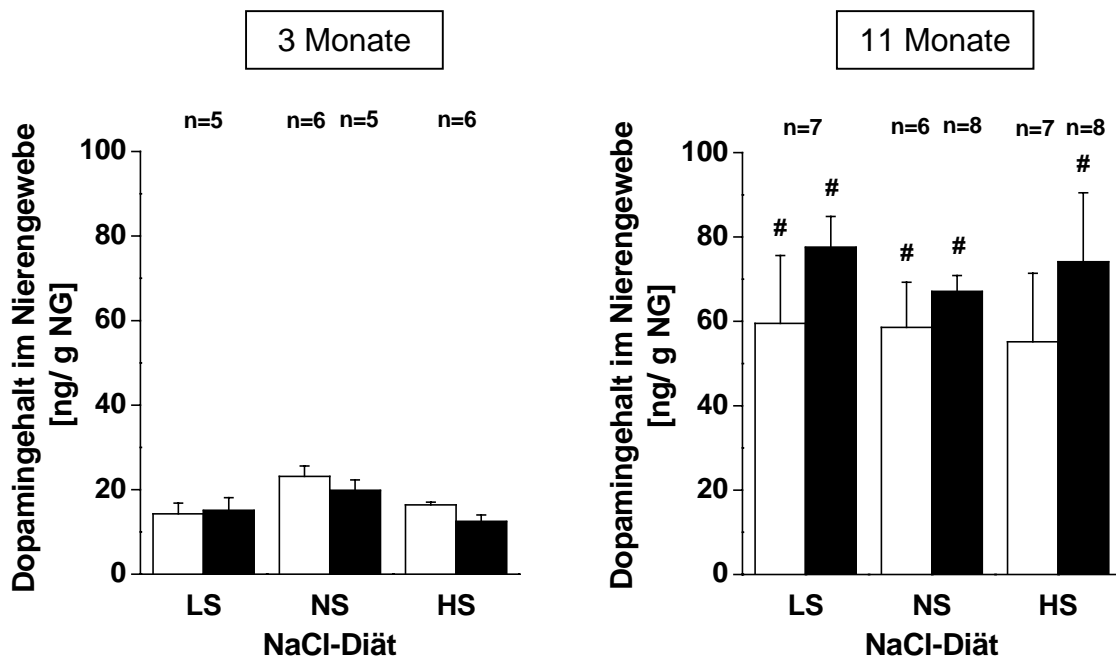


Abb. 7.26: Dopamingehalt im Nierengewebe von 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) \square und (-/-) \blacksquare Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. NG=Nierenfeuchtgewicht. #) $p < 0,05$ vs. respektive junge Tiere.

Der Dopamingehalt im Nierengewebe der 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse ist in Abb. 7.26 dargestellt. Die beiden Genotypen zeigten im Alter von 3 Monaten nur geringe Unterschiede. Die Mittelwerte der jüngeren (-/-) Mäuse lagen zwischen $12,5 \pm 1,5$ und $19,8 \pm 2,5$ ng/ g NG und die der (+/+) Mäuse zwischen $14,3 \pm 2,5$ und $23,1 \pm 2,5$ ng/ g NG, wobei der Gehalt bei beiden normalsalzernährten Genotypen tendenziell höher war. Die 11 Monate alten Mäuse hatten auf allen 3 verabreichten NaCl-Diäten einen höheren Dopamingehalt im Nierengewebe als die jüngeren Tiere. Innerhalb dieser Altersgruppe hatten die (-/-) Mäuse außerdem mit Werten zwischen $67,1 \pm 3,8$ und $77,5 \pm 7,3$ ng/ g NG tendenziell einen höheren Dopamingehalt im Nierengewebe als die entsprechenden Kontrolltiere mit Werten zwischen $55,2 \pm 16,3$ und $59,5 \pm 16,1$ ng/ g NG. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Diätgruppen waren gering. Der höhere Dopamingehalt der 11 Monate alten Mäuse könnte darauf hindeuten, dass entweder die Dopaminrezeptordichte oder die Empfindlichkeit der Rezeptoren im Alter abnimmt. Des Weiteren könnte der tendenziell höhere Dopamingehalt der 11 Monate alten (-/-) Mäuse auf einen Kompensationsmechanismus hinweisen.

7.1.6 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System von Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Ein Zusammenhang zwischen renalem Dopamin und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System wurde bereits vorgeschlagen (Kurtz et al. 1988), (Antonipillai et al. 1989), (Hano et al. 1995), (Yamaguchi et al. 1997). Einige Experimente deuten auch auf einen direkten Zusammenhang zwischen dem Dopamin D₃ Rezeptor und dem Angiotensin II (AT₁) Rezeptor hin. Um zu prüfen, wie das dopaminerge und das RAA-System in diesem Knockout-Modell zusammenhängen, wurden zunächst die Plasmareninaktivität und Plasmaaldosteronkonzentration der (-/-) und (+/+) Mäuse bestimmt. Im Anschluss daran wurde der Zusammenhang zwischen den Dopamin D₃ Rezeptoren in diesem Knockout-Modell und den AT₁ Rezeptoren durch die Injektion verschiedener Angiotensin II Dosierungen untersucht.

7.1.6.1 Plasmareninaktivität

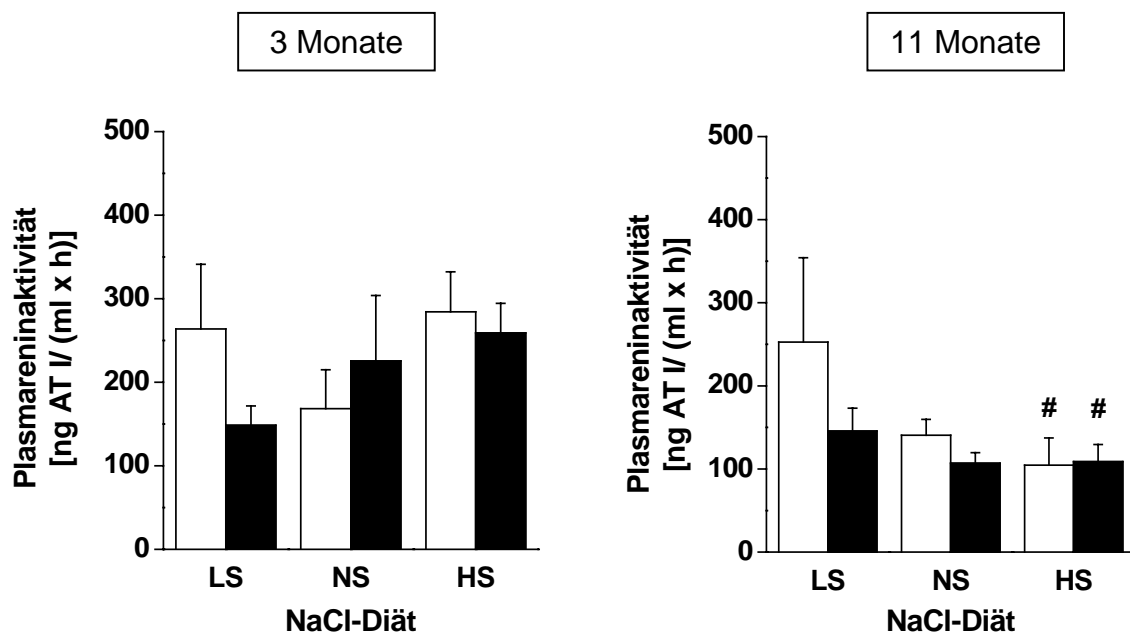


Abb. 7.27: Plasmareninaktivität von 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) □ (n=6) und (-/-) ■ (n=6) Mäusen auf Niedrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. #) p<0,05 vs. respektive junge Tiere.

Die Plasmapreninaktivität der jungen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse folgte nicht, wie erwartet, den verabreichten NaCl-Diäten. Die niedrigsalzernährten (-/-) Tiere hatten eine Aktivität von $148,5 \pm 23,2$ ng AT I/ (ml x h). Auf Normalsalzdiät war der Wert wider Erwarten mit $225,3 \pm 78,6$ ng AT I/ (ml x h) tendenziell höher als auf LS-Diät und auf Hochsalz mit $259,0 \pm 35,3$ ng AT I/ (ml x h) schließlich noch höher. Die altersgleichen Wildtypen hatten auf Niedersalz eine Plasmapreninaktivität von $263,6 \pm 77,7$ ng AT I/ (ml x h). Auf Normalsalz waren die Werte der jungen (+/+) Mäuse mit $168,4 \pm 46,4$ ng AT I/ (ml x h) am niedrigsten, dafür aber auf Hochsalz mit $284,33 \pm 47,8$ ng AT I/ (ml x h) wieder vergleichbar mit den Tieren auf Niedersalzdiet. Die Plasmapreninaktivität der 11 Monate alten Mäuse war annähernd so wie man es bei den verabreichten NaCl-Diäten erwartet hätte. Auf LS-Diät lagen die Werte der (-/-) bzw. (+/+) Tiere mit $145,5 \pm 27,7$ ng AT I/ (ml x h) bzw. $252,6 \pm 101,5$ ng AT I/ (ml x h) tendenziell am höchsten innerhalb der jeweiligen Gruppe. Die Knockout-Mäuse hatten auf Normalsalz mit $107,0 \pm 12,5$ ng AT I/ (ml x h) eine ähnliche Aktivität wie die hochsalzernährten Tiere, mit $108,8 \pm 20,8$ ng AT I/ (ml x h). Die älteren (+/+) Mäuse hatten mit $140,7 \pm 19,0$ ng AT I/ (ml x h) eine tendenziell niedrigere Aktivität als die niedrigsalzernährten Mäuse, erreichten aber nicht das Signifikanzniveau, genau wie die Wildtyp-Tiere auf Hochsalzdiet, welche mit $104,6 \pm 32,8$ ng AT I/ (ml x h) im Vergleich zu den Tieren auf NS-Diät eine tendenziell niedrigere Aktivität aufwiesen. Die Unterschiede zwischen den 3 und 11 Monate alten Mäusen auf Normal- und auf Hochsalzdiet kommen durch die zunächst nicht physiologisch erklärbaren Aktivitäten der jüngeren Tiere auf diesen Diäten zustande.

7.1.6.2 Plasma Aldosteronkonzentration

Den Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäusen im Alter von 3 und 11 Monaten, welche zuvor 4 Wochen auf Niedrig-, Normal- oder Hochsalzdiet gehalten wurden, wurde Blut über die retroorbitale Vene abgenommen, und die Plasmaaldosteronkonzentration mit Hilfe eines handelsüblichen Radioimmunoassays (Aldosteron Radioimmunoassay Kit No. 1664, Immunotech, Marseilles, Frankreich) bestimmt.

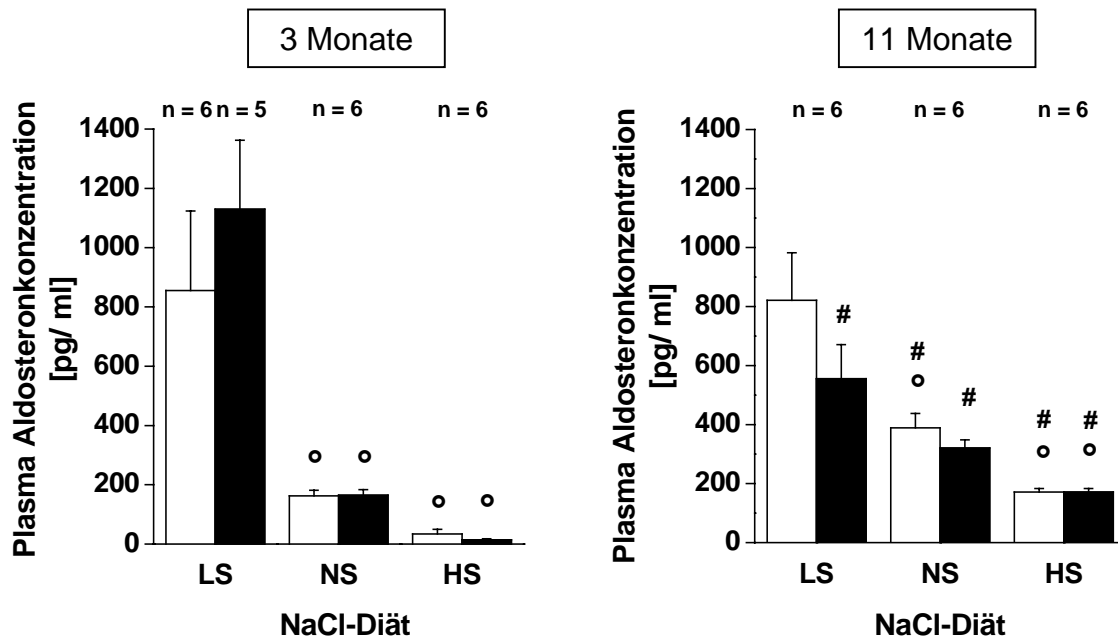


Abb. 7.28: Plasma Aldosteronkonzentration von 3 und 11 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (+/+) \square und (-/-) \blacksquare Mäusen auf Nidrigsalz-, Normalsalz- und Hochsalzdiät. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der jeweiligen Diätabschnitte. $^{\circ}) p < 0,05$ vs. respektive LS-Gruppe, $^{\#}) p < 0,05$ vs. respektive junge Tiere.

Die 3 Monate alten Dopamin D_3 Rezeptor (-/-) Mäuse zeigten die erwarteten Unterschiede bezüglich der Plasma Aldosteronkonzentration auf den unterschiedlichen NaCl-Diäten, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knockout- und den Wildtyp-Mäusen zu erkennen waren. Auf Nidrigsalzdiät wurde das RAA-System innerhalb dieses Experimentes maximal herausgefordert und die Aldosteronkonzentration war bei den (-/-) Mäusen mit $1129,8 \pm 232,7$ pg/ml signifikant höher als auf den anderen beiden Salzdiäten. Auf NS-Diät war die Aldosteronkonzentration mit $164,8 \pm 18,7$ pg/ml höher als bei den hochsalzernährten Tieren mit Werten von $13,9 \pm 3,9$ pg/ml. Der Unterschied war zwar im Paarvergleich (t-Test) signifikant, erreichte aber bei der Varianzanalyse (ANOVA) nicht das Signifikanzniveau. Ähnlich verhielt es sich bei den 3 Monate alten Wildtyp-Mäusen. Auf der Nidrigsalzdiät war die Konzentration bei diesen mit $855,2 \pm 268,36$ pg/ml niedriger als bei den entsprechenden (-/-) Tieren, wohingegen die Werte der normalsalzernährten mit $162,5 \pm 19,0$ pg/ml, mit denen der Knockout-Mäuse vergleichbar waren. Die Aldosteronkonzentration der (+/+) Mäuse auf HS-Diät war mit $34,2 \pm 15,3$ pg/ml in der gleichen Größenordnung wie die der (-/-) Tiere. Auch bei den 11 Monate alten Mäusen waren die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen klein. Die Aldosteronkonzentration der Knockout-Tiere auf Nidrigsalzdiät

war zwar mit $555,6 \pm 115,19$ pg/ ml höher als die der normalsalzernährten Mäuse mit $320,3 \pm 27,9$ pg/ ml, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant, wohingegen die Werte der hochsalzernährten Mäuse mit $171,9 \pm 11,4$ pg/ ml signifikant niedriger waren als auf LS-Diät. Die Aldosteronkonzentration der 11 Monate alten niedrigsalzernährten (+/+) Mäuse war mit $821,1 \pm 161,3$ pg/ ml signifikant höher als die der normalsalzernährten Tiere mit $388,7 \pm 48,9$ pg/ ml und diese wiederum signifikant höher als bei den Tieren auf Niedrigsalzdiät mit $171,3 \pm 12,1$ ng/ ml. Die Aldosteronkonzentration der 11 Monate alten (-/-) Tiere war auf LS-Diät deutlich niedriger als die der jüngeren, wohingegen der Unterschied zwischen den 3 und den 11 Monate alten Wildtyp-Mäusen unter den gleichen Diät-Bedingungen gering war. Die Aldosteronkonzentration der 11 Monate alten Tiere war sowohl auf Normal- als auch auf Hochsalzdiät signifikant höher als die der jüngeren Mäuse, was darauf hindeuten könnte, dass die Flexibilität des RAA-Systems auf wechselnde NaCl-Beladungen im Alter etwas abnimmt.

7.1.6.3 Systolische Blutdruckveränderungen bei Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen unter dem Einfluss von humanem Angiotensin II

3 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen wurde unter Narkose humanes Angiotensin II in aufsteigenden Dosierungen intravenös verabreicht. Während diesen Experimenten wurde der Einfluss von AT II auf den Blutdruck aufgezeichnet.

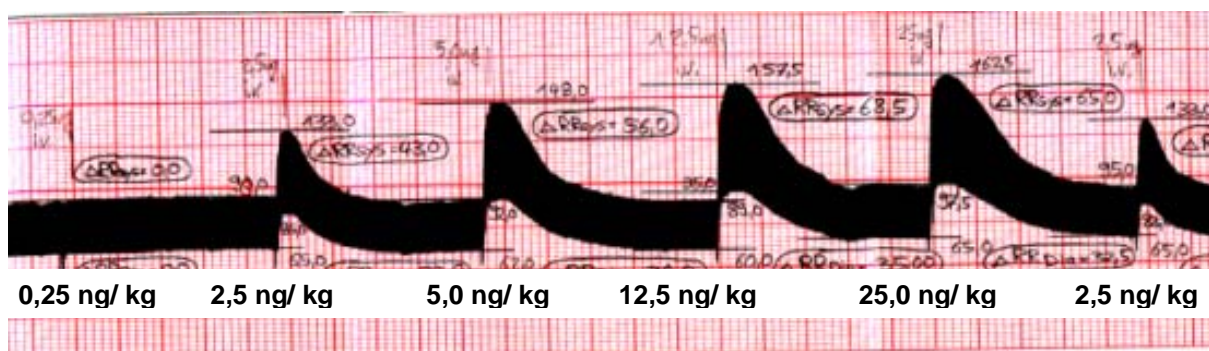


Abb. 7.29: Blutdruckverlaufskurve nach Angiotensin II-Applikationen bei einer Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Maus. Dem Tier wurden Vehikel (0,85 %-ige NaCl-Lösung) – nicht dargestellt - und aufsteigende Dosierungen (0,25; 2,5; 5,0; 12,5 und 25 ng/ kg) humanes Angiotensin II i.v. appliziert. Im Anschluss an die höchste Dosierung wurde nochmals 2,5 ng/ kg AT II injiziert, um zu zeigen, dass die Blutdruckeffekte nicht durch kumulierendes AT II verursacht wurden.

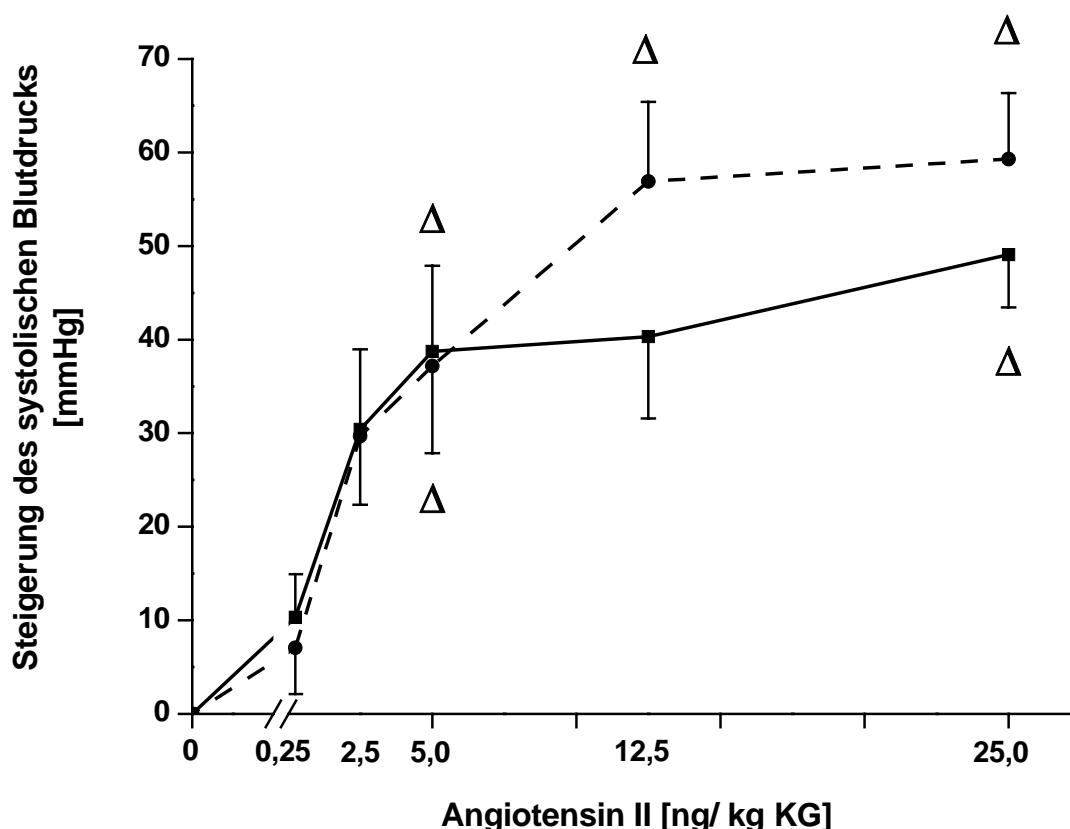


Abb. 7.30: Dosis-Wirkungs-Kurve von humanem Angiotensin II bei 3 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (+/+) \blacksquare (n=6-11) und (-/-) \bullet (n=5-9) Mäusen. Den Tieren wurden Vehikel (0,85 %-ige NaCl-Lösung=0) und aufsteigende Dosierungen 0,25; 2,5; 5,0; 12,5 und 25 ng/ kg humanes Angiotensin II i.v. appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. ⁴⁾ p<0,05 vs. 0,25 ng/ kg AT II.

Angiotensin II in den Dosierungen von 0,25 bis 25,0 ng/ kg KG, verursachte eine konzentrationsabhängige Steigerung des systolischen Blutdruckes bei den Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen. Bei einer Dosierung von 0,25 ng/ kg KG nahm der systolische Blutdruck bei den (-/-) Mäusen um $7,1 \pm 4,9$ mmHg und bei den (+/+) Tieren um $10,3 \pm 4,6$ mmHg zu. Bei einer Dosierung von 5,0 ng/ kg KG war die Blutdrucksteigerung mit $37,2 \pm 9,3$ mmHg bei den Knockout-Tieren und mit $38,7 \pm 9,1$ mmHg bei den (+/+) Mäusen signifikant höher als bei der vorhergehenden Dosierung. Der Blutdruck der Wildtyp-Mäuse war bereits ab einer Dosierung von 5,0 ng/ kg KG nicht mehr in dem Ausmaß zu steigern, wie bei den (-/-) Tieren. Bei den Dosierungen von 12,5 ng/ kg KG war die Zunahme des Blutdruckes bei den Knockout-Tieren bei $56,9 \pm 8,5$ mmHg tendenziell höher als bei den (+/+) Mäusen,

bei welchen der Blutdruck nur um $40,3 \pm 8,8$ mmHg zunahm. Bei einer Dosierung von 25 ng/kg KG stiegen die Werte der (-/-) Mäuse mit $59,3 \pm 7,1$ mmHg im Vergleich zur vorhergehenden Dosis nur noch wenig an, während die der entsprechenden Wildtyp-Mäuse, mit $49,1 \pm 5,6$ mmHg zwar weiterhin tendenziell niedriger als die der Knockout-Tiere waren, aber im Vergleich zur vorhergehenden Dosis noch etwas anstiegen.

Die tendenziellen Unterschiede zwischen den Knockout- und Wildtyp-Tieren bei den höheren Dosierungen könnten darauf hindeuten, dass bei den (-/-) Mäusen durch den fehlenden Einfluss des Dopamin D₃ Rezeptors, das RAA-System, insbesondere die AT₁ Rezeptoren, sensibilisiert oder höher exprimiert werden.

7.2. Superfusion von isolierten juxtaglomerulären Zellen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss Dopaminrezeptoren auf die Reninsekretion aus juxtaglomerulären Zellen haben, wurden diese für die jeweiligen Experimente aus Rattennieren isoliert. Dabei wurden die Nieren mechanisch zerkleinert, durch enzymatische Digestion aufgeschlossen und die erhaltene Suspension im Dichtegradienten zentrifugiert. Die Zellsuspension wurde dann in speziell für diese Versuche angefertigte Superfusionskammern gebracht und mit den entsprechenden Substanzen superfundiert. Das Superfusat wurde in 20 Minuten Perioden gesammelt und die darin enthaltene Reninaktivität mittels Radioimmunoassay bestimmt (siehe 4.2 und 5.5.1).

7.2.1 Isolierte juxtaglomeruläre Zellen

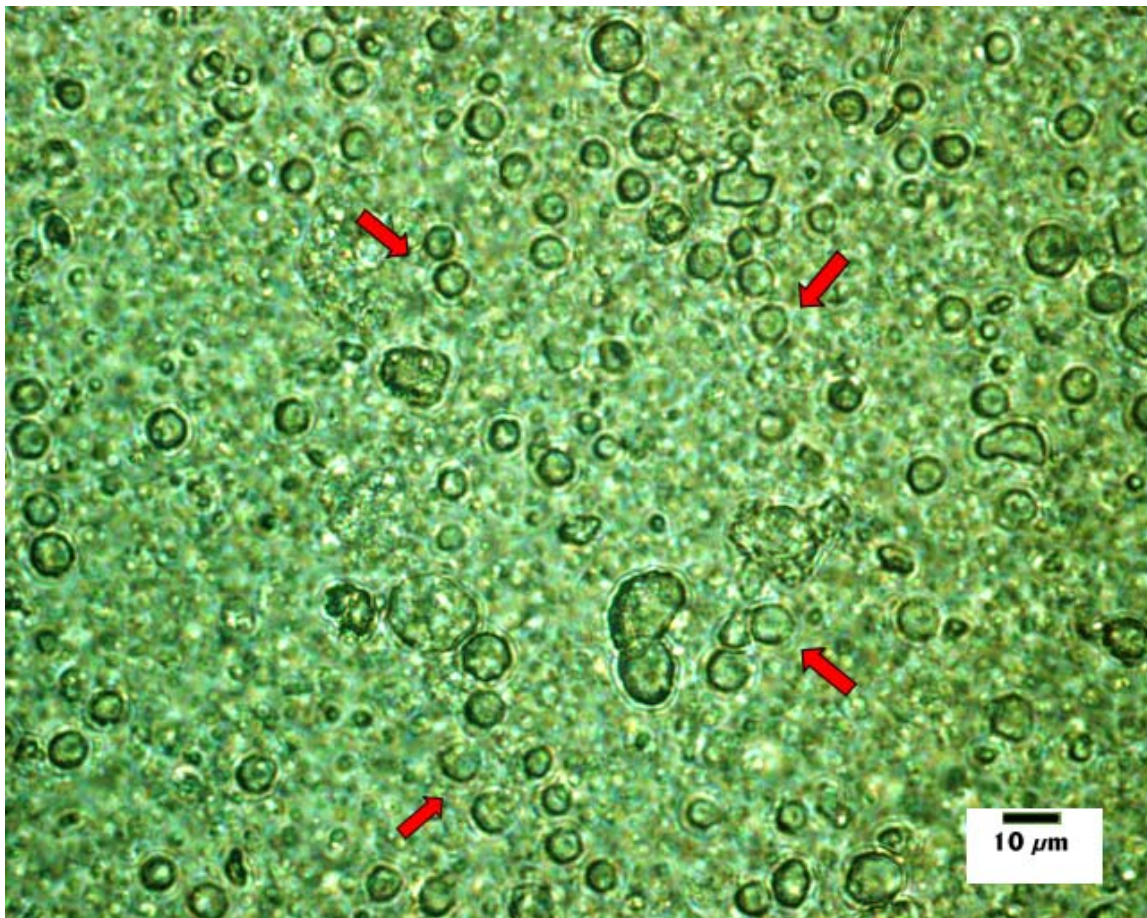


Abb. 7.31: Isolierte juxtaglomerulären Zellen (Maßstab x60). Die Pfeile zeigen 4 Beispiele der reninsezernierenden Zellen, welche einen hellen Rand mit einem sich deutlich abgrenzenden Innenbereich aufweisen.

7.2.1.2 Angiotensin I Standardkurve

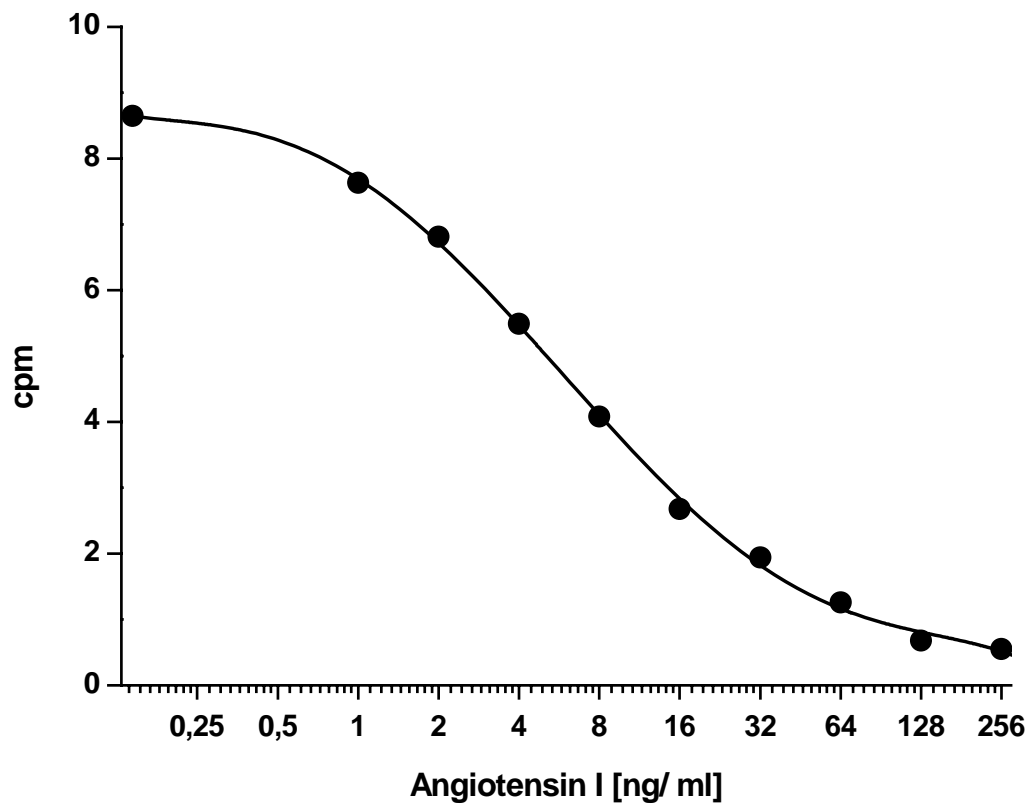


Abb. 7.32: Beispiel einer Angiotensin I Standardkurve eines Radioimmunoassays zur Bestimmung der Reninaktivität.

Als Berechnungsgrundlage für den Radioimmunoassay zur Bestimmung der Reninaktivität wurde eine Standardkurve mit humanem Angiotensin I, in den Konzentrationen von 1,0 bis 256 ng/ ml, verwendet. Aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit von ^{125}I wurde für jedes Experiment eine neue Standardkurve erstellt. Wie am Beispiel in Abb. 7.32 zu erkennen ist, sind bei den niedrigeren Konzentrationen, entsprechend dem Prinzip des zugrundeliegenden Radioimmunoassays (siehe 5.5.1), die counts per minute (cpm) kleiner als bei den hohen. Die Berechnung der Reninaktivität erfolgt automatisch mit Hilfe dieser Standardkurve nach der unter 6.3 beschriebenen Formel.

7.2.1.3 Einfluss von Vitamin C als Antioxidanz auf die Reninsekretion

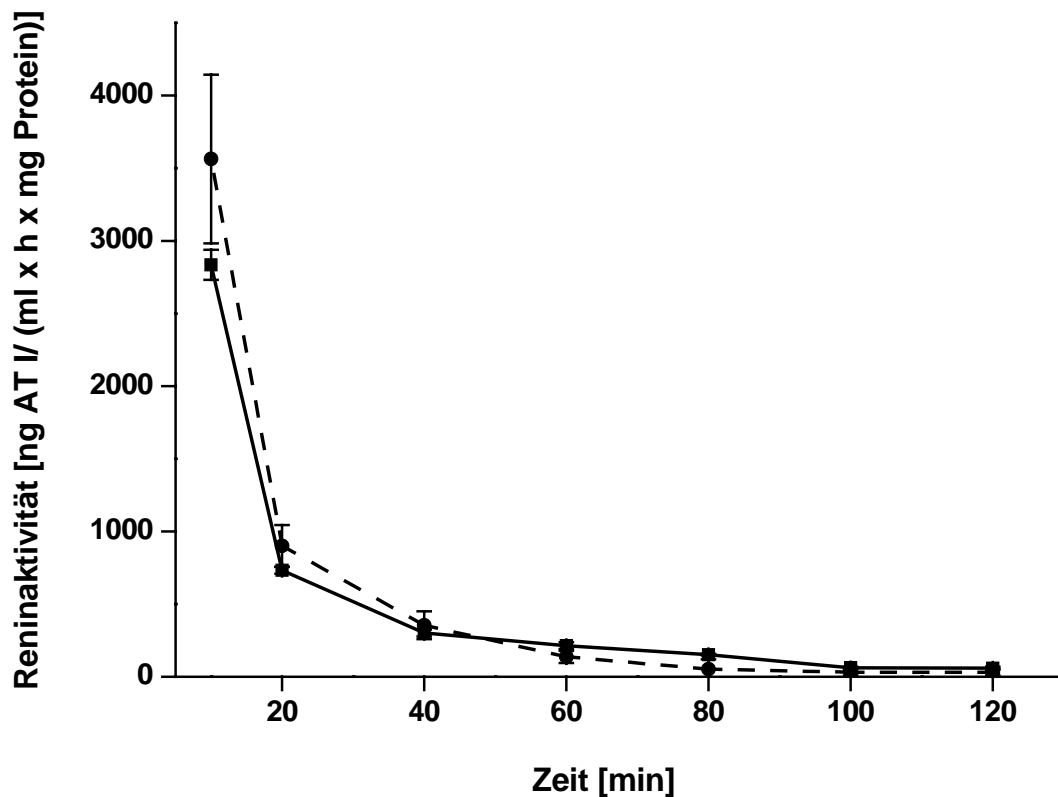


Abb. 7.33: Superfusion von reninsezernierenden Zellen mit Kontrollpuffer \blacksquare ($n=5$ Kammern) und Kontrollpuffer + Ascorbinsäure \bullet ($n=5$ Kammern) über einen Zeitraum von 2 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Katecholamine, darunter auch Dopamin, sind oxidationsempfindlich. Durch den als Adenochromreaktion bezeichneten Vorgang kommt es im Laufe mehrerer Reaktionsschritte zu einem Ringschluss. Dabei ändert sich die Struktur des Moleküls und die entstehenden Verbindungen absorbieren Licht in einem anderen Wellenlängenbereich, d.h. eine Lösung mit der entsprechenden Substanz verfärbt sich. Licht, Wärme und pH-Werte im alkalischen Bereich begünstigen diese Redox-Reaktion. Um diesen Vorgang zu unterbinden und die Katecholamine zu schützen, wurden diese in einer 0,1 %-igen Ascorbinsäurelösung, als Oxidationsschutz, superfundiert.

Abb. 7.33 zeigt, dass das Antioxidanz selbst keinen Einfluss auf die Reninaktivität der superfundierten juxtaglomerulären Zellen hat. Die Ascorbinsäurelösung wurde nur für Experimente verwendet, bei welchen oxidationsempfindliche Substanzen eingesetzt wurden.

7.2.1.4 Viabilität der reninsezernierenden Zellen unter dem Einfluss von Dopamin

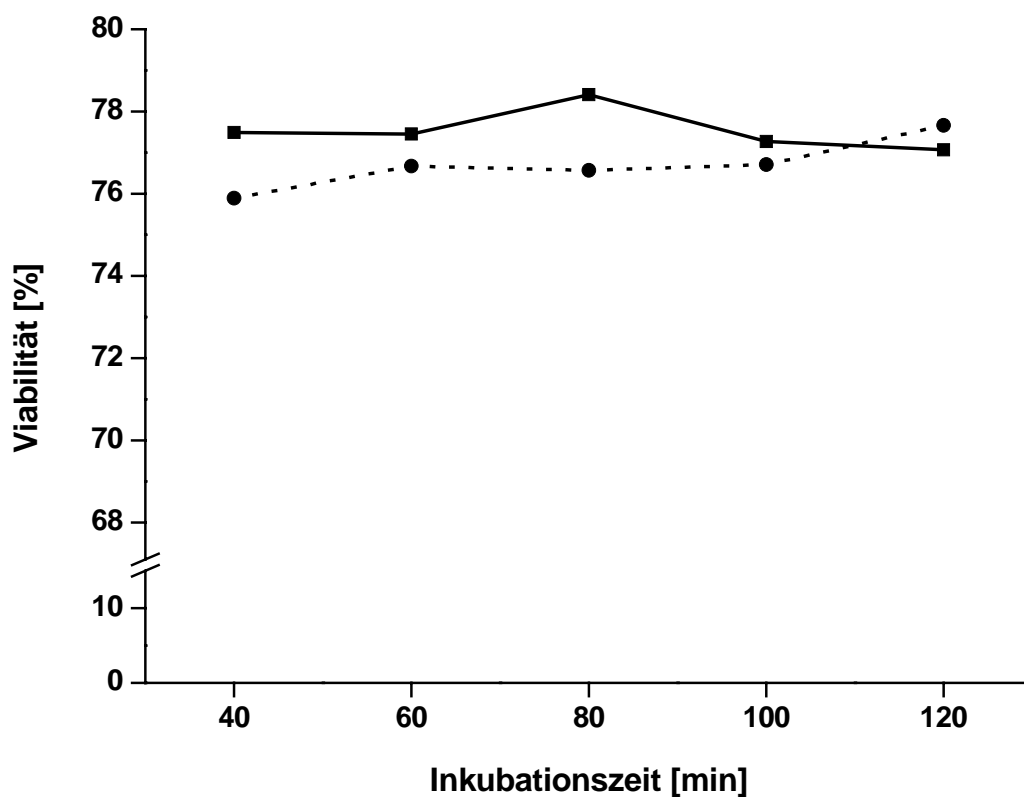


Abb. 7.34: Inkubation von reninsezernierenden Zellen mit Kontrollpuffer + Vitamin C + Dopamin 10^{-5} M \blacksquare und Kontrollpuffer \bullet über einen Zeitraum von 40 bis 120 Minuten. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde die Viabilität der Zellen mit Hilfe des Zellzählgerätes „CASY®“ bestimmt.

Um einerseits zu klären, ob sich die Viabilität der Zellen innerhalb der Suspension während des Verlaufes eines Experimentes verändert und andererseits, ob Dopamin selbst, oder der Oxidationsschutz Vitamin C, die Viabilität der Zellen beeinträchtigt, wurde eine Zellsuspension über den entsprechenden Versuchszeitraum mit

Kontrollpuffer oder der ascorbinsäure- und dopaminhaltigen Superfusionslösung inkubiert. In 20 Minuten-Perioden wurden Aliquote der Suspensionen abgenommen und die Viabilität mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY[®] bestimmt.

Die Unterschiede zwischen Kontrollpuffer und dem dopaminhaltigen Medium, in Abb. 7.34 dargestellt, sind über den Zeitraum von 40 bis 120 Minuten sehr gering. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Viabilität über die Zeit, weder durch das Kontrollmedium, noch durch Dopamin in einer Konzentration von 10^{-5} M beeinflusst wurde.

7.2.1.5 Zellzahl und Restaktivität auf den Filtern

Bei jeder Präparation wurde, während der Äquilibrierungszeit der Zellen, die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 4.2.2). Diese lag über 10 Experimente gemittelt bei $1\,243\,750 \pm 76\,776$ Zellen (Mittelwert \pm SEM).

Zusätzlich wurde nach jedem Experiment die Renin-Restaktivität auf den Filtern ermittelt (siehe 4.2.8). Die Proben wurden dann mit Hilfe des Radioimmunoassays gemessen. Die Restaktivität auf den Filtern nach der Superfusion war im Mittel (bei $n=10$ Experimenten) bei $1\,807 \pm 213$ ng AT I/ (ml x h x mg Protein) (Mittelwert \pm SEM).

7.2.1.6 Zeitverlaufskurve einer Superfusion von juxtaglomerulären Zellen mit Dopamin

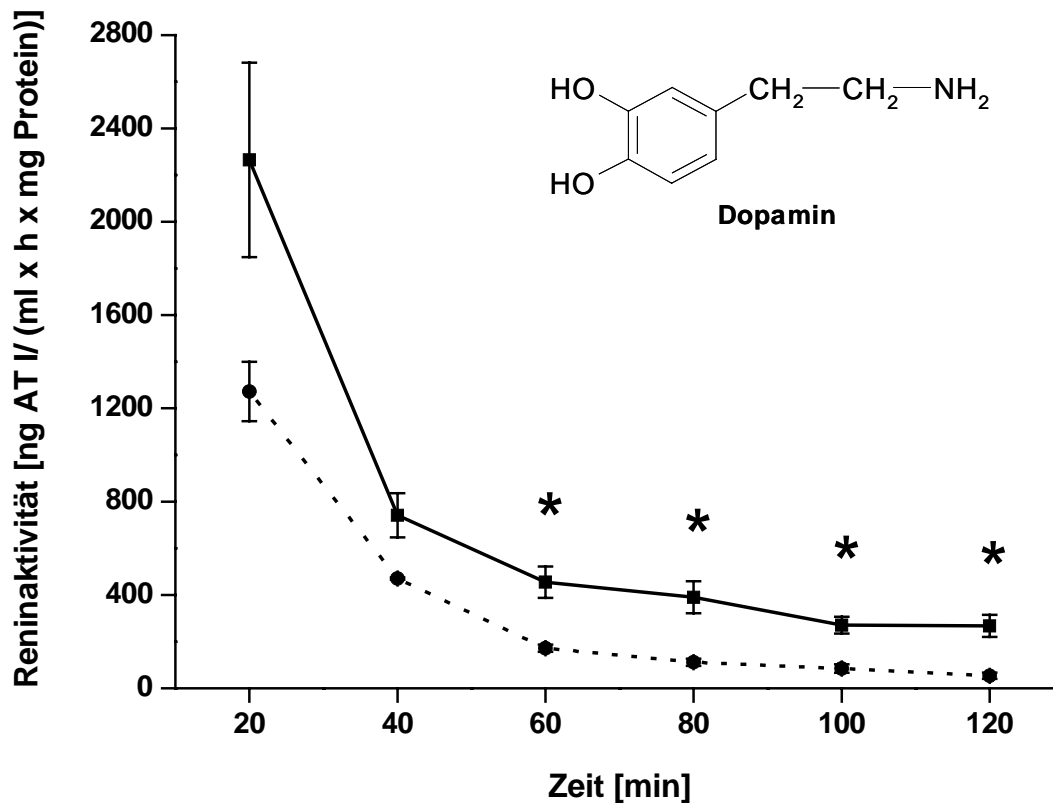


Abb. 7.35: Beispiel einer Zeitverlaufskurve einer Superfusion von renin-sezernierenden Zellen mit Dopamin 10^{-5} M. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kammern eines Experimentes \pm SEM. Kontrolle $\cdots\bullet\cdots$ ($n=3$ Kammern), Dopamin 10^{-5} M $\text{---}\blacksquare\text{---}$ ($n=4$ Kammern). *) $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die Reninsekretion war sowohl bei der Superfusion mit Kontrollpuffer als auch mit Dopamin 10^{-5} M mit Reninaktivitäten von $1272,4 \pm 127,3$ bzw. $2264,82 \pm 416,3$ ng AT I / (ml x h x mg Protein) nach der ersten Sammelperiode sehr viel höher als nach den folgenden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Zellen während der 60-minütigen Äquilibration, im Anschluss an die Präparation, spontan Renin freisetzen, welches mit der ersten Sammelperiode aus der Kammer gespült wurde. Nach 60 Minuten, als die Kammer vollständig mit dem entsprechenden Superfusionsmedium gefüllt war, lag die Reninaktivität unter dem Einfluss von Dopamin 10^{-5} M mit Werten zwischen $455,2 \pm 67,1$ ng AT I / (ml x h x mg Protein) deutlich höher als bei den entsprechenden Kontrollen mit $172,0 \pm 15,8$ ng AT I / (ml x h x mg Protein). Über den

restlichen beobachteten Zeitraum war die Stimulation der Zellen durch Dopamin im Vergleich zur Kontrolle immer noch deutlich zu erkennen.

7.2.1.7 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Dopamin

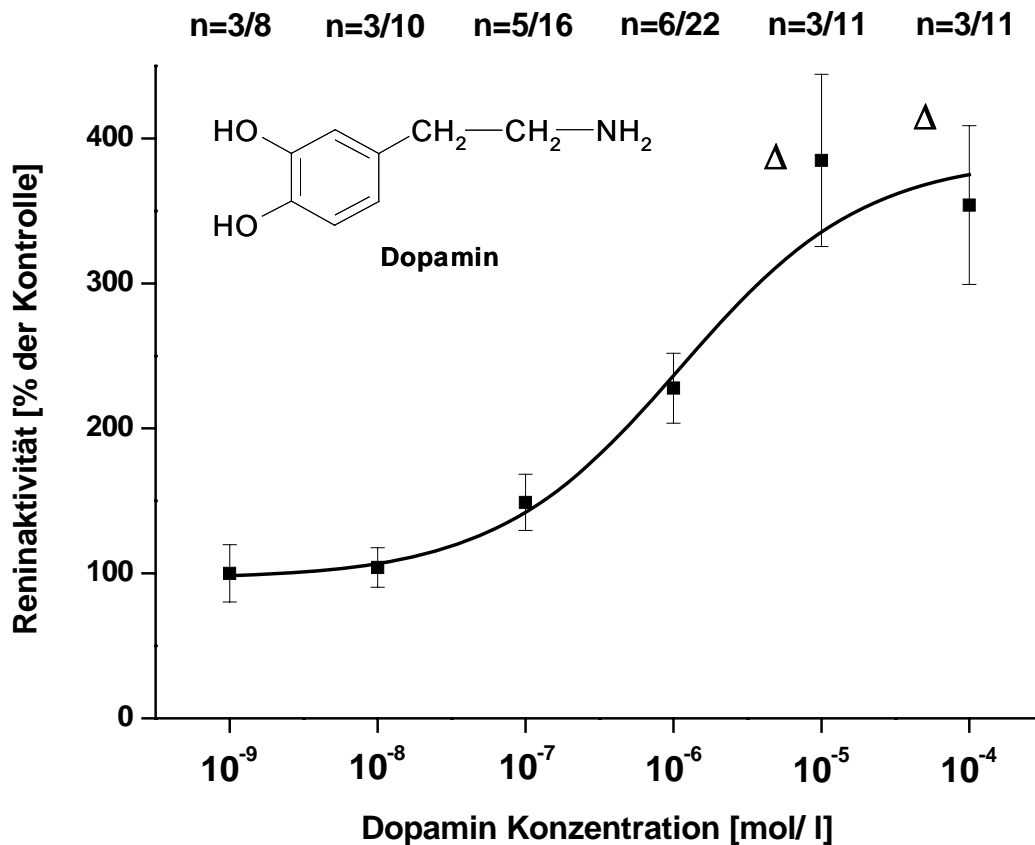


Abb. 7.36: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Dopamin. Die Werte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (100 %). Mittelwerte der einzelnen Kammern \pm SEM, die erste n-Zahl bezieht sich auf die Anzahl der Experimente und die zweite auf die Anzahl der superfundierten Kammern. ⁴⁾ $p < 0,05$ vs. 10^{-9} M.

Abb. 7.36 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Dopamin auf die juxtaglomerulären Zellen. Dabei wurden die 80 Minuten-Sammelperioden der einzelnen Kammern auf die jeweiligen Kontrollen desselben Experimentes, welche als 100 % gesetzt wurden, bezogen. Die sich ergebenden Werte aus den verschiedenen Experimenten wurden zusammengefasst. Dopamin stimulierte die

Reninsekretion konzentrationsabhängig im Bereich von 10^{-9} M mit $100,1 \pm 19,7$ %, über 10^{-6} M mit $227,8 \pm 24,2$ % bis 10^{-4} M mit $354,0 \pm 54,8$ %, bezogen auf die 100 % „Kontrolllinie“. Die EC_{50} , also die Konzentration, welche 50 % des maximal möglichen Effektes von Dopamin als Agonist an den reninsezernierenden Zellen beschreibt, lag bei $1,11 \times 10^{-6}$ M.

7.2.1.8 Zeitverlaufskurve einer Superfusion von juxtaglomerulären Zellen mit Isoprenalin

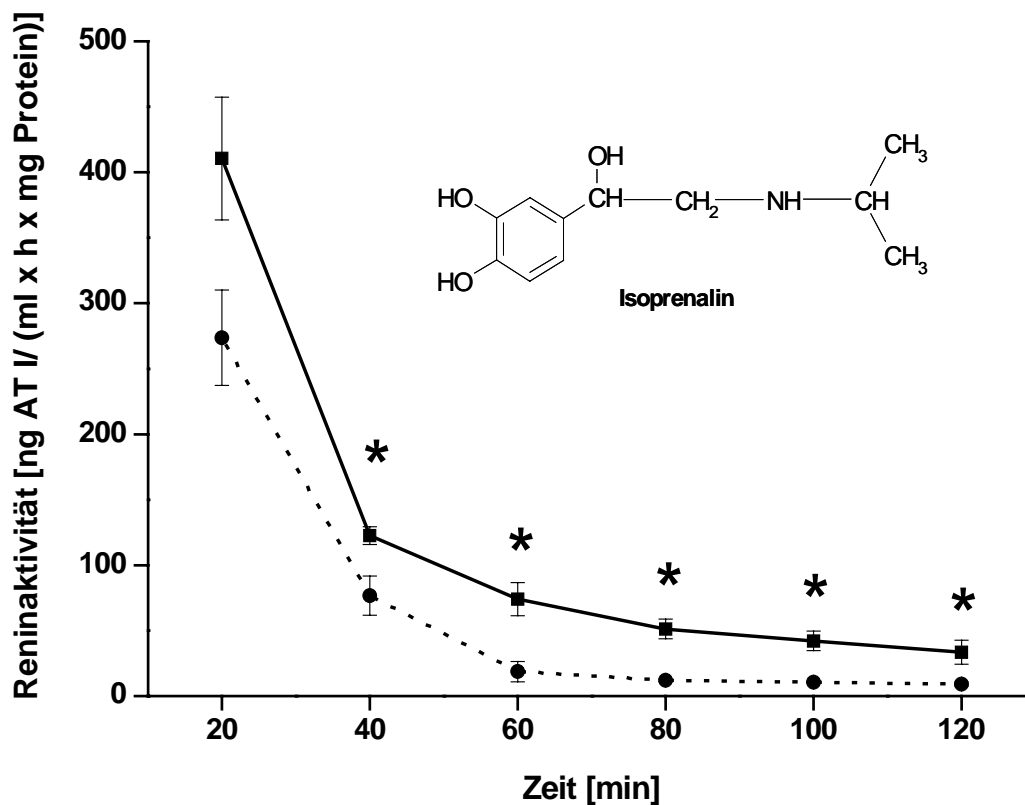


Abb. 7.37: Beispiel einer Zeitverlaufskurve einer Superfusion reninsezernierender Zellen mit Isoprenalin 10^{-4} M. Mittelwerte der Kammern eines Experimentes \pm SEM. Kontrolle $\cdots\bullet\cdots$ (n=4 Kammern), Isoprenalin 10^{-4} M $\text{---}\blacksquare\text{---}$ (n=4 Kammern). *) $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Bei der Superfusion der juxtaglomerulären Zellen mit Isoprenalin 10^{-4} M, in Abb. 7.37 dargestellt, war die Reninaktivität sowohl unter dem Einfluss der Substanz als auch

bei den Kontrollen nach 20 Minuten deutlich höher als in den nachfolgenden Sammelperioden. Dabei handelte es sich um die beim Dopamin bereits erwähnte spontane Reninfreisetzung während der Äquilibrierungszeit im Anschluss an die Präparation. Der Umstand, dass die Reninaktivitäten insgesamt niedriger als bei der Dopamin-Verlaufskurve waren, liegt an den verschiedenen Präparationen. Diese Unterschiede spielen aber bei der Zusammenfassung keine Rolle, da die einzelnen Kammern auf ihre jeweilige Kontrolle bezogen und diese dann zusammengefasst wurden. Nach 60 Minuten war die Reninaktivität unter dem Einfluss von Isoprenalin 10^{-4} M mit $74,0 \pm 12,7$ ng AT I/ (ml x h x mg Protein) signifikant höher als die der Kontrollen mit $18,8 \pm 7,8$ ng AT I/ (ml x h x mg Protein). Im Verlauf des Experimentes fielen zwar beide Kurven leicht ab, wobei die Stimulation der Reninfreisetzung unter dem Einfluss von Isoprenalin immer noch signifikant gegenüber den Kontrollkammern war.

7.2.1.9 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin

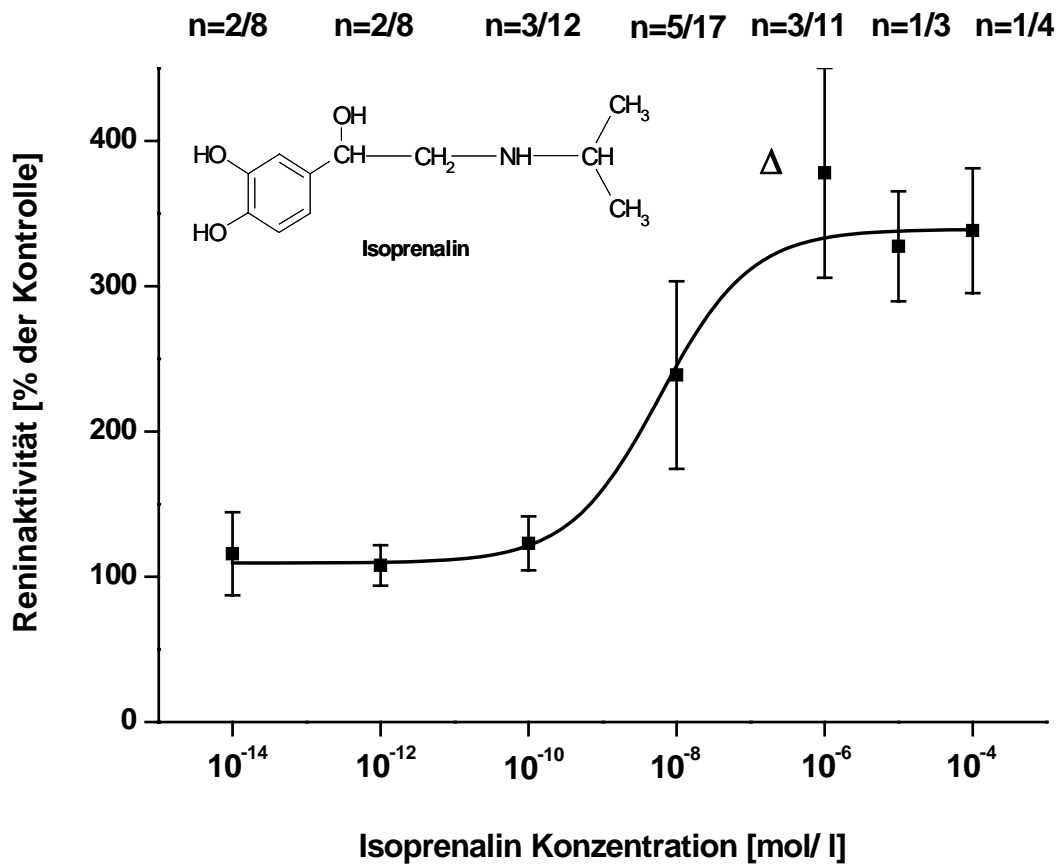


Abb. 7.38: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin. Die Werte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (100 %). Mittelwerte der einzelnen Kammern \pm SEM, ⁴⁾ $p < 0,05$ vs. 10^{-14} M.

Isoprenalin stimulierte die Reninsekretion konzentrationsabhängig in einem Bereich von 10^{-14} M mit $115,9 \pm 28,6$ %, über 10^{-8} M mit $238,9 \pm 64,5$ % bis 10^{-4} M mit $338,3 \pm 43,0$ % bezogen auf die 100 % „Kontrolllinie“. Die EC_{50} war mit $5,97 \times 10^{-9}$ M etwa 200-fach niedriger als die von Dopamin, was darauf hinweist, dass Isoprenalin der potentere Agonist ist.

7.2.1.10 Blockade der dopaminergen Wirkung auf die Reninsekretion durch Atenolol

Die Stimulation der Reninsekretion über β_1 Rezeptoren ist seit längerem bekannt. Dopamin stimuliert neben den Dopamin-spezifischen auch, zumindest in höheren Konzentrationen, β -adrenerge Rezeptoren. Um zu überprüfen, welcher Anteil der dopaminergen Stimulation der juxtaglomerulären Zellen über D-Rezeptoren vermittelt wird, wurden diese mit Dopamin als physiologischem und unspezifischem Liganden, in den bereits verwendeten Konzentrationen, zusammen mit dem β_1 -selektiven Antagonisten Atenolol, in der festen Konzentration von 10^{-10} M, superfundiert. Die Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt. Bei dieser war der Eigeneffekt von Atenolol selbst am kleinsten, die Blockade von Dopamin aber deutlich ausgeprägt.

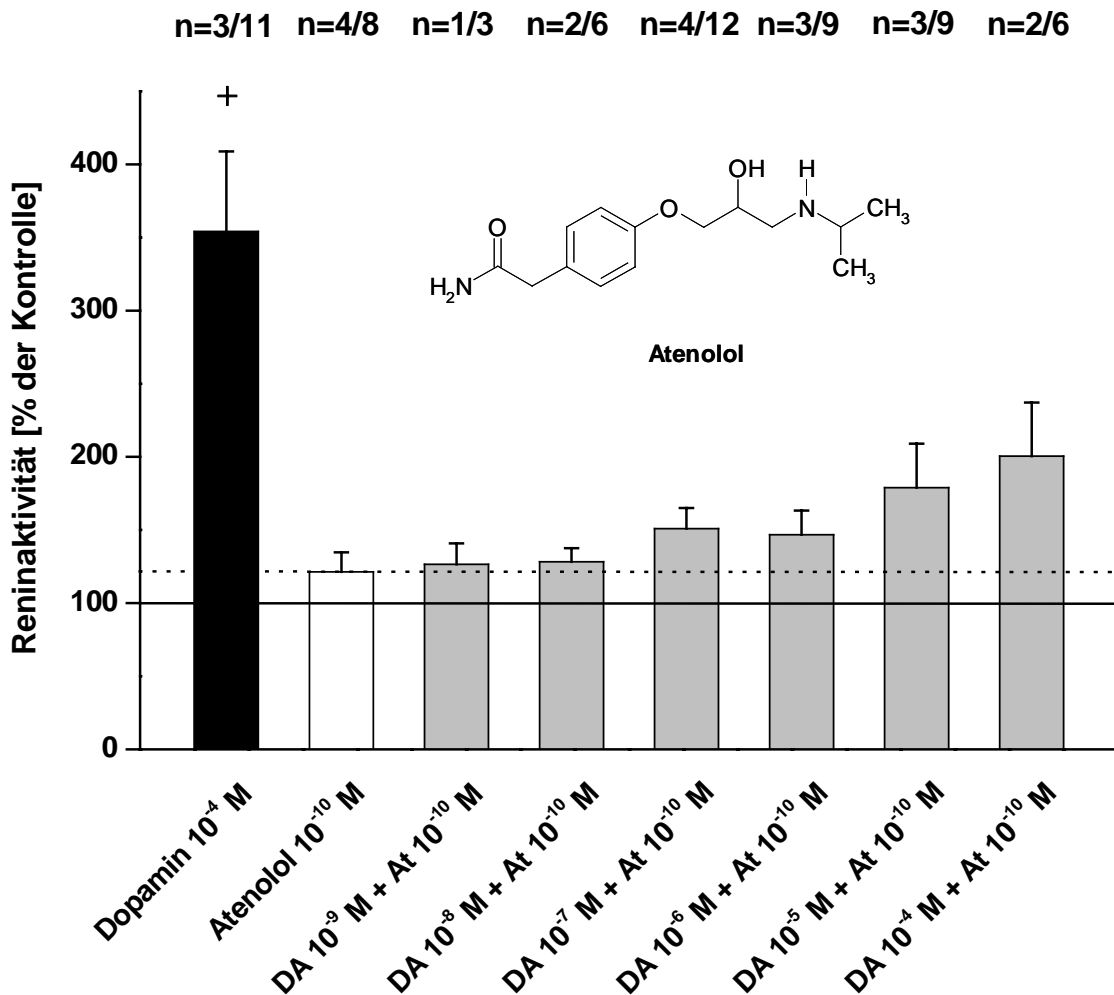


Abb. 7.39: Blockade der dopaminergen Stimulation der juxtaglomerulären Zellen durch Atenolol 10^{-10} M. Die Werte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (100 %). Mittelwerte der einzelnen Kammern + SEM, ⁺) $p < 0,05$ vs. Atenolol 10^{-10} M.

Abb. 7.39 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Superfusion der juxtaglomerulären Zellen mit Dopamin in aufsteigender Konzentration zusammen mit Atenolol 10^{-10} M. Die dopaminerge Stimulation konnte zu einem großen Anteil durch den β_1 -selektiven Antagonisten Atenolol in einer festen Konzentration von 10^{-10} M blockiert werden. Atenolol hatte in dieser Konzentration selbst einen geringen Stimulationseffekt auf die reninsezernierenden Zellen. Dieser Effekt wurde von den Dopamin/ Atenolol-Kombinationen abgezogen. Das Resultat ist in Abb. 7.40 dargestellt.

Dopamin: n=3/8 n=3/10 n=5/16 n=6/22 n=3/11 n=3/11
 Atenolol: n=1/3 n=2/6 n=4/12 n=3/9 n=3/9 n=2/6

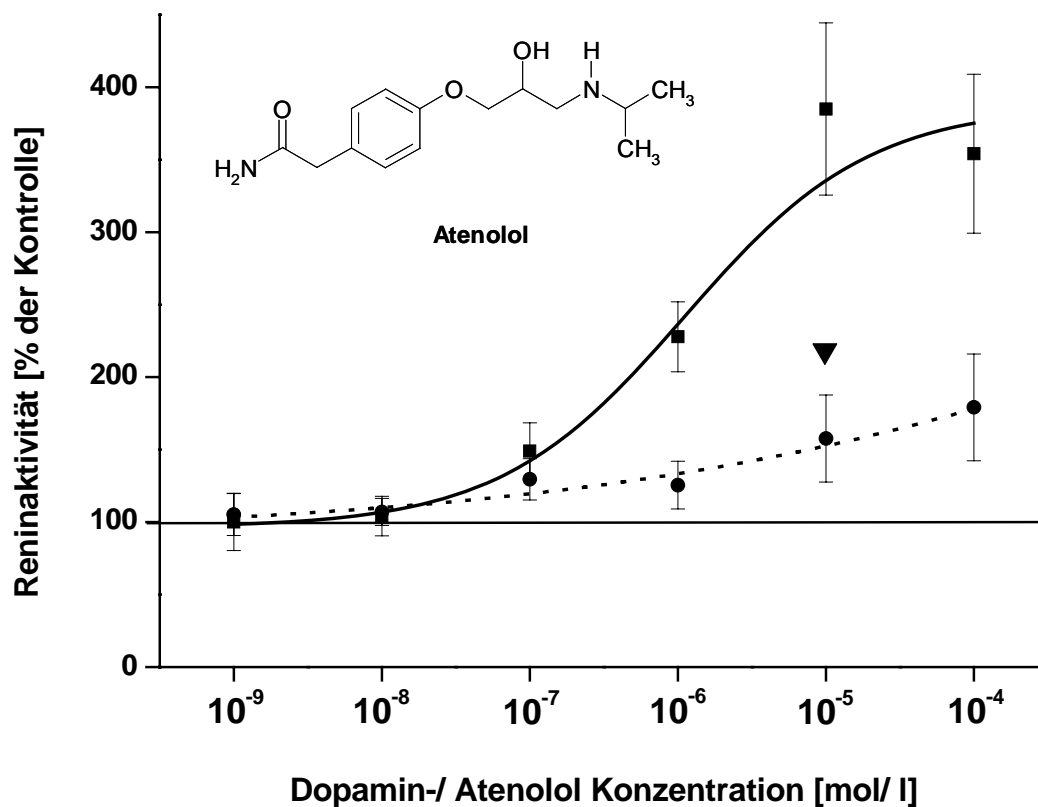


Abb. 7.40: Stimulation der Reninsekretion durch Dopamin \blacksquare und Blockade der dopaminergen Stimulation der juxtaglomerulären Zellen durch Atenolol 10^{-10} M \bullet . Die Werte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (100 %). Mittelwerte der einzelnen Kammern \pm SEM, \blacktriangledown) $p < 0,05$ vs. dopaminerge Stimulation.

Die dopaminerge Stimulation der Reninsekretion konnte durch β_1 -Blockade mit Atenolol 10^{-10} M deutlich gesenkt werden. Bei einer Dopaminkonzentration von 10^{-9}

M war der Unterschied mit $100,1 \pm 19,8 \%$, im Vergleich zur Blockade mit Atenolol mit $105,2 \pm 14,4 \%$, sehr gering. Erst bei einer Konzentration von 10^{-6} M war der Unterschied zwischen Stimulans alleine und diesem zusammen mit dem β -Antagonisten deutlich ausgeprägt. Bei der Dopaminkonzentration von 10^{-5} M differierten die Werte, mit $384,9 \pm 59,4 \%$ bzw. kombiniert mit Atenolol 10^{-10} M mit $157,6 \pm 30,1 \%$, signifikant.

7.2.1.11 Stimulation der Reninsekretion durch SKF 38393

Die dopaminerge Stimulation der Reninsekretion aus juxtaglomerulären Zellen wird über Dopamin D_1 Rezeptoren vermittelt (Kurtz et al. 1988), (Yamaguchi et al. 1997). Aufgrund der Beobachtung, dass Atenolol 10^{-10} M, die Effekte von höheren Dopaminkonzentrationen nicht vollständig blockieren konnte, wurde der Einfluss eines selektiven Dopamin D_1 Rezeptor Agonisten auf die superfundierten reninsezernierenden Zellen untersucht.

Da für die zusammenfassende kontrollbezogene Auswertung lediglich die 80 Minuten Werte verwendet wurden, wurde bei den weiteren Experimenten nur die Reninaktivität zu den Zeiten 60, 80 und 100 Minuten gemessen.

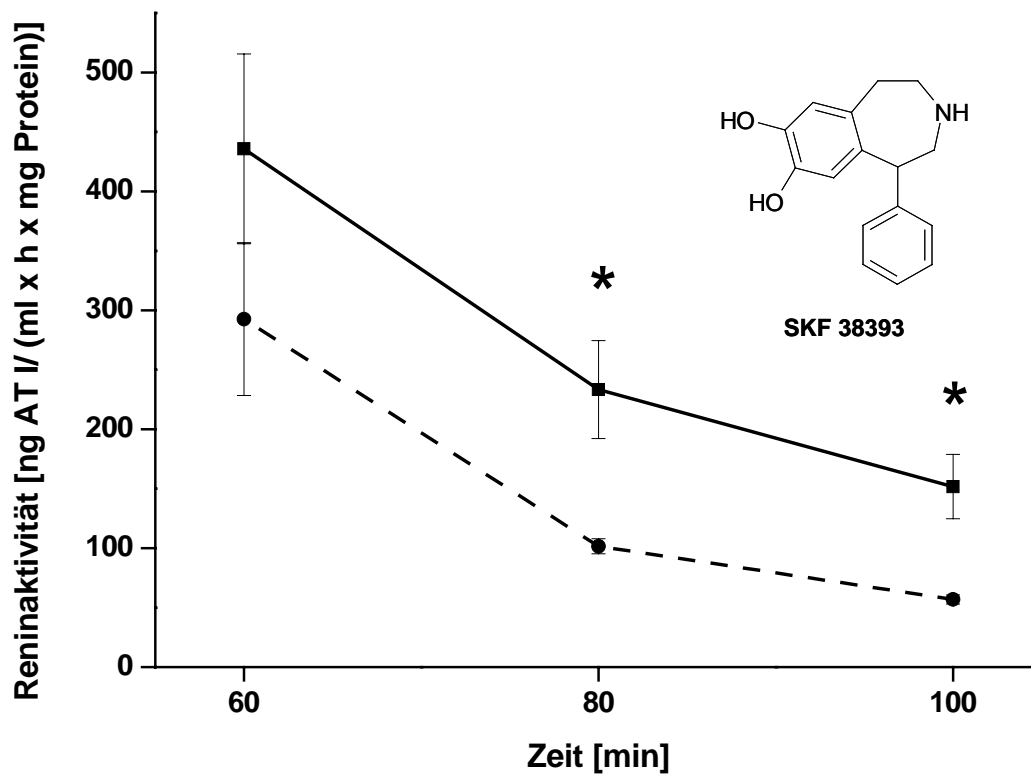


Abb. 7.41: Zeitverlaufskurve einer Superfusion reninsezernierender Zellen mit dem selektiven Dopamin D₁ Rezeptor Agonisten SKF 38393 10⁻⁵ M. Mittelwerte der Kammern eines Experimentes ± SEM. Kontrolle ●●● (n=4 Kammern), SKF 38393 10⁻⁵ M ■■■ (n=4 Kammern). *) p<0,05 vs. Kontrolle.

Im Verlaufsdiagramm (Abb. 7.41) zeigt der Dopamin D₁ Rezeptor Agonist SKF 38393 in einer Konzentration von 10⁻⁵ M, nach 80 und 100 Minuten, eine signifikante Stimulation der Reninsekretion gegenüber der entsprechenden Kontrolle. Dabei fiel im Verlauf des Experimentes die Reninfreisetzung sowohl bei der Kontrolle als auch beim stimulierenden Agens weiter ab, wobei die Kurven von SKF 38393 und Kontrolle nahezu parallel verliefen.

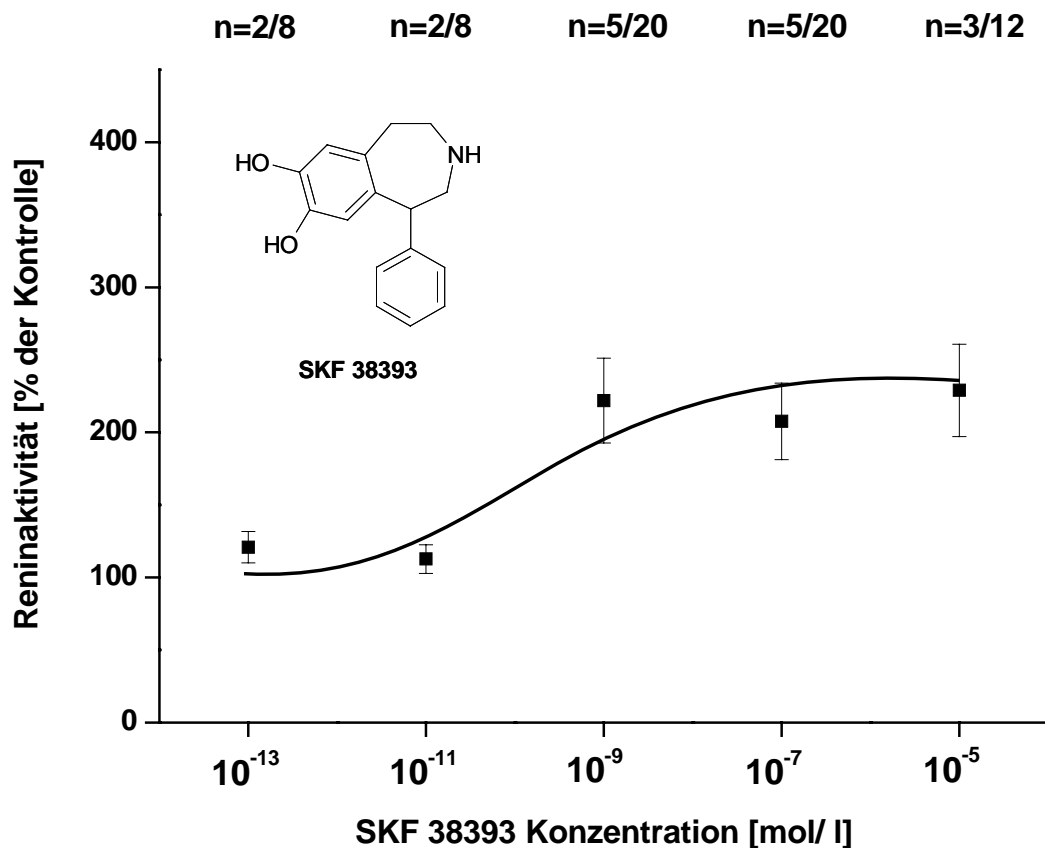


Abb. 7.42: Superfusion der juxtaglomerulären Zellen mit dem selektiven Dopamin D_1 Rezeptor Agonisten SKF 38393 in den Konzentrationen von 10^{-13} M bis 10^{-5} M. Die Werte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (100 %). Mittelwerte der einzelnen Kammern \pm SEM.

In Abb. 7.42 sind die Reninaktivitäten unter dem Einfluss des Dopamin D_1 Rezeptor Agonisten SKF 38393 in den Konzentrationen von 10^{-13} M bis 10^{-5} M dargestellt. Dabei setzte die Substanz bei 10^{-5} M, mit einer Aktivität von $228,1 \pm 31,9$ %, weniger Renin aus den juxtaglomerulären Zellen frei als der physiologische Ligand Dopamin. Bei 10^{-7} M und 10^{-9} M war die Stimulation der Zellen immer noch in der gleichen Größenordnung, aber ebenfalls nicht signifikant gegenüber der Konzentration 10^{-13} M. Die Effekte von Dopamin bei denselben Konzentrationen waren bereits niedriger. Bei 10^{-11} M und 10^{-13} M ist die Reninaktivität aber ebenfalls auf Kontrollniveau gesunken.

7.2.1.12 Einfluss von Bromocriptin als unselektiver Dopamin D₂ Rezeptor Agonist auf die reninsezernierenden Zellen

Um zu überprüfen, ob sich auf den reninsezernierenden Zellen Dopamin D₂ Rezeptoren befinden, wurden diese mit dem relativ unselektiven D₂ Rezeptor Agonisten Bromocriptin superfundiert.

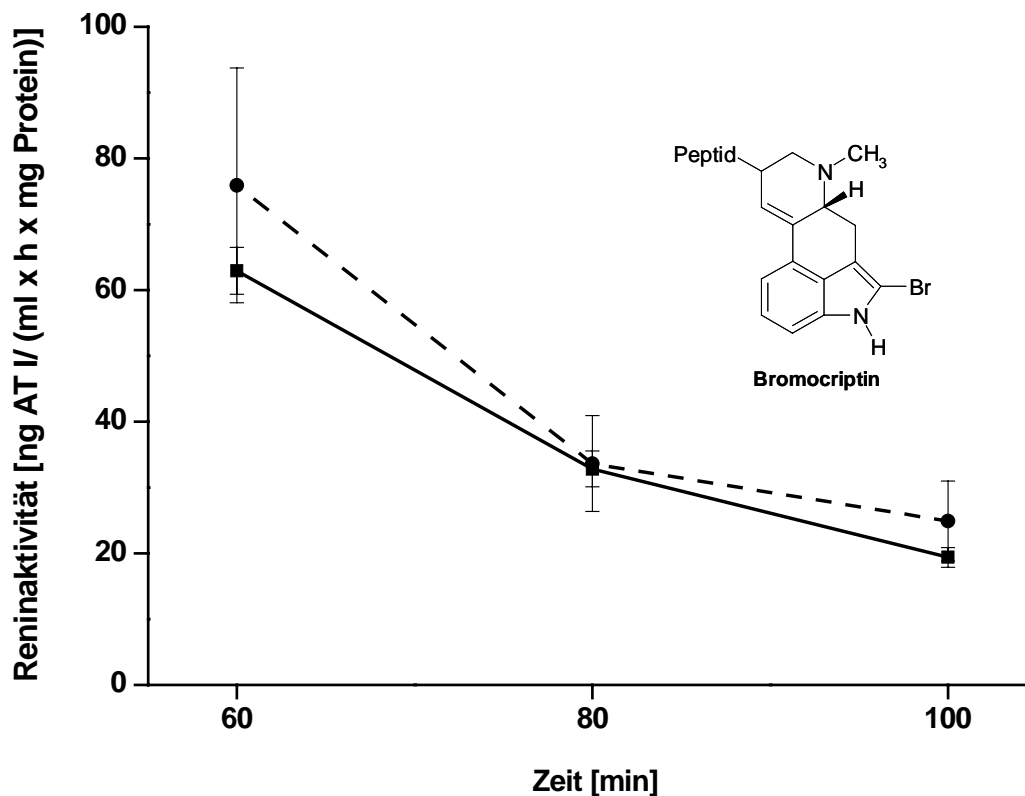


Abb. 7.43: Zeitverlaufskurve einer Superfusion reninsezernierender Zellen mit dem relativ unselektiven Dopamin D₂ Rezeptor Agonisten Bromocriptin 10⁻⁷ M. Mittelwerte der Kammern eines Experimentes ± SEM. Kontrolle ●●● (n=3) Kammern, und Bromocriptin 10⁻⁷ M ■■■ (n=5) Kammern.

Abb. 7.43 zeigt die Zeitverlaufskurve eines Experimentes mit Bromocriptin in der Konzentration 10⁻⁷ M. Die Unterschiede zwischen den mit Bromocriptin und den mit Kontrollpuffer superfundierten Kammern waren sehr, wenn nicht abwesend, gering. Nach 60 Minuten war die Reninsekretion unter dem Einfluss von Bromocriptin, mit einem Wert von 62,9 ± 3,6 ng AT II / (ml x h x mg Protein), den mit Kontrollpuffer superfundierten Kammern, mit einem Wert von 75,9 ± 9,3 ng AT II / (ml x h x mg

Protein), sehr ähnlich. Auch nach 80 Minuten lagen die Werte mit $32,8 \pm 2,7$ bzw. $33,7 \pm 0,7$ ng AT I/ (ml x h x mg Protein) sehr nahe beieinander. Die zu den anderen Experimenten insgesamt vergleichsweise niedrigen Reninaktivitäten sind auf die Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationen zurückzuführen.

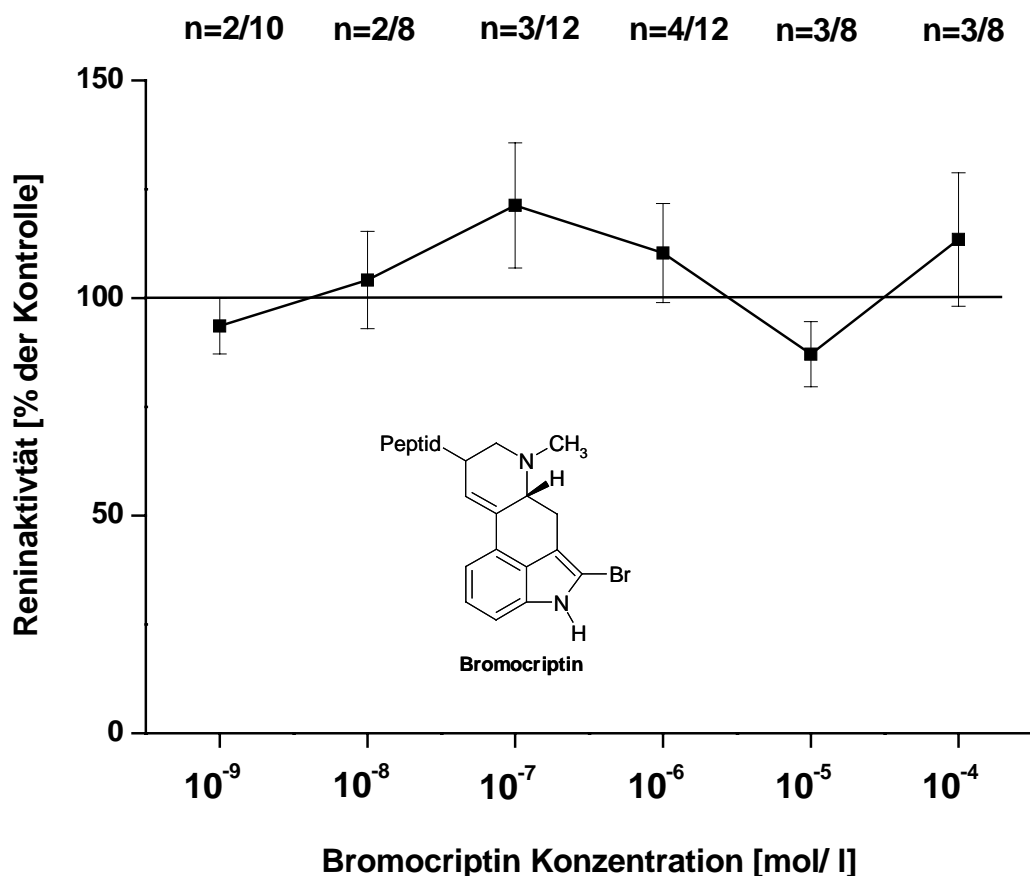


Abb. 7.44: Superfusion reninsezernierender Zellen mit dem relativ unselektiven Dopamin D_2 Rezeptor Agonisten Bromocriptin in den Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-4} M. Die Werte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (100 %). Mittelwerte der einzelnen Kammern \pm SEM.

Auch in der Zusammenfassung der verschiedenen Konzentrationen von Bromocriptin, in Abb. 7.44, zeigten sich keine großen Unterschiede oder erkennbare Tendenzen im Vergleich zur entsprechenden Kontrolllinie. Bromocriptin zeigte in keiner der eingesetzten Konzentrationen eine signifikante Steigerung oder Hemmung der Reninfreisetzung, was darauf hindeutet, dass entweder die Dopamin D_2 Rezeptoren nicht in diesen Zellen exprimiert werden oder, dass der unselektive

Agonist, die Reninsekretion sowohl stimuliert als auch hemmt. Die kontrollbezogene Reninaktivität lag zwischen $87,1 \pm 7,5 \%$ bei 10^{-5} M und $121,3 \pm 14,4 \%$ bei 10^{-7} M.

7.2.1.13 Wirkung von 7-OH-DPAT auf die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen

Der Dopamin D_3 Rezeptor wurde bereits auf m-RNA Ebene von Sanada et al. (1997) in den juxtaglomerulären Zellen nachgewiesen. Nun sollte die Funktion des Dopamin D_3 Rezeptors auf den Zellen mit Hilfe des selektiven Agonisten 7-OH-DPAT (7-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin) überprüft werden.

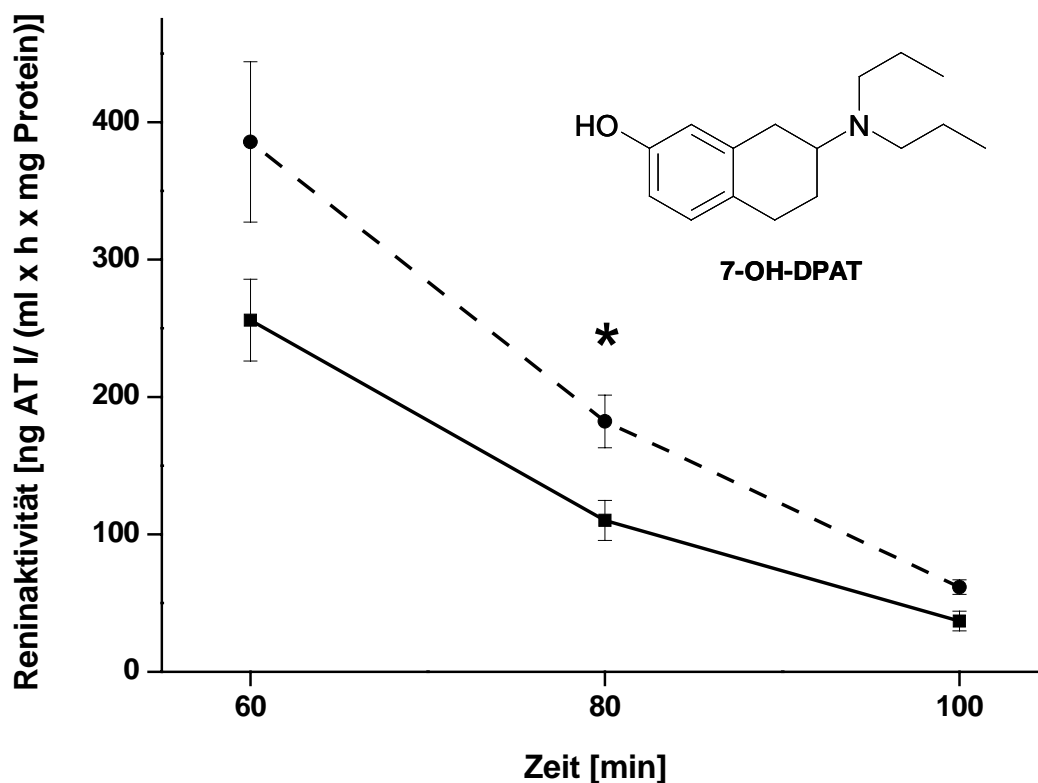


Abb. 7.45: Zeitverlaufskurve einer Superfusion reninsezernierender Zellen mit dem selektiven Dopamin D_3 Rezeptor Agonisten 7-OH-DPAT 10^{-5} M. Mittelwerte der Kammern eines Experimentes \pm SEM. Kontrolle $\bullet\bullet\bullet$ (n=3 Kammern), 7-OH-DPAT 10^{-5} M \blacksquare (n=4 Kammern). *) $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Abb. 7.45 zeigt, dass die Stimulation der Dopamin D₃ Rezeptoren durch den selektiven Agonisten 7-OH-DPAT keine Steigerung, sondern sogar eine geringe Hemmung der Reninfreisetzung verursachte. Die Werte der mit dem Stimulus superfundierten Kammern lagen nach 60 Minuten bei $255,9 \pm 29,9$ und die der Kontrollkammern bei $385,6 \pm 58,3$ ng AT I/ (ml x h x mg Protein). Nach 80 Minuten war der Unterschied, mit $110,1 \pm 14,6$ bei 7-OH-DPAT gegenüber $182,3 \pm 19,2$ bei den Kontrollen, signifikant.

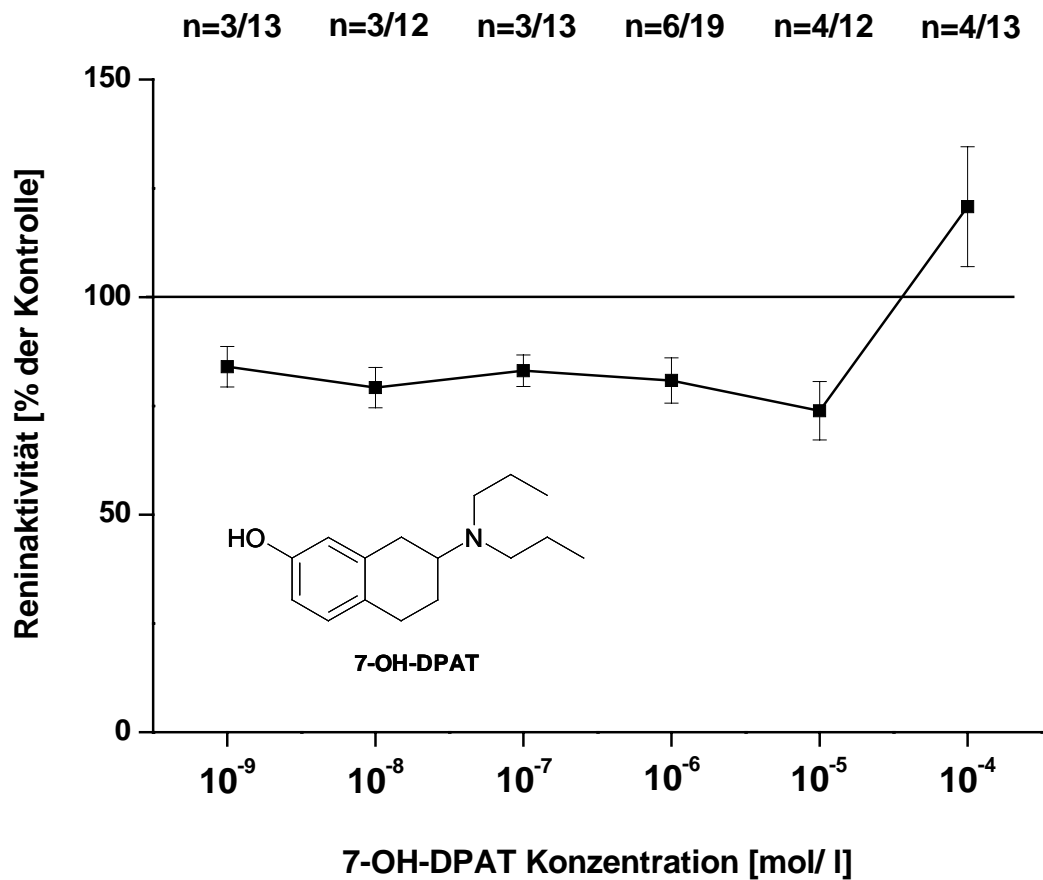


Abb. 7.46: Superfusion reninsezernierender Zellen mit dem Dopamin D₃ Rezeptor Agonisten 7-OH-DPAT in den Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-4} M. Die Werte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (100 %). Mittelwerte der einzelnen Kammern \pm SEM.

Abb. 7.46 verdeutlicht, dass die Stimulation der Dopamin D₃ Rezeptoren durch 7-OH-DPAT, über den untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-9} M bis 10^{-5} M, zu einer geringen, aber über die Konzentrationen gut reproduzierbaren Hemmung der Reninfreisetzung führt. Dabei lag die Hemmung im Vergleich zur entsprechenden

Kontrolllinie zwischen $73,9 \pm 6,7$ % und $84,0 \pm 4,7$ %. Bei 10^{-4} M wird die Reninsekretion nicht gehemmt, sondern steigt im Mittel auf $120,8 \pm 13,8$ % im Vergleich zur Kontrolle an, was auf unspezifische Effekte hindeuten könnte.

7.2.1.14 Superfusion der juxtaglomerulären Zellen mit BSF 201640

Die juxtaglomerulären Zellen wurden mit dem selektiven Dopamin D_3 Rezeptor Antagonisten BSF 201640 der Firma Abbott, Ludwigshafen, alleine und zusammen mit Dopamin in einer festen Konzentration von 10^{-6} M superfundiert.

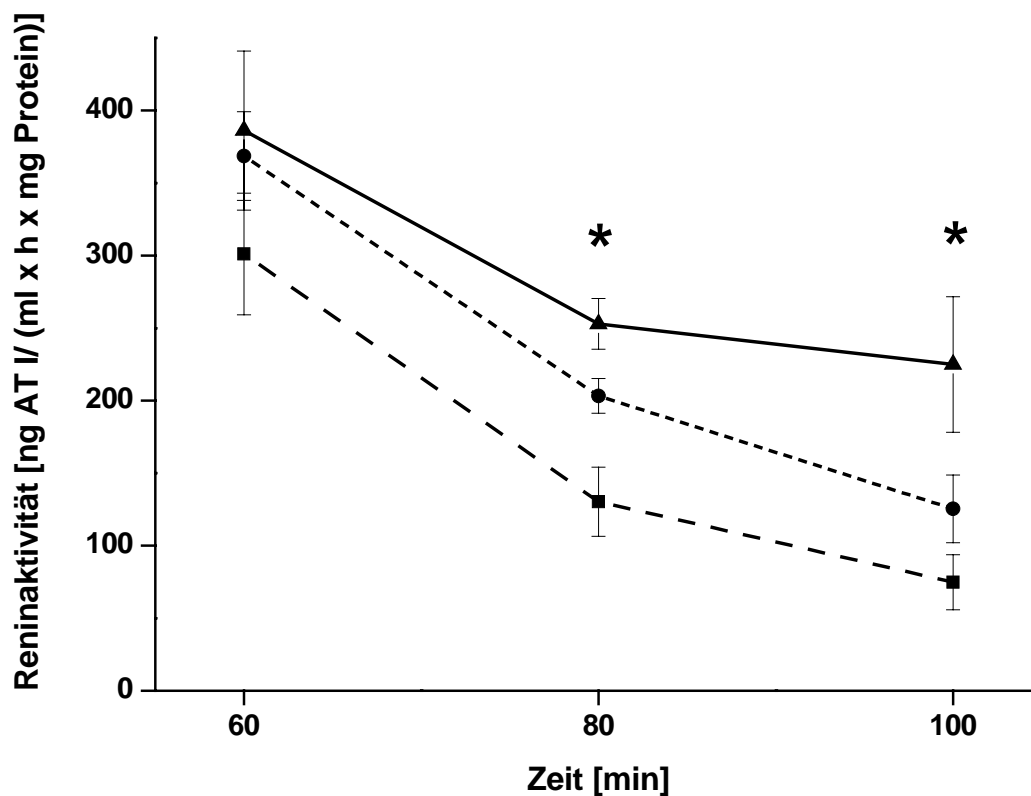


Abb. 7.47: Zeitverlaufskurve einer Superfusion reninsezernierender Zellen mit dem selektiven Dopamin D_3 Rezeptor Antagonisten BSF 201640 10^{-6} M und einer Kombination aus diesem, zusammen mit Dopamin 10^{-6} M. Mittelwerte der Kammern eines Experimentes \pm SEM. Kontrolle —■— (n=5 Kammern), BSF 201640 10^{-6} M —●— (n=3 Kammern) und Dopamin 10^{-6} M + BSF 201640 10^{-6} M —▲— (n=3 Kammern). *) $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Abb. 7.47 zeigt deutlich, dass der D₃ Rezeptor Antagonist BSF 201640 in einer Konzentration von 10⁻⁶ M alleine eine nicht signifikante, aber erkennbare Stimulation der Reninsekretion bewirkte. Nach 80 Minuten lagen die Werte bei 203,3 ± 12,0 ng AT I/ (ml x h x mg Protein) und bei den Kontrollen bei 130,3 ± 23,8 ng AT I/ (ml x h x mg Protein). Dieser Effekt wurde zusammen mit Dopamin in der Konzentration von 10⁻⁶ M noch weiter verstärkt und war nach 80 Minuten, mit einem Wert von 252,9 ± 17,5 ng AT I/ (ml x h x mg Protein), im Vergleich zur Kontrolle signifikant. (Die Strukturformel ist aufgrund des Patentschutzes nicht dargestellt).

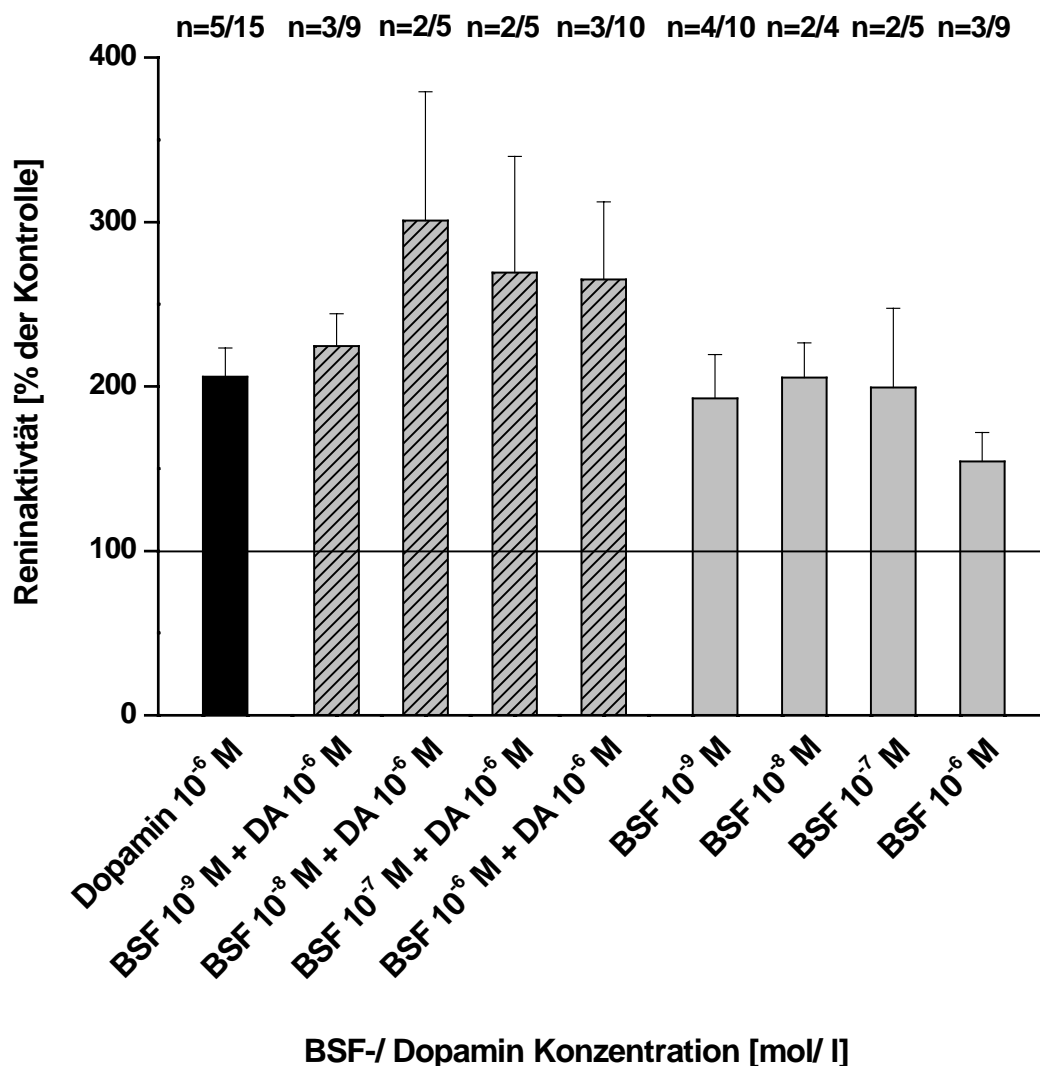


Abb. 7.48: Einfluss von BSF 201640, einem selektiven Dopamin D₃ Rezeptor Antagonisten, auf die Reninsekretion, mit und ohne Dopamin-Stimulation. Die Werte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (100 %). Mittelwerte der einzelnen Kammern + SEM.

Die Übersicht in Abb. 7.48 zeigt, dass die Stimulation durch BSF 201640, in den Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-6} M, mit der von Dopamin, in einer Konzentration von 10^{-6} M, vergleichbar war. Die Superfusion von BSF 201640, in den Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-8} M, zusammen mit Dopamin, in der festen Konzentration von 10^{-6} M, erzeugte eine tendenziell höhere Stimulation im Vergleich zu Dopamin 10^{-6} M oder BSF 201640 alleine.

8. DISKUSSION

8.1 Diskussion der Methoden

8.1.1 Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäuse zur Untersuchung der D₃ Rezeptor Funktion

Transgene Tiere sind heutzutage ein unverzichtbarer Bestandteil der pharmakologischen und physiologischen Forschung geworden. Die Verfügbarkeit konditionaler und teilweise sogar organspezifischer Knockout-Mäuse bietet bislang unzugängliche Möglichkeiten, um pathophysiologische Zusammenhänge und mögliche pharmakologische Strategien zu identifizieren.

Für die in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden die Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäuse der ZNS Forschungslaboratorien der Firma Abbott in Ludwigshafen verwendet. Bei diesen Tieren wurde durch den physiologischen Vorgang der homologen Rekombination das erste Exon des Dopamin D₃ Rezeptors der Mäuse fast vollständig durch ein durch Elektroporation insertiertes Knockout-Konstrukt ersetzt. Für die beschriebenen Experimente wurden ausschließlich homozygote (-/-) und die korrespondierenden (+/+) Männchen verwendet. Die Abwesenheit der genetischen Codierung für den D₃ Rezeptor wurde bei jedem Versuchstier mittels Genotypisierung bestätigt. Die Tiere waren gesund und unterschieden sich weder äußerlich noch im Verhalten von den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen. Die von einem anderen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Modell beschriebene Hyperaktivität (Accili et al. 1996) konnte bei den hier verwendeten Tieren nicht beobachtet werden.

Die Mäuse wurden vor und während der Versuche unter standardisierten Versuchsbedingungen gehalten (Futter, Trinkwasser, zirkadianer Lichtwechsel, konstante Temperatur und Luftfeuchtigkeit). Vor den jeweiligen Experimenten erfolgte eine entsprechende Trainings-/ Eingewöhnungsphase. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass durch diese Maßnahme die Tiere insgesamt ruhiger reagierten und die Blutdruckwerte stabiler waren. Eine ausreichend lange Äquilibration mit der entsprechenden Kochsalzdiät, welche durch Stoffwechselkäfigexperimente in Vorversuchen anhand der Natriumurinausscheidung

ermittelt wurde, gewährleistet, dass sich die Mäuse nicht mehr in der wash-in Phase sondern im steady-state bezüglich der entsprechenden Diät befanden.

8.1.1.1 Blutdruckmessung bei wachen Tieren mit Hilfe der Schwanzdruckplethysmographie

Der Blutdruck unterliegt einer Vielzahl von internen physiologischen und externen Einflüssen. Tageszeitliche Schwankungen, Nahrungs- und umweltbedingte Faktoren, sowie Stress durch die Umgebung oder die Versuchsbedingungen sind nur einige Beispiele, die zu Veränderungen der Blutdruckwerte führen können. Durch die Standardisierung der Experimente bzw. Eingewöhnungsphase der Tiere wurde versucht die jeweiligen Einflüsse weitgehend zu eliminieren. Damit die Daten möglichst gut die physiologischen Bedingungen widerspiegeln, wurden die Blutdruckmessungen an wachen Tieren durchgeführt, da die zur – eigentlich exakteren - intravasalen Messung notwendige Narkose, einen erheblichen und schwer zu kontrollierenden Einfluss auf die Blutdruckeinstellung ausübt (Dimitrov et al. 1977), (Meneton et al. 2000), (Janssen et al. 2004). Auch eventuell auftretende postoperative Schmerzen, nach der Implantation eines Sensors zur telemetrischen Messung, können eine Stressquelle darstellen, welche die Blutdruckwerte beeinflusst. So lassen sich der zeitliche Trainingsaufwand und die Erholungsphase der Tiere nach einem operativen Eingriff in etwa vergleichen, wobei allerdings intraindividuelle Unterschiede von 5 mmHg bei der Schwanzdruckplethysmographie, im Gegensatz zu einer telemetrischen Methode, schwer nachzuweisen sind (Meneton et al. 2000).

8.1.1.2 Stoffwechselkäfigexperimente

Mit Hilfe der Stoffwechselkäfigexperimente wurde die Urinausscheidung, die Natrium-, Kalium-, Chlorid-, Dopamin- und Kreatininausscheidung mit dem Urin, sowie die Osmolalität des Urins, das Trinkvolumen und die Futteraufnahme der Dopamin D₃

Rezeptor Knockout-Mäuse bestimmt. Die Stoffwechselkäfigexperimente wurden unter standardisierten Bedingungen, bzgl. Raumklima und Beleuchtung sowie unter Berücksichtigung zirkadianer Einflüsse durchgeführt. Die Versuche, bei welchen die Tiere keinen freien Zugang zu Futter hatten, fanden zwischen 7 Uhr morgens und 19 Uhr abends statt, da der Metabolismus der Tiere während der Ruhephase weniger beeinflusst wird. Dabei muss allerdings kritisch hinterfragt werden, ob der jeweils untersuchte Zeitraum von 24 h bzw. 12 h repräsentativ für eine generelle Aussage ist. Da die Tiere allerdings auch nicht länger als notwendig in den Stoffwechselkäfigen gehalten werden sollten, insbesondere bei Futterrestriktion, wurden die genannten Zeiten eingehalten. Eine Eingewöhnungsphase an die Stoffwechselkäfige hat in Vorversuchen keine Vorteile gezeigt.

Die Analytik der jeweiligen Parameter erfolgte mit Hilfe von qualifizierten und validierten Messmethoden. Die Bestimmung der Natrium- und Kaliumkonzentration mit Hilfe der Flammenphotometrie stellt ein exaktes und schnelles Verfahren zur Messung der beiden Kationen in Flüssigkeiten dar. Dasselbe gilt für die coulometrische Quantifizierung von Chlorid. Die Bestimmung der Osmolalität ist durch die Messung der Gefrierpunktserniedrigung sehr einfach und genau. Die Bestimmung von Kreatinin und Dopamin mit Hilfe der HPLC liefert, nach Qualifizierung und Validierung der Methode, wie beim Vergleich von Ergebnissen innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, genauere und reproduzierbarere Resultate als die handelsüblichen enzymatischen Verfahren (siehe 8.1.1.4 und 8.1.1.5).

8.1.1.3 Niedrig-, Normal- und Hochsalzdiät

Um eine mögliche Modulation des Effektes des Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Modells auf Blutdruck und Nierenfunktion durch die Kochsalzzufuhr zu beobachten, wurden die Tiere für die entsprechenden Experimente auf Niedrig-, Normal- oder Hochsalzdiät gehalten und erst nach einer bestimmten Äquilibrationszeit die entsprechenden Versuche durchgeführt. Bei den Blutdruckexperimenten war das Studiendesign so angelegt, dass die Diäten im Verlauf des Experimentes gewechselt

wurden und deren Einfluss durch die intraperitoneale Applikation von Furosemid (zur Natriumdepletion) oder DOCA (zur Natriumretention) zu verstärken. Dabei wurden die von Weisinger et al. (1990) und Mühlbauer & Osswald (1993) beschriebenen Dosierungen verwendet. Furosemid hemmt als Schleifendiuretikum den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter und somit die Natriumretention. Diese Maßnahme sollte die Natriumausscheidung fördern und den möglichen Einfluss, der im Experiment auf die Injektion folgenden Niedrigsalzdiät, unterstützen. Dabei beeinflusst Furosemid als High-ceiling Diuretikum die glomeruläre Filtrationsrate nicht, da es ebenfalls den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter in der Macula densa hemmt. Somit musste dieser Parameter hier nicht weiter berücksichtigt werden. DOCA als synthetisches Mineralocorticoid fördert wie Aldosteron die Natriumretention im spätdistalen Tubulus und im Sammelrohr durch epitheliale Natriumkanäle (ENaC). Die tägliche DOCA-Injektion sollte die möglichen Einflüsse der während des Experimentes verabreichten Hochsalzdiät unterstützen. Die Effekte der beiden Wirkstoffe wurden allerdings lediglich indirekt durch die Untersuchung der Blutdruckwerte beobachtet. Der direkte Einfluss auf die Natriumrinnausscheidung wurde bei diesem Versuchsansatz nicht überprüft.

8.1.1.4 Detektion der Katecholamine mit Hilfe der HPLC

Die zur Bestimmung von Dopamin im Plasma, Urin und Nierengewebe der Dopamin D_3 Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse eingesetzte HPLC (Bauersfeld et al. 1984), (Küster 2000) mit elektrochemischer Detektion durch Reduktion/ Oxidation, gilt als empfindlichste, derzeit verfügbare Methode und liefert besser reproduzierbare und zuverlässigere Ergebnisse als andere Verfahren wie z.B. enzymatische Methoden. Während der Stoffwechselkäfigexperimente zur Uringewinnung wurde in die Auffangbehältnisse Citratpuffer vorgelegt, um die im Urin enthaltenen Katecholamine vor oxidativer Degradation zu schützen. Der innerhalb von 12 h gesammelte Urin wurde bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Zur Bestimmung der Dopaminkonzentration im Plasma wurden die Tiere mit Ether betäubt und über die retroorbitale Vene Blut abgenommen. Das hierdurch gewonnene Plasma wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt.

In der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bei dieser Vorgehensweise die Katecholamine bis zu 3 Monate lang stabil waren. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Narkose die Katecholaminausschüttung der Tiere beeinflusst (Aktories et al. 2005) und damit zu interindividuellen Unterschieden zwischen den Tieren führen kann. Durch Einhalten der gleichen, standardisierten Versuchsbedingungen für alle Mäuse wurde versucht, diesen Fehler möglichst klein zu halten. Die Isolierung von Katecholaminen aus Körperflüssigkeiten wird seit vielen Jahren nach dem von Anton & Sayre (1962) erstmals beschriebenen Prinzip durchgeführt. Die beiden ortho-ständigen OH-Gruppen der Katecholamine werden im alkalischen Milieu durch Chelatbildung an das zuvor getrocknete Al_2O_3 gebunden. Nun können durch Waschen des Aluminiumoxids Verunreinigungen entfernt werden. Die Elution der Katecholamine erfolgt in saurer Lösung, bei einem pH-Wert kleiner als 2. Diese Lösung kann direkt in die HPLC-Anlage injiziert werden. Die Extraktion erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Die untere Nachweisgrenze lag bei 80 fmol. Sowohl Extraktion als auch HPLC-Bestimmung der Katecholamine wurden durch Wiederfindungsversuche mit verschiedenen Katecholamin-Standards validiert (Küster 2000). Auffällig waren die großen interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren. Aber die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit waren mit Werten, die in der Arbeitsgruppe bei Ratten gefunden wurden, vergleichbar (Küster 2000).

8.1.1.5 Kreatinin als physiologischer Marker der glomerulären Filtrationsrate

Die Kreatinin-Clearance wird häufig zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate beim Menschen herangezogen, beispielsweise dann, wenn die Dosierung vorwiegend renal eliminiertes Arzneimittel präzisiert werden soll. Sollte dieser Ausscheidungsweg durch krankhafte oder altersbedingte strukturelle Veränderungen eingeschränkt sein, muss dies bei der Anwendung der entsprechenden Arzneistoffe berücksichtigt werden. Die renale Clearance wird im Klinikalltag häufig mit Hilfe der Cockcroft-Gault Formel geschätzt. Dabei ergeben sich allerdings erhebliche Probleme, da mit diesem Verfahren die GFR gesunder älterer Menschen, genau wie durch die Kreatinin-Clearance, weit unterschätzt wird (Fliser et al. 1999). Diese

nimmt zwar im Alter bei Menschen und Säugetieren, z.B. Mäusen, ab (Fliser et al. 1997), (Hackbarth & Harrison 1982) liegt aber, zumindest bei gesunden Menschen, immer noch innerhalb einer Grenze, die eine normale Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen gewährleistet. Eine weitere Einschränkung der Kreatininclearance als Marker für die GFR ist die Tatsache, dass Kreatinin bei hohen Plasmakonzentrationen zu einem geringen Maß sowohl tubulär sezerniert als auch resorbiert wird (Thews et al. 1999), was zu einer Fehleinschätzung der GFR führt. Kreatinin wird mit relativ konstanter Rate im Muskel-Stoffwechsel aus Phosphokreatinin gebildet. Demzufolge steigt bei eingeschränkter GFR die Plasmakonzentration an. Werte für den Plasmaspiegel von Kreatinin gelten bis zu einer Grenze von 1,2 mg/ dl als normal. Allerdings gibt es einen sogenannten kreatininblinden Bereich, in welchem der Plasmakreatininspiegel zwar noch unterhalb dieser Grenze liegt, die Nierenfunktion allerdings schon erheblich eingeschränkt sein kann (Aktories et al. 2005). Die Inulinclearance entspricht aufgrund ihrer tubulären Neutralität am ehesten der genauen GFR. Allerdings muss Inulin intravenös infundiert werden, was aufgrund der hierfür nötigen Narkose wiederum eine Beeinflussung der physiologischen Verhältnisse bei den zu untersuchenden Mäusen bedeutet hätte. Daher wurde die Kreatininclearance in dieser Arbeit als bester Mittelweg vorgezogen.

Die Kreatininclearance bei den Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen ergab GFR-Werte, welche mit den Ergebnissen, die mit Hilfe der Inulinclearance in der Arbeitsgruppe bei Mäusen gefunden wurden, vergleichbar waren. Somit wäre die Methode durchaus geeignet, bei wachen Tieren ohne Eingriff, die glomeruläre Filtrationsrate zu bestimmen. Die Kreatininclearance wurde über die 24-h-Urinausscheidung ermittelt, wohingegen die Plasmawerte aus einer einzigen Blutabnahme stammen, welche zwar bei allen Tieren zur gleichen Tageszeit durchgeführt wurde, allerdings nur begrenzt repräsentativ für den Plasmaspiegel über 24 h ist, da die Kreatininfreisetzung aus dem Muskelgewebe stark von der Bewegung abhängt und sich die Mäuse während ihrer Ruhephase am Tage weniger bewegen als nachts. Aufgrund des geringen Blutvolumens einer Maus ist aber eine mehrmalige Blutentnahme schwierig, da jeglicher Volumenverlust eine renale Gegenregulation provoziert. Die Konzentrationen von Kreatinin im Plasma und Urin waren aber mit Literaturangaben vergleichbar (Meneton et al. 2000).

Die Bestimmung von Kreatinin mit Hilfe der HPLC lieferte, wie in der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, genauere Werte als die handelsüblichen enzymatischen Verfahren. Durch die Laufmittelzusammensetzung wurde Kreatinin zwischen 3 und 4 Minuten eluiert und nicht von anderen Substanzen überdeckt. Bei der Bestimmung der Plasmakonzentration mussten die Plasmaproteine durch Filtration abgetrennt werden, da diese die photometrische Detektion stören. Fällungsversuche mit organischen und anorganischen Säuren und Alkoholen ergaben ebenfalls Störungen, welche im Detektionsbereich von Kreatinin auftraten. Die untere Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei 1 $\mu\text{mol/l}$.

8.1.1.6 Blutdruckmessung unter Angiotensin II Bolus-Injektionen unter Narkose

Die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Dopamin D_3 - und AT_1 Rezeptoren bei Mäusen erfolgte durch Bolus-Injektionen von humanem AT II unter Pentobarbital-Narkose. Dies war notwendig, da eine i.v.-Applikation bei wachen Mäusen schwierig und eine gleichzeitige Blutdruckaufzeichnung mit Schwanzdruckplethysmographie nahezu unmöglich ist. Durch den arteriellen Katheter konnte der Blutdruck der Tiere kontinuierlich aufgezeichnet werden, was für die Effekterfassung einer Substanz mit einer Halbwertszeit von 15 bis 30 Sekunden notwendig ist. Die Präparation wie bei einem klassischen Clearance-Experiment zur Beurteilung der Nierenfunktion bot zudem die Möglichkeit, den Mäusen während des Versuches Flüssigkeit zu infundieren. Um den Einfluss auf den Blutdruck zu minimieren, wurde auf eine gleichmäßig Tiefe der Narkose geachtet. Die Tiere erhielten hierzu eine exakt ihrem Körpergewicht entsprechende Dosis. Durch Ausbleiben der Schmerzreaktionen, Cornea- und Lidreflexe wurde vor der Präparation, vor dem Experiment und während der Äquilibrationsperioden die Narkosetiefe überprüft. Gegebenenfalls wurde den Tieren vor Beginn des Versuches bzw. während der Äquilibrationsperioden 10 bis 20 % der Ausgangsdosierung von Pentobarbital nachinjiziert, um während des Experimentes die Blutdruckwerte nicht durch weitere Applikationen des Narkotikums zu beeinflussen.

8.1.1.7 Das Modell frisch isolierter superfundierter juxtaglomerulärer Zellen

Das in dieser Arbeit verwendete Superfusionsmodell ermöglichte die Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Reninsekretion von frisch aus Rattennieren isolierten juxtaglomerulären Zellen. Versuche, die Zellen in Kultur zu vermehren, um die Experimente weiter standardisieren zu können, waren erfolglos (Finkbeiner 1997), da die reninsezernierenden Zellen bereits so weit ausdifferenziert sind, dass sie sich in Kultur nicht mehr teilen. Außerdem haben Della Bruna et al. (1991) gezeigt, dass isolierte juxtaglomeruläre Zellen der Maus innerhalb von 20 Stunden bereits sehr viel Renin verlieren. Aus diesem Grund wurden wie bereits bei Albinus et al. (1998), Finkbeiner (1997) und Sosath (1999) beschrieben, ausschließlich frisch isolierte juxtaglomeruläre Zellen für die Experimente verwendet.

Die für diese Versuche verwendeten Tiere wurden, genau wie die Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse, bis zum Versuchsbeginn unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Organentnahme erfolgte immer zur gleichen Tageszeit, um die zirkadiane Rhythmik der Tiere als Einflussfaktor zu minimieren. Die enzymatische Digestion mit einer definierten Menge Trypsin und Collagenase A erfolgte 1 Stunde bei 37°C unter Carbogenbegasung, um die Zellen mit Sauerstoff zu versorgen. Die Membranschäden und damit die Viabilität der Zellen wurde durch die Viabilitätsbestimmung mit dem Zellzählgerät „CASY®“ untersucht.

Im selben Versuchsansatz wurde auch der Einfluss von Dopamin und Vitamin C (als Oxidationsschutz) auf die Zellen geprüft. Ob und in welchem Ausmaß die membranständigen Rezeptoren durch den Verdau mit Trypsin und Collagenase A geschädigt wurden, wurde nicht bestimmt und kann somit auch nicht ausgeschlossen werden. Sämtliche Puffer und Kulturmedien, die für die weitere Aufarbeitung verwendet wurden, hatten stets die selbe Zusammensetzung (siehe Material 3.5.3). Im Anschluss an die Präparation wurde die Zellsuspension für ungefähr 1 Stunde bei 37°C im Trockenschrank äquilibriert, damit sich die Zellen regenerieren konnten. Während der Beschickung der Kammern wurden die Zellen im Wasserbad temperiert. Durch leichtes Schütteln wurde ein Absetzen der Suspension vermieden und damit eine gleichmäßige Beladung der Kammern gewährleistet. Die Kammern, welche eigens für diese Versuche in der institutseigenen Werkstatt (siehe 4.2.4)

angefertigt wurden, wurden in Bezug auf Gleichmäßigkeit, Temperatur im Innenraum und schließlich auf die Vorlaufzeit validiert. Der Radioimmunoassay wurde mit einem für Angiotensin I selektiven Antikörper und dem eigens dafür hergestellten und entsprechend verdünnten Substrat durchgeführt. Für jedes Experiment wurde eine neue Standardkurve erstellt, welche als Berechnungsgrundlage für die Reninaktivität des jeweiligen RIA diente. Die Reninaktivität der einzelnen Experimente wurde auf den Proteingehalt pro Kammer bezogen, um interexperimentelle Schwankungen möglichst auszugleichen. Bei der Zusammenfassung verschiedener Experimente wurden die Aktivitäten der einzelnen Kammern auf die jeweiligen Kontrollen desselben Experimentes bezogen. Auf diese Weise wurden die interexperimentellen Schwankungen ebenfalls berücksichtigt. Trotzdem fallen die teilweise großen Abweichungen, insbesondere bei den Zusammenfassungen von Einzelexperimenten auf, welche auf die interindividuellen Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchen zurückzuführen sind und auf die technischen Grenzen der Methode hinweisen. Die Abweichungen in dieser Arbeit waren mit denen von anderen Autoren, mit derselben oder ähnlichen Methoden, vergleichbar.

8.2 Diskussion der Ergebnisse

8.2.1 Tierexperimenteller Teil

8.2.1.1 Blutdruckmessung bei wachen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Veränderungen im dopaminergen System sind möglicherweise an der Entstehung einer arteriellen Hypertonie beteiligt. In den vergangenen Jahren ergaben sich durch die Knockout-Forschung viele neue Hypothesen und Hinweise für die Beteiligung von Dopamin Rezeptoren an der Blutdruckregulation. Ein Weiterleitungsfehler in der Signalkaskade der D₁ Rezeptoren soll zur Entwicklung einer Hypertension beitragen (Felder et al. 2000), genau wie die Deletion des Dopamin D₂ Rezeptors (Jose et al. 1992). Bei einem Dopamin D₅ Rezeptor Knockout-Modell wurde eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems gefunden, welche zu einem erhöhten

Blutdruck führte (Hollon et al. 2002). Durch die Verbindung von Dopamin selbst und der Katecholaminfreisetzung aus adrenergen Drüsen (Missale et al. 1998) und sowohl zentralen als auch peripheren noradrenergen Neuronen (Chen & Lokhandwala 1992), sind derartige Befunde durchaus erklärbar. Über die Dopamin D₂ Rezeptoren, welche hauptsächlich an präsynaptischen Nervenendigungen lokalisiert sind, abgesehen vom D₃ Rezeptor, der sowohl prä- als auch postsynaptisch gefunden wurde (Kim et al. 2005), wird die neuronale Katecholaminfreisetzung in Form einer negativen Rückkopplung gehemmt. Bei einem Knockout von Dopamin Rezeptoren der D₂ Unterfamilie ist die Kontrolle der Transmitterfreisetzung aus diesen Neuronen gestört, was unter anderem die Hyperaktivität der Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäuse (Accili et al. 1996) erklären könnte. Ferner konnte von Asico et al. (1998) gezeigt werden, dass die Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäuse unter Narkose sowohl einen erhöhten systolischen als auch diastolischen Blutdruck im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-Tieren hatten. Dabei waren die Blutdruckwerte der entsprechenden heterozygoten Mäuse in diesem Versuchsaufbau ähnlich hoch, wie die der (-/-) Tiere. Des Weiteren hatten die Knockout-Tiere eine erhöhte Plasmareninaktivität im Vergleich zu den (+/+) Mäusen. Da der D₃ Rezeptor auch in den juxtaglomerulären Zellen auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde (Sanada et al. 1997) und eine entsprechende Stimulation zur Abnahme der intrazellulären cAMP-Produktion führte, was die Reninsekretion hemmt, wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die erhöhte Plasmareninaktivität auf den fehlenden Dopamin D₃ Rezeptor dieser Knockout-Mäuse zurückzuführen war und damit die erhöhten Blutdruckwerte verursachte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Natriumurinausscheidung der dort verwendeten (-/-) Tiere, infolge einer akuten Natriumbeladung, kleiner war als bei den beobachteten Wildtyp-Mäusen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde geschlossen, dass die erhöhten Blutdruckwerte durch die verminderte Natriumurinausscheidung, infolge des aktivierten RAAS zustande gekommen sein könnten. Shigetomi et al. (1986) zeigten, dass Wistar Ratten, die mit 1 % NaCl und Metoclopramid – einem unselektiven D₂ Rezeptor Antagonisten - behandelt wurden, einen höheren Blutdruck hatten als die Tiere, die ausschließlich 1 % NaCl erhielten oder die unbehandelten Kontrollen. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass salzresistente Dahl Ratten, welche auf einer Hochsalzdiät keinen Bluthochdruck entwickeln, bei Dopamin D₃ Rezeptor Blockade, hypertensiv wurden (Luippold et al. 2001), wobei keine erhöhte

Natriumurinausscheidung bei diesen Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen zu beobachten war.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten wachen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen wurde der Blutdruck auf Normalsalz-, Niedrigsals- und Hochsalzdiät über einen Zeitraum von 5 Wochen verfolgt. Durch das Cross-over Studiendesign (siehe 4.1.1.3) konnte die Beteiligung des Dopamin D₃ Rezeptors an der Regulation des Blutdruckes über die Natriumausscheidung beobachtet werden. Ferner wurden 3 und 11 Monate alte Tiere untersucht, um die bereits beschriebenen Alterungseffekte im dopaminergen System beobachten zu können (Ricci 1990), (Ricci et al. 1996).

Die 3 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäuse zeigten keinen erhöhten Blutdruck im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Auch niedrige und hohe Kochsalzbeladungen, unterstützt durch das Schleifendiuretikum Furosemid, welches die Natriumurinausscheidung fördern sollte, bzw. das Mineralocorticoid DOCA, welches die Natriumreabsorption steigern sollte, brachten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zum Vorschein. Dabei spielte es auch keine Rolle, in welcher Reihenfolge die Diäten verabreicht wurden.

Bei den 11 Monate alten Tieren zeigten sich dagegen Blutdruckunterschiede zwischen den (-/-) und den (+/+) Mäusen, sowohl auf Niedrig- als auch auf Hochsalzdiät. Dies könnte darauf hindeuten, dass das dopaminerge System, wie bei Ricci (1990), Galbusera et al. (1988) und Kansra et al. (1997) beschrieben, einem Alterungsprozess unterliegt. Die Konsequenzen des Fehlens des Dopamin D₃ Rezeptors, welche bei jungen Tieren möglicherweise noch durch eine Mehrausschüttung von Dopamin kompensiert werden, könnten bei den älteren, bei denen der fehlende Rezeptor nicht mehr ausgeglichen werden kann, auftreten. Das Alter der Tiere von Asico et al. (1998) war in dieser Publikation nicht angegeben. Möglicherweise kommen die von jener Arbeitsgruppe gefundenen Unterschiede erst ab einem Alter zum Vorschein, welches jenseits dem der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere liegt. Die Unterschiede zwischen den 3 und den 11 Monate alten Mäusen waren, wenn man die Genotypen der einzelnen Diätgruppen jeweils miteinander vergleicht, nicht besonders groß.

Ältere (-/-) Mäuse, die mit der Diätreihenfolge NS-LS-HS behandelt wurden, wiesen auf allen Diäten teilweise signifikant höhere Blutdruckwerte als die Wildtypen auf. Für die älteren (-/-) Tiere, die mit der Reihenfolge NS-HS-LS behandelt worden waren, traf das tendenziell nur für NS und LS, nicht aber HS zu. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass sich die Blutdruckwerte bei den (-/-) Mäusen nicht zwangsweise mit dem Alter erhöhen, sondern nur, dass die Flexibilität des dopaminergen Systems im Alter etwas abnimmt und sich nicht mehr in der Form an die wechselnden Kochsalzdiäten anpassen kann, wie bei den Jüngeren.

Weitere Gründe für die Unterschiede zwischen den Beobachtungen an dem von Asico et al. (1998) beschriebenen Knockout-Modell und den hier verwendeten Mäusen liegen möglicherweise im unterschiedlichen genetischen Hintergrund. Beim ersteren wurde das Knockout Konstrukt in das Exon 2 eingefügt, während es bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tieren zum größten Teil das Exon 1 ersetzt. Obwohl bei beiden Modellen die Funktion des Dopamin D₃ Rezeptors ausgeschaltet wurde, bestehen doch Unterschiede - wie die bereits erwähnte Hyperaktivität oder die erhöhten Blutdruckwerte - zwischen den von Accili et al. (1996) und Asico et al. (1998) beschriebenen Mäusen und den Tieren, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Einen weiteren wichtigen Faktor stellt sicherlich die Narkose dar. Durch ein Narkotikum kann der Blutdruck wesentlich beeinflusst werden. Wird die Dosierung niedrig gewählt, ist bei insuffizienter Narkosetiefe, der Blutdruck höher als bei einer ausreichend hohen Dosierung. Pentobarbital hemmt als Barbitursäure die Ca²⁺-abhängige Noradrenalin- und Dopaminfreisetzung über spannungsabhängige Calciumkanäle (VOCCs) (Masuzawa et al. 2003), (Hirota et al. 2000), (Lim et al. 1997). Durch die positiv inotrope Wirkung von Noradrenalin über β_1 Rezeptoren am Myocard und durch die Sekretionssteigerung von Renin an den juxtaglomerulären Zellen, kann der Blutdruck gesteigert werden. Fällt nun dieser Stimulus systemisch durch die Blockade durch Pentobarbital aus, kann es zu einem Blutdruckabfall und einer verminderten Reninsekretion kommen. Allerdings konnten Maignan et al. (2000) experimentell nachweisen, dass durch eine Pentobarbital Narkose die Noradrenalinausschüttung und -Clearance bei narkotisierten Ratten deutlich verringert und damit der Plasmaspiegel von Noradrenalin unverändert war.

Wie bereits ausgeführt, kann Dopamin über präsynaptische Rezeptoren der D₂ Familie – evtl. also auch über den Dopamin D₃ Rezeptor - über einen Rückkopplungsmechanismus, die Noradrenalinfreisetzung hemmen (Felder et al. 2000), (Chen & Lokhandwala 1992). Eine mögliche Erklärung der teilweise erhöhten Blutdruckwerte der 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) Mäuse könnte somit der eingeschränkte negative Rückkopplungsmechanismus der Noradrenalinfreisetzung dieser Tiere sein. Von Johnson & Schreiner (1997) wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Entwicklung der Hypertonie in zwei Phasen verläuft. In der Frühphase führt eine Überfunktion des sympathischen Nervensystems oder des RAAS zu kurzen, wiederkehrenden Episoden erhöhter Blutdruckwerte. In der zweiten Phase schließlich persistiert der erhöhte Blutdruck, welcher auf einer, durch einen ständig erhöhten Katecholaminspiegel verminderten Natriumurinausscheidung beruhen soll.

8.2.1.2 Natriumurinausscheidung unter chronischer Kochsalzbelastung

Dopamin selbst wird häufig als natriuretisches Hormon beschrieben (Eklof 1997), (Wiederkehr et al. 2001). Carey et al. (1981) berichteten, dass unter Kochsalzrestriktion sowohl die Dopaminkonzentration im Plasma als auch die Dopaminurinausscheidung abnahmen. Im proximalen Tubulus werden ungefähr 65% des filtrierten Natriums resorbiert. Die Aufnahme aus dem Tubuluslumen erfolgt über den Na⁺-H⁺-Austauscher (NHE3), welcher wiederum für seine Funktion die basolaterale Na⁺-K⁺-ATPase als primär aktiven Transport benötigt. Diese wird durch Dopamin gehemmt, wobei die Wirkung dabei sowohl über Dopamin D₁ als auch D₂ Rezeptoren vermittelt wird (Bertorello & Aperia 1990). In der genannten Arbeit konnte in vitro gezeigt werden, dass die dopaminerge Hemmung der ATPase durch selektive Antagonisten abgeschwächt werden kann. Dabei wurde auch berichtet, dass ein selektiver D₂ Rezeptor Agonist alleine die Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase nicht beeinflusst. Nach Eklof (1997) steigerte der Dopamin D₁ Rezeptor Agonist Fenoldopam an Ratten die Natriumurinausscheidung signifikant, während die gleichzeitige Applikation des D₁ Agonisten zusammen mit einem D₂ Antagonisten die Natriurese nicht veränderte. Durch weitere Experimente mit dem Dopadecarboxylase

Hemmer Beserazid, welches die Dopaminproduktion hemmt, wurde die Wirkung des Fenoldopams abgeschwächt. Somit ist die natriuretische Wirkung von Dopamin sowohl von der Stimulation der D₁ als auch der D₂ Rezeptoren abhängig, wobei der D₂ Rezeptor vom endogenen Dopamin konstitutiv aktiviert wird und damit D₁ und D₂ Rezeptoren synergistisch wirken.

Asico et al. (1998) konnten bei den von ihm untersuchten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäusen eine verminderte Natriumurinausscheidung im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren feststellen. Da zur Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase sowohl eine Hemmung der D₁ als auch der D₂ Rezeptoren notwendig ist (Bertorello & Aperia 1990) und bei den Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäusen nun dieser, zur D₂ Subfamilie gehörende Rezeptor fehlt, könnte die Na⁺-K⁺-ATPase in der basolateralen Membran nicht mehr in dem Ausmaß gehemmt werden, wie bei den Tieren mit intaktem D₃ Rezeptor. Infolge dessen würde luminal über den NHE3 mehr Natrium reabsorbiert werden. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten (-/-) Tiere hatten in beiden Altersstufen sowohl auf Normalsalz- als auch auf Hochsalzdiät eine tendenziell niedrigere Natriumurinausscheidung und eine teilweise signifikant höhere Natriumbilanz als die Wildtyp-Tiere. Durch die Beobachtung der wachen Tiere über einen Zeitraum von jeweils 1 Woche auf der entsprechenden Diät konnte der Verlauf der Natriumurinausscheidung verfolgt werden. Die von Asico et al. (1998) durchgeführten Experimente dagegen zeigten die Natriumurinausscheidung über einen Zeitraum von ungefähr 3 Stunden und damit nur akute Effekte. Auch in der eigenen Arbeitsgruppe wurden mit den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Mäusen Experimente mit einer akuten Natriumbeladung durchgeführt. Pech (2003) fand bei wachen, normalsalzernährten (-/-) und (+/+) Mäusen nach akuter Natriumbeladung per Schlundsonde keine Unterschiede in der Natriumurinausscheidung. Dabei bekam eine Gruppe eine Hochsalzbeladung (4,6 % NaCl bezogen auf 5 % des Körpergewichtes) und die andere eine Normalsalzbeladung (0,6 % NaCl bezogen auf 5 % des KG). Die Natriumurinausscheidung wurde innerhalb der ersten Stunde und zwischen der zweiten und vierten Stunde nach der Beladung gemessen. Die Natriumurinausscheidung variierte zwar abhängig von der verabreichten Natriumkonzentration und nahm auch zwischen der 2. und 4. Stunde gegenüber der ersten ab, aber es waren weder unter Normal- noch unter Hochsalzbeladung Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu erkennen.

Weitere Versuche von Tappe (2003) aus der eigenen Arbeitsgruppe wurden mit denselben Tieren durchgeführt, welche zuvor mit einer Hochsalzdiät ernährt wurden. Die wachen Mäuse erhielten eine Hochsalzbelastung per Schlundsonde und innerhalb der ersten und zwischen der zweiten und vierten Stunde wurde wiederum die Natriumurinausscheidung bestimmt. Auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen den (-/-) und den (+/+) Mäusen. Aufgrund der Ergebnisse von Pech (2003) und Tappe (2003) und der Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit lässt sich vermuten, dass sich zumindest in diesem experimentellen Ansatz, Unterschiede zwischen den (-/-) und (+/+) Mäusen bzgl. der Natriumurinausscheidung bzw. –bilanz, nur dann beobachten lassen, wenn die Tiere über einen längeren Zeitraum auf der entsprechenden Diät gehalten und untersucht werden. Die von Asico et al. (1998) beschriebenen Unterschiede in der Natriumurinausscheidung, zwischen den Knockout- und Wildtyp-Tieren, könnten somit ebenfalls durch Narkoseeffekte beeinflusst worden sein.

Kansra et al. (1997) berichteten, dass bei 6 Monate alten Fischer 344 Ratten die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ durch den selektiven Dopamin D_1 Rezeptor Agonisten SKF 38393 konzentrationsabhängig gehemmt wurde, während bei den 23 Monate alten Tieren dieser Effekt ausblieb. Die Autoren führten dies auf die bei den älteren Tieren gefundene niedrigere Rezeptorenzahl zurück. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten in Bezug auf die Natriumurinausscheidung Altersunterschiede beobachtet werden. Im Alter von 11 Monaten hatten sowohl die Dopamin D_3 Rezeptor (-/-) als auch die (+/+) Mäuse auf Normalsalzdiät eine signifikant niedrigere Natriumurinausscheidung als die jüngeren Tiere. Auf der Hochsalzdiät hatten die 11 Monate alten Knockout- und Wildtyp-Mäuse dagegen eine signifikant höhere Natriumurinausscheidung als die 3 Monate alten Tiere. Wie bereits erwähnt, könnten zur Hemmung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ sowohl die D_1 als auch die D_2 Rezeptoren notwendig sein (Bertorello & Aperia 1990). Da die 11 Monate alten Mäuse insgesamt mehr Dopamin in das Nierengewebe freisetzen als die jüngeren und zudem die (-/-) Tiere tendenziell mehr als die (+/+) Mäuse, ist es möglich, dass die älteren aufgrund der höheren Dopaminkonzentration im Nierengewebe, auf Hochsalzdiät die reduzierte D_1 Rezeptorenzahl ausgleichen können. Solches ist von spontan hypertensiven Ratten (SHR) berichtet worden, die versuchen, den vermuteten „Rezeptor-Kopplungs Defekt“ (Felder et al. 2000), durch eine Mehrausschüttung an

Dopamin auszugleichen (Sigetomi & Fukuchi 1993). Sowohl auf Normal- als auch auf Hochsalzdiät hatten die in dieser Arbeit beschriebenen Knockout-Mäuse eine tendenziell niedrigere Natriumurinausscheidung als die altersgleichen Wildtyp-Tiere.

Die Bilanz errechnet sich aus der Natriumaufnahme durch das Futter abzüglich der Urinausscheidung. Da die Bilanz bei den untersuchten Tieren auf allen Diäten positiv war – auf der Hochsalz- noch mehr als auf der Normalsalzdiät – muss davon ausgegangen werden, dass die Mäuse über die Fäces das restliche Natrium ausgeschieden haben. Setzt man nun die Bilanz der jeweiligen Wildtyp-Tiere als Bezugsgröße auf Null, hatten die 11 Monate alten (-/-) Mäuse auf Normalsalzdiät eine positive Natriumbilanz. Auf Hochsalzdiät war bei diesen die Bilanz, bezogen auf die entsprechenden Wildtypen, vergleichbar mit der auf NS-Diät. Dabei waren beide Bilanzwerte niedriger als bei den jüngeren Knockout-Tieren. Bei diesen war die Bilanz sowohl auf Normal- als auch auf Hochsalzdiät stärker positiv als bei den älteren Mäusen. Bei den HS-ernährten Tieren war die Natriumbilanz größer als auf NS-Diät. Die niedrigere Bilanz der älteren Tiere kommt u.a. dadurch zustande, dass diese weniger gefressen und damit auch weniger Natrium aufgenommen hatten, als die jüngeren Tiere. Da die Bilanz bei den (-/-) Mäusen auf sämtlichen Diäten, bezogen auf die entsprechenden (+/+) Tiere positiv war, könnte dies auf eine direkte Beteiligung des Dopamin D₃ Rezeptors bei der Natriumurinausscheidung hinweisen. Bezieht man nun die Ergebnisse der chronischen Kochsalzbelastung der wachen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse auf die Ergebnisse der Blutdruckexperimente, kann aufgrund dieser Resultate die von Asico et al. (1998) aufgestellte Hypothese, dass die erhöhten Blutdruckwerte direkt durch die verminderte Fähigkeit zur Natriumurinausscheidung zustande kommen, bei wachen Tieren des vorliegenden Knockout-Modells nur teilweise bestätigt werden. Die Natriumbilanz unter HS-Beladung bei den jüngeren Knockout-Tieren war höher als bei den älteren, während diese Mäuse keine erhöhten Blutdruckwerte im Vergleich zu den Wildtypen hatten. Nur die älteren (-/-) Mäuse hatten teilweise signifikant erhöhte Blutdruckwerte im Vergleich zu ihren Kontrolltieren. Ferner besteht eine Diskrepanz zwischen den Blutdruckwerten und der Natriumurinausscheidung bei dem von Asico et al. (1998) beschriebenen Knockout-Modell. Die heterozygoten Tiere des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Knockout-Modells wurden nicht untersucht. Die von Asico et al. (1998) beobachteten heterozygoten Tiere wiesen die

gleichen erhöhten Blutdruckwerte auf wie die homozygoten Knockout-Mäuse, aber eine normale Natriumurinausscheidung. Somit scheint die Hypothese, dass die erhöhten Blutdruckwerte der (-/-) Mäuse auf einer verminderten Natriumurinausscheidung beruhen, äußerst fragwürdig.

8.2.1.3 Einfluss der chronisch verabreichten Kochsalzdiäten auf physiologische Funktionen

Der Einfluss unterschiedlicher chronisch verabreichter NaCl-Diäten auf verschiedene Funktionen, wie die renale Hämodynamik, Blutdruck oder GFR, ist lange bekannt und wurde auch im Hinblick auf das dopaminerge System mehrfach diskutiert (Asico et al. 1998), (Ueda et al. 2003). Auch über eine altersabhängige Veränderung dieser Größen wurde bereits berichtet (Hackbarth & Harrison 1982), (Fliser et al. 1997), (Pech 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde an 3 und 11 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen der Einfluss dreier Kochsalzdiäten über 6 Wochen bzw. 6 Monaten auf die Variablen Körper-, Nieren- und Herzgewicht sowie den Hämatokrit und die Natriumkonzentration im Plasma untersucht.

Beim Körpergewicht konnte weder im Alter von 3 noch von 11 Monaten ein Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren beobachtet werden. Unterschiede zeigten sich jedoch beim Vergleich der NaCl-Diäten. Die Körpergewichte der 3 Monate alten (-/-) und (+/+) Mäuse waren bereits nach 6 Wochen auf Niedrigsalzdiät niedriger (teilweise signifikant) als auf Normal- oder auf Hochsalz. Dies galt – in noch deutlicherer Ausprägung - auch für 11 Monate alte Tiere. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Mäuse von der Niedrigsalzdiät – evtl. aus Abneigung gegen den Geschmack - weniger fraßen. Durch eine solche kalorische Minderzufuhr hätten sie in geringerem Ausmaß zugenommen wie auf NS- und HS-Diät. Immerhin muss die kalorische Bilanz in jedem Fall positiv gewesen sein, da die Tiere im Zeitverlauf an Körpergewicht zunahmten. Die Gewichtsunterschiede zwischen den 3 NaCl-Diäten waren nicht vergleichbar mit den Befunden von Wang et al. (2001) bei 4 bis 6 Monate alten α ENaC (+/+) und (+/-) Mäusen, welche auf einem ähnlichen Diätschema, mit 0,1 %, 0,4 % bzw. 1,6 %

NaCl, keine Gewichtsunterschiede aufwiesen. Die Diskrepanz zwischen den von Wang et al. (2001) und den in dieser Arbeit untersuchten Tieren könnte dadurch zustande gekommen sein, dass die Mäuse unterschiedlich lange auf den Kochsalzdiäten gehalten wurden. Bei Wang et al. (2001) erhielten die Mäuse 2 Wochen lang die jeweilige Diät, während die Tiere in der vorliegenden Arbeit über 6 Wochen bzw. 6 Monate das entsprechende Futter bekamen. Die Unterschiede im NaCl-Gehalt zwischen den Hochsalzdiäten beider Arbeiten scheinen von untergeordneter Bedeutung zu sein, da die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Gewichtsunterschiede zwischen den Mäusen auf Niedrig- und Normalsalzdiät gefunden wurden, während die Tiere auf Hochsalzdiät sich nicht von denen auf NS unterschieden.

Die Nieren-/ Körper-Gewichtsverhältnisse waren bei den 11 Monaten alten Tieren tendenziell höher als bei den jüngeren. Somit war die Zunahme des Nierengewichtes etwas größer als die des Körpergewichtes. Bei Hackbarth & Harrison (1982) war das Nieren-/ Körper-Gewichtsverhältnis bei 67 Tage alten C57BL/6 Tieren höher als bei den 202 Tage alten Mäusen. Das Verhältnis fiel bis zum Alter von 463 Tagen ab und stieg dann bis zum Alter von 711 Tagen steil an. Dieser Anstieg wurde auf die überproportionale Zunahme des Nierengewichtes zurückgeführt und stellt wahrscheinlich eine Kompensationshypertrophie des Nierengewebes dar, um der verminderten Leistung der alternden Niere entgegenzuwirken. Zwischen den beiden Genotypen waren auch hier keine großen Unterschiede zu erkennen. Daraus lässt sich für das hier verwendete Tiermodell ableiten, dass sich die Niere nicht aufgrund chronischer Kochsalzrestriktion bzw. -belastung, verändert, sondern nur aufgrund des Funktionsverlustes im Alter eine Hypertrophie aufweist.

Das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht der 11 Monate alten (-/-) Mäuse war niedriger als das der jüngeren Tiere: Tendenziell auf Niedrig- und Normalsalz-, signifikant auf Hochsalzdiät. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Herzmasse bei diesen Tieren nicht proportional zum Körpergewicht zugenommen hat. Bei den Wildtypen waren die Unterschiede zwischen den jüngeren und den älteren Tieren nicht so stark ausgeprägt wie bei den Knockout-Mäusen, was auf eine mehr parallele Zunahme von Herz- und Körpergewicht hinweist. Aufgrund dieser Befunde lässt sich eine Hypertrophie des Herzmuskels ausschließen, welche bei

chronisch erhöhten Blutdruckwerten und damit verbundener Vorlasterhöhung zu erwarten gewesen wäre. Da, wie an anderer Stelle beschrieben, keine relevant erhöhten Blutdruckwerte gemessen wurden, erhöht dies die innere Konsistenz der Beobachtungen.

Änderungen des Hämatokrit sind ein indirektes Maß für Änderungen des Extrazellulärvolumens (ECV). Dieses wird, u.a. durch die Feinregulation der Niere, weitgehend konstant gehalten. Sowohl bei den alten als auch den jungen Mäusen unterschieden sich die Hämatokrit-Werte der Knockout- und der Wildtyp-Tiere nur minimal. Auch zwischen den verabreichten NaCl-Diäten und den beiden Altersgruppen gab es keine großen Schwankungen, wodurch verdeutlicht wird, dass das ECV auch unter diesen Bedingungen konstant gehalten wird.

Die Natriumkonzentration im Plasma zeigte keine erkennbaren Unterschiede oder Tendenzen. Weder zwischen den Knockout- und Wildtyp-Mäusen noch zwischen den beiden untersuchten Altersgruppen gab es signifikante Unterschiede. Daraus lässt sich schließen, dass die Feinregulation des Elektrolythaushaltes, zumindest was das Natrium angeht, auch bei Fehlen des Dopamin D₃ Rezeptors konstant gehalten werden kann. Sollte der D₃ Rezeptor wesentlich an der renalen Natriumurinausscheidung beteiligt sein, müssten Kompensationsmechanismen, z.B. erhöhte Natriumausscheidung über die Fäces, vorliegen. Akute Volumenexpansionsexperimente bei normalsalz- und hochsalzernährten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäusen, die von Tappe (2003) in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, zeigten keinen Anstieg der Natriumkonzentration im Plasma bei einer akuten Kochsalzbeladung, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die vorgeschlagenen Kompensationsmechanismen sowohl bei akuter als auch bei chronischer Natriumexposition funktionieren, oder dass der D₃ Rezeptor nicht wesentlich an der renalen Natriumurinausscheidung beteiligt ist.

8.2.1.4 Abschätzen der GFR mit Hilfe der Kreatininclearance

Die GFR-Werte der Knockout-Mäuse, ermittelt anhand der renalen Clearance von Kreatinin, waren tendenziell niedriger als bei den Wildtyp-Tieren. Dies traf sowohl für beide Altersgruppen als auch für alle 3 Diäten zu und erinnert an Beobachtungen aus der eigenen Arbeitsgruppe, dass die Stimulation der Dopamin D₃ Rezeptoren durch den selektiven Agonisten 7-OH-DPAT zu einer Steigerung der GFR führte (Luippold et al. 1998). Ähnlich berichteten bereits vor Jahren (Seri & Aperia 1988) einen Anstieg der single nephron GFR (SNGFR) nach Stimulation der D₂ Rezeptoren. Somit könnte sich bei Ausschaltung des Dopamin D₃ Rezeptors, als Mitglied der D₂ Unterfamilie, die Stimulation der glomerulären Filtrationsrate verringern.

8.2.1.5 Bestimmung von Dopamin im Plasma, Urin und Nierengewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dopaminplasmakonzentration, die Dopaminurinausscheidung und der Dopamingehalt im Nierengewebe der Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse bestimmt. Beim Plasmadopamingehalt wird das aus den synaptischen Endigungen der Neuronen freigesetzte und das systemisch zirkulierende Dopamin gemessen. Dieses wirkt vor allem an zentralen Dopaminrezeptoren und wird dann enzymatisch abgebaut und zusammen mit seinen Abbauprodukten sowohl glomerulär filtriert als auch sezerniert (Baines et al. 1979). Dabei konnte in der genannten Arbeit auch gezeigt werden, dass peritubuläres Dopamin in 3-Methoxytyramin umgewandelt und zusammen mit Dopamin sezerniert und ausgeschieden wird. Ferner wurde von einigen Autoren beschrieben, dass eine Hochsalzdiät die Dopaminurinausscheidung erhöhen soll (Alexander et al. 1974), (Bass & Murphy 1990). Carey et al. (1981) beschrieben, dass eine Kochsalzrestriktion beim Menschen zu einer Abnahme sowohl der Dopaminurinausscheidung als auch der Dopaminplasmakonzentration führt, während Baines (1982) auf HS- und LS-Diät keine Unterschiede bzgl. der Dopaminsekretion fand. In seinen Experimenten sollen 21 % des Dopamins im Urin neuronalen Ursprungs gewesen sein. Dopamin wird im Nierengewebe zu einem geringen Teil in renalen Neuronen und zum größten Teil in den proximalen Tubuluszellen mit Hilfe der

Dopadecarboxylase gebildet (Hayashi et al. 1990). In der zitierten Arbeit konnte eine Aktivitätssteigerung dieses Enzyms lediglich auf Niedrigsalzdiät beobachtet werden, aber nicht während Hochsalz- und Kontrollbedingungen. Oates et al. (1979) berichteten, dass die Dopaminurinausscheidung beim Menschen durch eine Hochsalzdiät gesteigert werden konnte, wohingegen die Plasma Dopaminkonzentration davon nicht beeinflusst wurde. Auch in der eigenen Arbeitsgruppe konnte bei Ratten auf HS-Diät eine erhöhte Dopaminurinausscheidung im Vergleich zur LS-Diät beobachtet werden (Mühlbauer & Osswald 1993). Somit hängen die Plasma Dopaminkonzentration, die Dopaminurinausscheidung und der Dopamingehalt im Nierengewebe nur bedingt zusammen und müssten getrennt betrachtet und beurteilt werden. Auch Altersunterschiede bezüglich der Dopaminurinausscheidung und des Dopamingehalts im Nierengewebe sind beschrieben worden (Armando et al. 1995). In jener Arbeit wurde gezeigt, dass die Dopaminurinausscheidung bei 12 Monate alten Wistar Ratten niedriger war als bei den 3 Monate alten Tieren. Auch der Dopamingehalt im Nierengewebe dieser Tiere war bei den älteren Ratten signifikant niedriger als bei den jüngeren, obwohl die Dopadecarboxylaseaktivität bei den älteren um über das Doppelte höher war. Allerdings war auch eine Aktivitätssteigerung der Monoaminoxidase (MAO), als Amin-abbauendes Enzym, zu beobachten. Laut Soares-da-Silva & Fernandes (1991) wird im Nierengewebe neu gebildetes Dopamin zu einem beachtlichen Anteil in DOPAC umgewandelt. Dieses nimmt aber bei den älteren Tieren in der Arbeit von Armando et al. (1995) ebenfalls ab. Daher erfolgt der schnellere Abbau des durch die gesteigerte Dopadecarboxylaseaktivität vermehrt gebildeten Dopamins, trotz der höheren MAO-Aktivität, wahrscheinlich nicht durch Deaminierung. Bei Fischer 344 Ratten konnte die Dopaminurinausscheidung durch eine Hochsalzdiät bei 6 Monate alten Tieren gesteigert werden, wohingegen bei 24 Monate alten Ratten dieser Effekt ausblieb (Vieira-Coelho et al. 1999). Außerdem konnte in derselben Arbeit gezeigt werden, dass der Dopamingehalt im Nierengewebe von älteren Tieren, bei gesteigerter Dopadecarboxylaseaktivität, gegenüber den jüngeren erhöht war. Ferreira et al. (2001) fanden bei einer Studie am Menschen, dass bei den „Kontrollen“ eine Niedrigsalzdiät keinen Einfluss auf die L-DOPA- und die Dopaminurinausscheidung hatte. In der Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch das Alter die renale Dopaminproduktion nicht beeinflusste.

Die Dopaminkonzentration im Plasma der in dieser Arbeit untersuchten Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) und (+/+) Mäuse zeigte, abgesehen von den 3 Monate alten Mäusen auf LS- und NS-Diät, keine großen Unterschiede bezüglich der beiden Genotypen und der verabreichten Kochsalzdiäten. Aufgrund des fehlenden Dopamin D₃ Rezeptors hätte aufgrund physiologischer Gegenregulation eine Mehrausschüttung von Dopamin erwartet werden können, um die mangelnde Signalgebung des D₃ Rezeptors zu kompensieren. Da dies nicht der Fall war, ist entweder der D₃ Rezeptor unter den geprüften Bedingungen funktionell von untergeordneter Bedeutung oder wird, mit größerer Wahrscheinlichkeit, durch andere Rezeptoren der D₂ Unterfamilie funktionell kompensiert. Auffallend ist allerdings, dass die 11 Monate alten Tiere, abgesehen von den (+/+) Mäusen auf NS-Diät, eine tendenziell höhere Plasma Dopaminkonzentration aufwiesen als die jüngeren. Diese Beobachtung kann durch die bereits erwähnten Untersuchungen von Ricci (1990) und Ricci et al. (1996) unterstützt werden, die zeigten, dass mit zunehmendem Alter die Dichte der D₁ Rezeptoren in der Niere und im ZNS sowie die der Rezeptoren der D₂ Unterfamilie im ZNS abnimmt. Im gleichen Sinne, wie bei spontan hypertensiven Ratten gezeigt, könnte dies zu einer Mehrausschüttung von Dopamin führen.

Bei der Dopaminurinausscheidung war der Sachverhalt in der vorliegenden Arbeit ähnlich. Die Ausscheidung der jüngeren D₃ Rezeptor (-/-) Mäuse war tendenziell höher als die der altersgleichen (+/+) Tiere. Bei den 11 Monate alten Mäusen war die Dopaminurinausscheidung, abgesehen von den Knockout-Tieren auf LS Diät, tendenziell höher als bei den jungen Mäusen. Die von Alexander et al. (1974), Bass & Murphy (1990) und Carey et al. (1981) beschriebenen NaCl-abhängigen Effekte konnten bei dem hier untersuchten Tiermodell nicht bestätigt werden. Dagegen stimmen die Ergebnisse mit denen von Baines (1982) überein, der ebenfalls keine Diäteinflüsse finden konnte.

Der Dopamingehalt im Nierengewebe zeigte bei den 3 Monate alten Mäusen keine großen Unterschiede. Allerdings hatten die 11 Monate alten Tiere einen signifikant höheren Dopamingehalt im Nierengewebe als die 3 Monate alten Mäuse, wobei die (-/-) Tiere tendenziell höhere Werte aufwiesen als die entsprechenden (+/+) Mäuse. Eine mögliche Erklärung findet sich wiederum bei den Befunden von Ricci (1990) und Galbusera et al. (1988), die eine Abnahme der Dopamin Rezeptordichte mit

dem Alter berichteten. Dies zieht eine Steigerung der Dopadecarboxylaseaktivität nach sich (Armando et al. 1995) und infolge dessen, wie bei Vieira-Coelho et al. (1999) beschrieben, zu einem erhöhten Dopamingehalt im Nierengewebe. Diese höhere Dopaminfreisetzung der (-/-) Mäuse stellt vermutlich einen Kompensationsmechanismus dar, um den fehlenden Dopamin D₃ Rezeptor auszugleichen.

Die unterschiedlichen Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu einigen anderen Autoren, in Bezug auf die Dopaminurinausscheidung und den Dopamingehalt im Nierengewebe, könnten auf die verschiedenen Tiermodelle oder Spezies sowie auf unterschiedliche Bedingungen der Studien zurückzuführen sein. So erhielten die untersuchten Probanden oder Tiere unterschiedlich lange die verschiedenen NaCl-Beladungen. Meistens wurden akute Expansions- oder Beladungszustände beschrieben. Dopamin ist möglicherweise nur für die Modulation unter NaCl Spitzenspiegeln zuständig, während bei längerer Exposition, wie bei den hier beschriebenen Experimenten, andere Mechanismen zum Tragen kommen könnten, die bisher noch nicht ausreichend untersucht worden sind. Hierbei müssten die genannten Variablen auch in kürzeren Zeitintervallen beobachtet werden, um Änderungen oder Gegenregulationsmechanismen im Zeitverlauf erkennen zu können. Dabei sollten sowohl die Syntheseaktivität von Dopamin bei alten und jungen Tieren als auch die Aktivität der abbauenden Enzyme in der Niere und die jeweiligen Ausscheidungsprodukte identifiziert und quantifiziert werden.

8.2.1.6 Plasmareninaktivität

Die Plasmareninaktivität der in dieser Arbeit untersuchten 3 Monate alten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäuse verhielt sich nicht so, wie es aus physiologischen Erwägungen bei den verabreichten Kochsalzdiäten zu erwarten gewesen wäre. Bei den (-/-) Mäusen waren die Werte unter der Niedrigsalzbedingung tendenziell niedriger und auf Hochsalzdiät höher als bei den normalsalzernährten Tieren. Bei den Wildtyp-Mäusen gab es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Diäten, lediglich die normalsalzernährten Tiere wiesen eine niedrigere Plasmareninaktivität als LS- oder HS-ernährte Mäuse auf.

Diese Ergebnisse sind schwer mit den gefundenen Aldosteron Werten der gleichen Tiere in Einklang zu bringen, da diese klar der Kontrolle des Renin-Angiotensin Systems unterliegen. Allerdings konnten Cholewa & Mattson (2001) bei Swiss-Webster Mäusen ebenfalls keine Veränderungen der Plasmareninaktivität auf Normal- und Hochsalzdiät finden, wobei auch die Blutdruckwerte durch die beiden Salzdiäten nicht beeinflusst wurden. Die Konzentration des Plasmarenins dagegen und auch die Aldostronkonzentrationen waren bei den hochsalzernährten Tieren in der zitierten Arbeit niedriger als auf Normalsalzdiät und damit so, wie man sie physiologischerweise bei den verabreichten Kochsalzdiäten erwartet hätte. Skott (2002) schloss daraus, dass die Aktivität des Renin-Angiotensin Systems besser mit der Konzentration des Plasmarenins korreliert als mit der Plasmareninaktivität. Die 3 wichtigsten Regulationsmechanismen, β -adrenerge Stimulation, Barorezeptor-mechanismus und Macula densa Mechanismus (siehe 1.3.2.2), werden durch weitere Mediatoren/ Modulatoren ergänzt. Der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) können die Reninsekretion konzentrationsabhängig steigern (Antonipillai et al. 1990). Auch Wachstumsfaktoren, wie der Transforming Growth Factor- β s (TGF- β s), stimulieren in niedrigen und hemmen in höheren Konzentrationen die Reninfreisetzung. Dies erklärt allerdings noch nicht, weshalb sich die Plasmareninaktivität nicht entsprechend der Aldosteronkonzentrationen verhielt, die in physiologischer Weise den NaCl-Diäten folgte. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die doch im unteren Bereich liegende Reninaktivität (Meneton et al. 2000) in geringerem Maße die Aldosteronsekretion beeinflusst und erst höhere Aktivitäten eine Rolle spielen. Auch andere Enzyme, wie Kallikrein und Catepsin D, die in der Niere in relativ hoher Konzentration vorkommen, können aus Angiotensinogen Angiotensin (AT) I und AT II abspalten und damit die Aldosteronsynthese stimulieren. Ob diese Mechanismen für die geschilderten Diskrepanzen verantwortlich sind, muss durch weitere Experimente mit Bestimmung der entsprechenden Enzymaktivitäten geprüft werden.

Capponi & Vallotton (1976) fanden bei Schnitten von Rattennieren bei jüngeren Tieren eine höhere Reninsekretion als bei den älteren. Des Weiteren wird in dieser Arbeit eine Abnahme der Reninsekretion um bis zu 50 % durch eine Erniedrigung der Natriumkonzentration beschrieben. Diese Ergebnisse stehen zumindest zum Teil mit denen in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen in Einklang. Die niedrigere

Aktivität auf der LS-Diät, bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten 3 Monate alten Knockout-Mäusen, entspricht den in der zitierten Arbeit beschriebenen Effekten, genau wie die tendenziell höhere Reninaktivität der jüngeren Tiere im Vergleich zu den älteren.

Signifikante Unterschiede in der Plasmareninaktivität zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen konnten weder bei den 3 noch bei den 11 Monate alten Tieren beobachtet werden. Dafür war die Plasmareninaktivität bei den 11 Monate alten Mäusen sowohl bei den (-/-) als auch bei den (+/+) Tieren so, wie man sie physiologischerweise erwartet hätte, wobei die Reninaktivität der älteren Knockout-Tiere auf Niedrig- und auf Normalsalzdiät tendenziell niedriger als bei den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen war. Die von Asico et al. (1998) berichteten erhöhten Reninaktivitäten, bei den von ihm untersuchten (-/-) Mäusen, könnten durch die Operation verursacht worden sein, da bei chirurgischen Manipulationen vermehrt Prostaglandine freigesetzt werden, welche die Sekretion modulieren (Hackenthal et al. 1990). Dies erklärt allerdings nicht die von Asico et al. (1998) beschriebenen Unterschiede zwischen den (-/-) und den (+/+) Mäusen.

Aufgrund der in dieser Arbeit gemessenen Werte scheinen Plasmareninaktivität und Plasma Aldosteronkonzentration bei jüngeren Mäusen unabhängig voneinander kontrolliert zu sein. Es waren weder bei den 3 noch bei den 11 Monate alten Tieren Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu beobachten. Bei beiden Altersgruppen waren die Plasma Aldosteronkonzentrationen so, wie man sie physiologischerweise bei den verabreichten NaCl-Diäten erwartet hätte. Auf Normal- und auf Hochsalzdiät waren die Werte bei den älteren Tieren höher als bei den 3 Monate alten Mäusen. Dies unterstützt die erwähnte Vermutung, dass Aldosteronsynthese und -freisetzung bei jungen Mäusen nicht unmittelbar an die Plasmareninaktivität gebunden sind (Cholewa & Mattson 2001). Des Weiteren scheint die Aldosteronregulation bei den älteren Mäusen nicht mehr so flexibel in ihrer Anpassung an die Natriumbeladung zu sein, wie die der jüngeren. Diese Hypothese muss durch weitere Experimente - mit kürzeren Altersabständen zwischen den Tieren - geprüft werden. Eine Beteiligung des D₃ Rezeptors an der Aldosteronsynthese und oder -ausschüttung ist aufgrund dieser Befunde sehr unwahrscheinlich.

8.2.1.7 Blutdruckveränderungen durch Angiotensin II

Die parakrine Regulation der Natriumresorption im proximalen Tubulus erfolgt über verschiedene Angiotensin Rezeptoren (Navar et al. 1994), (Handa et al. 1998), (Haithcock et al. 1999), (Navar et al. 2002). Die Aktivierung von AT₁ Rezeptoren steigert die tubuläre Natriumreabsorption, wohingegen die Stimulation von AT₂ und AT₄ Rezeptoren die Natriumresorption hemmt.

Unter physiologischen Bedingungen wird der Hauptanteil der Wirkung von AT II bzgl. des Natriumtransports über die AT₁ Rezeptoren vermittelt (Navar et al. 1994), (Handa et al. 1998), (Haithcock et al. 1999), (Navar et al. 2002). Eine Verbindung zwischen den AT₁ und den Dopamin Rezeptoren wurde bereits beschrieben. Die Hemmung des AT₁ Rezeptors soll den natriuretischen Effekt des selektiven Dopamin D₁ Agonisten Fenoldopam verstärken (Chen & Lokhandwala 1995). Dopaminerge Agonisten der D₁-und D₂-Unterfamilie wiederum sollen den stimulierenden Effekt von Angiotensin II auf die luminale Natriumreabsorption antagonisieren (Hussain et al. 1998), (Sheikh-Hamad et al. 1993). Außerdem können Dopamin D₁ Rezeptor Agonisten die renale Vasokonstriktion von AT II hemmen (Chatziantoniou et al. 1995). Des Weiteren wurde eine Kolokalisierung von AT₁- und Dopamin D₃ Rezeptoren in proximalen Tubuluszellen von WKY Ratten gezeigt und eine Down-Regulation der AT₁ Expression durch die Stimulation von Dopamin D₃ Rezeptoren vorgeschlagen (Zeng et al. 2001).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen führte Angiotensin II zu der erwarteten dosisabhängigen Steigerung des systolischen Blutdrucks. Dabei waren bis zu der Dosis von 5 ng AT II/ kg KG keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu beobachten. Die Blutdruckunterschiede nach 12,5 und 25 ng AT II/ kg KG war bei den (-/-) Mäusen tendenziell höher als bei den (+/+) Tieren. Dies stimmt mit den Befunden von (Zeng et al. 2001) überein, da aufgrund des fehlenden Dopamin D₃ Rezeptors mehr AT₁ Rezeptoren exprimiert sein können als bei den Wildtypen und damit kann bei den (-/-) Tieren die höhere Dosis auch eine stärkere Vasokonstriktion hervorrufen. In weiteren Experimenten sollte diese Hypothese durch die Quantifizierung der AT₁ Rezeptoren geprüft werden. Als weitere Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen

den AT₁ und Dopamin D₃ Rezeptoren zu prüfen, könnte nach Vorbehandlung mit einem selektiven D₃ Rezeptor Agonisten die Blutdruckregulation auf Angiotensin II beobachtet werden. Versuche in der Arbeitsgruppe mit Dauerinfusion von AT II bei (-/-) Mäusen verursachten allerdings keine Blutdruckunterschiede im Vergleich zu den (+/+) Tieren (unveröffentlichte Daten).

8.2.2 Superfusion der juxtaglomerulären Zellen

Mit Hilfe der aus dem Zellverband der Glomeruli isolierten juxtaglomerulären Zellen, wurden die regulatorischen Einflüsse des dopaminergen Systems auf die Reninsekretion untersucht. Mit Hilfe der Superfusionskammern konnten im Sinne von Durchflusszellen verschiedene Agonisten und Antagonisten in einem dynamischen Modell beobachtet werden. Die Juxtaglomerulären Zellen wurden mit Hilfe der von Della Bruna et al. (1991) beschriebenen Methode isoliert. Dabei konnten die Reninzellen zwar angereichert werden, allerdings waren immer noch Spuren von Zelldentritus und wenigen Verunreinigungen in Form von anderen Zellen in der Suspension vorhanden. Somit können Einflüsse von evtl. in der Suspension befindlichen Macula densa- oder Mesangiumzellen über parakrine Mechanismen, nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Ein kritischer Punkt ist sicher das enzymatische Aufschlussverfahren, welches die Rezeptoren während der Inkubationszeit schädigen könnte. Trotz der standardisierten Versuchsbedingungen sind daher interexperimentelle Schwankungen denkbar.

Während der Superfusionsexperimente fiel die Reninfreisetzung innerhalb der ersten Sammelperiode steil ab und sank dann langsamer im weiteren Verlauf des Versuches. Diese Beobachtung machten auch andere Autoren an isolierten Rattenglomeruli (Baumbach & Skott 1986), an superfundierten Nierenschnitten der Ratte (Skott & Baumbach 1985), am perfundierten juxtaglomerulären Apparat des Kaninchens (Lorenz et al. 1993) und bei den isolierten superfundierten juxtaglomerulären Zellen (Albinus et al. 1998). Der steile Abfall innerhalb der ersten 20 Minuten lässt sich durch die, während der Äquilibrationszeit spontan freigesetzte Menge an Renin erklären, welche dann mit der ersten Sammelperiode

aus den Kammern gespült wurde. Die Option, dass der kontinuierliche Abfall der Reninsekretion über den Verlauf des Experimentes durch Zelltod zustande kommt, kann aufgrund der Bestimmung der Viabilität über den gesamten Versuchszeitraum ausgeschlossen werden. Diese lag nach 120 Minuten immer noch bei ca. 75 %. Auch der Einfluss der Ascorbinsäure und von Dopamin auf die Viabilität wurde untersucht, um eine scheinbar erhöhte Reninfreisetzung aufgrund der Zerstörung der Zellmembran auszuschließen. Eine weitere Möglichkeit für den Abfall der Reninsekretion könnte eine vermehrte Bildung und Freisetzung von endogenem Adenosin sein (Albinus et al. 1998), (Finkbeiner 1997), (Sosath 1999), welches beim Stoffwechsel der basolateralen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ entsteht und nach der Präparation noch in der Suspension vorhanden war.

Die juxtaglomerulären Zellen unterliegen der Regulation durch verschiedene Rezeptoren und Kanäle, wie unter 1.3.2.2 ausgeführt. Bei den hier vorliegenden Experimenten wurden hauptsächlich die dopaminergen Effekte und deren Interaktionen mit dem β -adrenergen System untersucht. Die bereits erwähnte, Altersabhängigkeit schied als Einflussfaktor aus, da für die Experimente altersgleiche Ratten verwendet wurden.

8.2.2.1 Dopaminerge Stimulation der Reninsekretion

Eine dopaminerge Stimulation der Reninsekretion wurde vor über zwei Jahrzehnten vorgeschlagen: Ball et al. (1981) beobachteten unter Dopamininfusion bei Hunden eine konzentrationsabhängige Steigerung der Plasmareninaktivität. Kurtz et al. (1988) konnten den Dopamin D_1 Rezeptor auf den isolierten juxtaglomerulären Zellen auf funktioneller Ebene nachweisen. In der zitierten Arbeit wurde vorgeschlagen, dass über diesen Rezeptor die Reninsekretion stimuliert werden könnte. Bei diesen Experimenten wurden die Zellen in Kultur gehalten und die Sekretionsrate im Medium bestimmt. Bei einem solchen statischen Modell besteht die Möglichkeit von Rückkopplungsmechanismen, da Renin und die parallel freigesetzten Substanzen (u.a. Prorenin) im Medium akkumulieren und die Sekretion hemmen können. Yamaguchi et al. (1997) konnten schließlich auf mRNA-Ebene nachweisen, dass es

sich bei dem stimulierenden Dopamin Rezeptor auf den juxtaglomerulären Zellen um den D_{1A} Rezeptor handelt, was die funktionellen Daten von Hano et al. (1995) und Antonipillai et al. (1989) bestätigte.

Auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Superfusionsmodell konnte die Reninsekretion durch Dopamin als endogenem Liganden signifikant gesteigert werden. Dabei konnte die Freisetzung konzentrationsabhängig mit einer EC_{50} von $1,11 \times 10^{-6}$ M stimuliert werden. Ferner konnte, wie bei Kurtz et al. (1988) und Hackenthal et al. (1990) beschrieben, mit Isoprenalin die Reninsekretion mit einer EC_{50} von $5,97 \times 10^{-9}$ M gesteigert werden. Dabei war die maximale Stimulation der juxtaglomerulären Zellen mit dem unselektiven β -Agonisten in etwa vergleichbar mit der von Dopamin. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin war gegenüber Dopamin um drei Zehnerpotenzen nach links verschoben.

Um zu klären, inwieweit die beobachtete Stimulation der Reninsekretion durch Dopamin über die Dopamin D_1 Rezeptoren alleine, oder aber auch über β -adrenerge Rezeptoren vermittelt wird, wurde das Experiment in Anwesenheit des selektiven β -Rezeptorantagonisten Atenolol in einer Konzentration von 10^{-10} M wiederholt. In dieser Konzentration hatte Atenolol einen geringen Eigeneffekt, blockierte aber nahezu vollständig die dopaminergen Effekte. Erst bei Dopaminkonzentrationen von 10^{-5} M und 10^{-4} M war wieder eine Stimulation der Reninsekretion zu beobachten. Daraus lässt sich ableiten, dass ein wesentlicher Teil der Stimulation durch Dopamin nicht dopaminerg vermittelt wird, sondern über die Aktivierung von β_1 Rezeptoren verläuft. Dies ist leicht nachvollziehbar, da Dopamin in höheren Konzentrationen auch α und β Rezeptoren stimuliert (Antonipillai et al. 1989).

Die Befunde, dass die dopaminerge Stimulation der juxtaglomerulären Zellen zum Teil über β -adrenerge Rezeptoren vermittelt wird, stimmen mit einigen, nicht aber mit allen Ergebnissen anderer Autoren überein. Kurtz et al. (1988) konnten bei den isolierten Zellen zwar die durch Isoprenalin stimulierte Reninsekretion mit dem unselektiven β -Antagonisten Propranolol hemmen, dafür aber nicht die durch Dopamin hervorgerufene Sekretionssteigerung. Weiterhin konnte der selektive Dopamin D_1 Rezeptor Antagonist SCH 23390 die Stimulation der Reninsekretion durch Dopamin und Fenoldopam – ein selektiver D_1 Rezeptor Agonist – blockieren,

während S-Sulpirid – ein selektiver D₂ Rezeptor Antagonist – die Stimulation nicht hemmen konnte. Daraus war geschlossen worden, dass die dopaminergen Effekte ausschließlich über die Dopamin D₁ Rezeptoren vermittelt werden.

Die mit den vorliegenden Experimenten divergierenden Ergebnisse könnten auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. In einem statischen Modell besteht die Möglichkeit, dass sich kompetitive Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen besser darstellen als in einer Durchflusszelle. Zudem ist Propranolol im Gegensatz zu Atenolol ein relativ unselektiver β -Blocker. Antonipillai et al. (1989) konnten sowohl unter statischen Bedingungen als auch bei Superfusionsexperimenten zeigen, dass sowohl Dopamin als auch der selektive Dopamin D₁ Rezeptor Agonist Fenoldopam, die Reninsekretion bei Schnitten der Nierenrinde stimulierten, diese Effekte aber nicht durch Propranolol blockiert werden konnten. Dabei hatten die Autoren, wie auch schon andere vorher (Weinberger et al. 1975); (Capponi & Vallotton 1976) einen Eigeneffekt des β -Blockers Propranolol beschrieben, den sie entweder auf unspezifische Effekte oder auf membranstabilisierende Eigenschaften dieser Substanz zurückführten. Im Gegensatz dazu konnten Henry et al. (1977) in vitro ebenfalls, analog zu der vorliegenden Arbeit, eine Hemmung der dopamininduzierten Reninfreisetzung durch Propranolol beschreiben.

Eine wesentlicher Unterschied zwischen den genannten Arbeiten und der hier vorliegenden besteht im Untersuchungsmodell. Bei Schnitten aus Organen befinden sich die juxtaglomerulären Zellen im Verband innerhalb des Glomerulums. Dadurch sind Einflüsse durch andere Gewebeabschnitte und Zellen – z.B. Mesangiumzellen, Ateriolen, Glomerulusschlingen, usw. – und damit verbundene parakrine Effekte denkbar.

8.2.2.2 Stimulation der JGZ mit dem selektiven Dopamin D₁ Rezeptor Agonisten SKF 38393

Die Hypothese, dass die dopaminerge Stimulation nur zum Teil über β_1 Rezeptoren vermittelt wird, werden durch die mit dem selektiven Dopamin D₁ Rezeptor Agonisten SKF 38393 gemachten Beobachtungen unterstützt. Gegenüber der Kontrolle war die Reninfreisetzung bei den Konzentrationen von 10^{-5} M bis 10^{-9} M gleichmäßig erhöht, allerdings um ungefähr 150 % geringer als der maximale Effekt unter dem Einfluss von Dopamin in den Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-5} M. Bei SKF 38393, in den Konzentrationen von 10^{-11} M und 10^{-13} M, war die Reninaktivität auf Kontrollniveau gesunken. Daraus lässt sich schließen, dass der synthetische Agonist SKF 38393 der potentere Stimulus ist. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch die selektive Stimulation der Dopamin D₁ Rezeptoren die Reninsekretion nicht in vergleichbarem Ausmaß wie mit Dopamin oder Isoprenalin gesteigert werden kann. Auch in vivo konnte gezeigt werden, dass durch den selektiven Dopamin D₁ Rezeptor Agonisten Fenoldopam die Reninsekretion erhöht werden konnte, wobei zusätzlich der Blutdruck gesenkt wurde (Harvey et al. 1986). Bei Antonipillai et al. (1989) führte sowohl Fenoldopam als auch Dopamin, unter statischen Bedingungen in Zellkultur, zu einer vergleichbaren Steigerung der Reninsekretion von ungefähr 150 %. Die Abweichungen in der vorliegenden Arbeit, im Vergleich zu den Beobachtungen von Antonipillai et al. (1989) könnten wiederum durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zustande gekommen sein. Die hier beschriebenen Resultate sind, wie bereits eingangs erwähnt, ein weiterer Hinweis darauf, dass die dopaminerg stimulierte Reninsekretion, entgegen der Beobachtungen anderer Autoren, zum Teil auch über β_1 adrenerge Rezeptoren vermittelt wird.

8.2.2.3 Einfluss von Bromocriptin auf die Reninsekretion

Laut Sowers et al. (1981), Jeffrey et al. (1988) und Worth et al. (1986) könnte über Dopamin Rezeptoren der D₂ Unterfamilie die Reninsekretion sowohl direkt als auch indirekt über eine Verminderung der Noradrenalinfreisetzung gehemmt werden

(Kondo et al. 1981). Der Dopamin D₂ Rezeptor Agonist Bromocriptin hatte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Reninsekretion. Auch Hano et al. (1995) konnten an isolierten superfundierten Glomeruli die dopaminerge Stimulation der Reninsekretion durch den D₂ Rezeptor Antagonisten Spiperon nicht hemmen, wohingegen Haloperidol als unselektiver Antagonist und SCH-23390 als selektiver D₁ Rezeptor Antagonist die Stimulation durch Dopamin inhibieren konnten. Kurtz et al. (1988) berichteten über ähnliche Befunde: Der D₂ Rezeptor Antagonist Sulpirid veränderte die durch Dopamin stimulierte Reninsekretion nicht signifikant. Sanada et al. (1997) konnten keine mRNA von D₂ Rezeptoren in den juxtaglomerulären Zellen finden. Der relativ unselektive Dopamin D₂ Rezeptor Agonist Bromocriptin konnte in vivo die Plasmaninaktivität ebenfalls nicht beeinflussen (Whitfield et al. 1980). Wie bereits erwähnt sind die Rezeptoren der D₂ Unterfamilie hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert und vermitteln ihre Effekte über G_i Proteine, welche wiederum die Adenylatcyclase hemmen. Dadurch wird den D₂ Rezeptoren eine Rückkopplungsfunktion zugesprochen. Bei beidseitig renal denervierten Ratten konnte die Plasmaninaktivität gegenüber den scheinoperierten Tieren signifikant gesenkt werden (Luippold et al. 2003). Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die Denervierung, die über die sympathischen Neuronen vermittelte noradrenerge Stimulation der Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen wegfällt.

8.2.2.4 Stimulation des Dopamin D₃ Rezeptors auf den JGZ

Asico et al. (1998) fand bei den von ihm untersuchten Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mäusen eine erhöhte Plasmaninaktivität im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Tieren. Diese Befunde konnten allerdings bei dem in dieser Arbeit untersuchten Knockout-Modell, weder bei 3 noch bei 11 Monate alten Mäusen, bestätigt werden. Der Dopamin D₃ Rezeptor als Vertreter der D₂ Unterfamilie konnte von Sanada et al. (1997) in den juxtaglomerulären Zellen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Ferner wurde durch den selektiven D₃ Rezeptor Agonisten PD-128593 die Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion gehemmt. Wie bereits erwähnt, wurde eine direkte Hemmung der Reninsekretion über Dopamin

Rezeptoren der D₂ Unterfamilie berichtet (Sowers et al. 1981), (Jeffrey et al. 1988) und (Worth et al. 1986).

In den hier beschriebenen Experimenten konnte die Reninsekretion durch die D₃ Rezeptorstimulation gehemmt werden. Der selektive Dopamin D₃ Rezeptor Agonist 7-OH-DPAT senkte, in den Konzentrationen von 10⁻⁹ M bis 10⁻⁵ M, die Reninaktivität um ungefähr 20 % gegenüber den Kontrollen. Da die Innervierung der isolierten Zellen fehlt, kann ausgeschlossen werden, dass die Hemmung durch eine neuronale Rückkopplung über die D₃ Rezeptoren und damit infolge einer verminderten Noradrenalinausschüttung zustande kommt. Die geringe Steigerung der Reninaktivität bei einer Konzentration von 10⁻⁴ M ist vermutlich auf eine unspezifische Stimulation zurückzuführen.

8.2.2.5 Blockade des Dopamin D₃ Rezeptors auf den JGZ

Der selektive, periphere Dopamin D₃ Rezeptor Antagonist BSF 201640 stimulierte die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen in einem vergleichbaren Ausmaß wie Dopamin in der Konzentration von 10⁻⁶ M. Wurden die Zellen mit Dopamin in dieser Konzentration zusammen mit dem D₃ Rezeptor Antagonisten superfundiert, zeigte sich tendenziell eine weitere Sekretionssteigerung. Als Erklärung für dieses Phänomen kommen einerseits unspezifische Rezeptorinteraktionen in Frage. Andererseits könnte Dopamin über die dopaminerge Wirkung hinaus auch adrenerge, insbesondere β₁ Rezeptoren aktivieren und damit die Reninsekretion stimulieren. Sollten diese Rezeptoren, in vivo, unter einer hemmenden dopaminergen Autorezeptor-Kontrolle stehen, könnte eine Hemmung der Dopaminrezeptoren zu einer zusätzlichen Steigerung der Plasmareninaktivität führen. Diese Erklärung ist aber nur eingeschränkt akzeptabel, da es sich in dem verwendeten Modell um eine Zellsuspension handelt, von der man keine neuronale Kontrolle erwartet.

9. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung des Dopamin D₃ Rezeptors an der Blutdruckregulation über die Natriumurinausscheidung sowie über das RAAS geprüft. Die Untersuchungen wurden an entsprechenden Dopamin D₃ Rezeptor Knockout (-/-) und Wildtyp-Mäusen (+/+) durchgeführt. Zusätzlich wurde an diesen Tieren das dopaminerge System in der Niere weiter charakterisiert. Der systolische Blutdruck der Mäuse wurde mit Hilfe der Schwanzdruckplethysmographie, einem Cross-over Studienprotokoll folgend, unter dem Einfluss von 3 verschiedenen Kochsalzdiäten bestimmt. Natrium-, Dopamin- und Kreatininurinausscheidungen wurden in Stoffwechsellkäfigen untersucht. Zusätzlich zum Vergleich zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen und zwischen verschiedenen NaCl-Diäten, wurden Alterseffekte durch die Verwendung sowohl 3 als auch 11 Monate alter Mäuse beobachtet. Schließlich wurde der Einfluss dopaminerger Agonisten und Antagonisten auf die Reninfreisetzung aus juxtaglomerulären Zellen von Rattennieren geprüft.

Im Alter von 3 Monaten waren keine Blutdruckunterschiede zwischen den (-/-) und den (+/+) Mäusen zu erkennen. Auch die Kochsalzdiäten induzierten keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Im Alter von 11 Monaten waren, wenn auch geringfügige, Unterschiede zwischen (-/-) und (+/+) Tieren zu erkennen, was darauf hindeuten könnte, dass sich der funktionell relevante Phänotyp erst ab einem gewissen Alter ausbildet.

Sowohl die 3 als auch die 11 Monate alten (-/-) Mäuse hatten eine positive Natriumbilanz, verglichen mit den korrespondierenden (+/+) Tieren, deren Werte jeweils als Bezugsgröße auf Null gesetzt wurden, was auf eine Beteiligung des Rezeptors bei der Natriumurinausscheidung unter eingegrenzten Bedingungen hinweisen könnte.

Die Kreatininclearance zur Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate war bei den (-/-) Mäusen in beiden Altersstufen sowie auf allen Kochsalzdiäten tendenziell niedriger als bei den entsprechenden (+/+) Tieren.

Plasmakonzentration, Urinausscheidung und Nierengewebsgehalt von Dopamin waren bei den 11 Monate alten Mäusen, abgesehen von wenigen Ausnahmen, höher als bei den jüngeren Tieren. Außerdem war der Dopamin-Nierengewebsgehalt der 11 Monate alten (-/-) Mäuse tendenziell höher als bei den altersgleichen (+/+) Tieren. Dies könnte ein Hinweis auf eine Reduktion der Dopaminrezeptoren-Dichte im Alter sowie einen Kompensationsmechanismus bei Knockout-Tieren sein.

Plasmareninaktivität sowie Produktion und Ausschüttung von Aldosteron scheinen, zumindest in dem hier geprüften Mausmodell, weitgehend unabhängig voneinander zu sein, da die Reninaktivitäten auf den verschiedenen Diäten bei den jüngeren Tieren nicht und bei den älteren nur bedingt mit der Plasma Aldosteronkonzentration korrelierten.

Die Beobachtung eines im Vergleich zu (+/+) Mäusen tendenziell stärkeren Blutdruckanstieges bei (-/-) Tieren nach Angiotensin II-Applikation, zumindest in höheren Dosierungen, lässt einen funktionellen Zusammenhang zwischen AT₁- und Dopamin D₃ Rezeptoren vermuten. Zusammen mit Vorbefunden, dass Dopamin D₃ Rezeptoren die AT₁ Rezeptor Expression negativ beeinflussen, ist eine Hochregulation dieser Rezeptoren im Falle der Dopamin D₃ Rezeptor (-/-) Mäuse denkbar.

Die Reninsekretion aus juxtaglomerulären Zellen wurde von Dopamin konzentrationsabhängig bis zum 3,5-fachen der Kontrollwerte stimuliert. Allerdings war mit dem unselektiven β -adrenergen Agonisten Isoprenalin eine Stimulation der Reninfreisetzung mit einer nach links verschobenen Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu beobachten. Der selektive β_1 -adrenerge Rezeptorantagonist Atenolol dagegen hemmte die dopaminerge Stimulation der Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen. Zusammengefasst deuten die Befunde darauf hin, dass ein wesentlicher Anteil der durch Dopamin beobachteten Reninsekretionsteigerung auf adrenerger Aktivierung beruht. Der selektive Dopamin D₁ Rezeptor Agonist SKF 38393 stimulierte die Reninsekretion signifikant, allerdings mit geringerer quantitativer Ausprägung als der endogene Ligand Dopamin. Dies unterstützt die Befunde der Hemmung der dopaminergen Stimulation mit Hilfe von Atenolol.

Der Dopamin D₂ Rezeptor Agonist Bromocriptin hatte keinen Einfluss auf die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen. Allerdings hemmte der selektive Dopamin D₃ Rezeptor Agonist 7-OH-DPAT, in Konzentrationen zwischen 10⁻⁹ und 10⁻⁵ M, die Reninsekretion um ungefähr 20 %. Umgekehrt führte die Antagonisierung der Dopamin D₃ Rezeptoren durch den selektiven Antagonisten BSF 201640 zu einer ähnlichen Steigerung der Reninsekretion, wie sie durch Dopamin verursacht wurde. Die kombinierte Superfusion von Dopamin und BSF 201640 wirkte additiv.

Eine grundsätzliche Beteiligung des Dopamin D₃ Rezeptors an der Regulation der Hämodynamik ist damit sehr wahrscheinlich. Diese Effekte können bis zu einem gewissen Grad durch Rezeptorinteraktionen oder eine Mehrausschüttung des physiologischen Liganden kompensiert werden. Dabei scheint das Alter von Bedeutung zu sein, da die auf die Reduktion der Rezeptorenzahl zurückzuführenden Veränderungen erst bei älteren Mäusen sichtbar wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Befunde weisen auf eine Beteiligung des Dopamin D₃ Rezeptors an der Langzeitregulation des systemischen Blutdruckes hin. Dies könnte aufgrund der allgemein bestehenden Datenlage auf einer Beeinflussung der renalen Hämodynamik beruhen, während eine physiologisch relevante Modulation akuter Änderungen der Reninsekretion, zumindest in dem verwandten Modell, ausgeschlossen werden konnte. Zur weiteren Charakterisierung des Dopamin D₃ Rezeptors als potentiell „drug-target“ für blutdrucksenkende Wirkstoffe müssen zunächst dessen renale und systemische Effekte sowie deren mögliche Interaktionen weiter funktionell differenziert werden.

10. LITERATURVERZEICHNIS

Accili,D., Fishburn,C.S., Drago,J., Steiner,H., Lachowicz,J.E., Park,B.H., Gauda,E.B., Lee,E.J., Cool,M.H., Sibley,D.R., Gerfen,C.R., Westphal,H. & Fuchs,S. 1996. A targeted mutation of the D₃ dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1945-1949.

Akpaffiong,M.J., Redfern,P.H. & Woodward,B. 1980. Factors affecting the release and excretion of dopamine in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **32**, 839-843.

Aktories,K., Förstermann,U., Hofmann,F. & Starke,K. 2005. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9 Aufl. München, Urban & Fischer.

Albinus,M., Finkbeiner,E., Sosath,B. & Osswald,H. 1998. Isolated superfused juxtaglomerular cells from rat kidney: a model for study of renin secretion. *Am. J. Physiol.* **275**, F991-F997.

Alexander,R.W., Gill,J.-R.J., Yamabe,H., Lovenberg,W. & Keiser,H.R. 1974. Effects of dietary sodium and of acute saline infusion on the interrelationship between dopamine excretion and adrenergic activity in man. *J. Clin. Invest.* **54**, 194-200.

Amenta,F. 1997. Light microscope autoradiography of peripheral dopamine receptor subtypes. *Clin. Exp. Hypertens.* **19**, 27-41.

Anton,A.H. & Sayre,D.F. 1962. A study of the factors affecting the aluminium oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **138**, 360-375.

Antonipillai,I., Broers,M.I. & Lang,D. 1989. Evidence that specific dopamine-1 receptor activation is involved in dopamine-induced renin release. *Hypertension* **13**, 463-468.

Antonipillai,I., Wang,Y. & Horton,R. 1990. Tumor necrosis factor and interleukin-1 may regulate renin secretion. *Endocrinology* **126**, 273-278.

Armando,I., Nowicki,S., Aguirre,J. & Barontini,M. 1995. A decreased tubular uptake of dopa results in defective renal dopamine production in aged rats. *Am. J. Physiol.* **268**, F1087-F1092.

- Asico,L.D., Ladines,C., Fuchs,S., Accili,D., Carey,R.M., Semeraro,C., Pocchiari,F., Felder,R.A., Eisner,G.M. & Jose,P.A. 1998. Disruption of the dopamine D₃ receptor gene produces renin-dependent hypertension. *J. Clin. Invest.* **102**, 493-498.
- Baines,A.D. 1982. Effects of salt intake and renal denervation on catecholamine catabolism and excretion. *Kidney Int.* **21**, 316-322.
- Baines,A.D., Craan,A., Chan,W. & Morgunov,N. 1979. Tubular secretion and metabolism of dopamine, norepinephrine, methoxytyramine and normetanephrine by the rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**, 144-147.
- Ball,S.G. & Lee,M.R. 1977. The effect of carbidopa administration on urinary sodium excretion in man. Is dopamine an intrarenal natriuretic hormone? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **4**, 115-119.
- Ball,S.G., Oats,N.S. & Lee,M.R. 1978. Urinary dopamine in man and rat: effects of inorganic salts on dopamine excretion. *Clin. Sci. Mol. Med.* **55**, 167-173.
- Ball,S.G., Tree,M., Morton,J.J., Inglis,G.C. & Fraser,R. 1981. Circulating dopamine: its effect on the plasma concentrations of catecholamines, renin, angiotensin, aldosterone and vasopressin in the conscious dog. *Clin. Sci. (Lond)* **61**, 417-422.
- Bass,A.S. & Murphy,M.B. 1990. Role of endogenous dopamine in the natriuresis accompanying various sodium challenges. *Am. J. Hypertens.* **3**, 90S-92S.
- Bauersfeld,W., Ratge,D., Knoll,E. & Wisser,H. 1984. Determination of catecholamines in plasma by HPLC and amperometric detection. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* **317**, 679.
- Baumbach,L. & Skott,O. 1986. Renin release from different parts of rat afferent arterioles in vitro. *Am. J. Physiol.* **251**, F12-F16.
- Beierwaltes,W.H., Schryver,S., Sanders,E., Strand,J. & Romero,J.C. 1982. Renin release selectively stimulated by prostaglandin I₂ in isolated rat glomeruli. *Am. J. Physiol.* **243**, F276-F283.
- Bertorello,A. & Aperia,A. 1990. Inhibition of proximal tubule Na⁺-K⁺-ATPase activity requires simultaneous activation of DA₁ and DA₂ receptors. *Am. J. Physiol.* **259**, F924-F928.

- Blaine,E.H., Schorn,T.W. & Boger,J. 1984. Statine-containing renin inhibitor. Dissociation of blood pressure lowering and renin inhibition in sodium-deficient dogs. *Hypertension* **6**, 1111-1118.
- Boulay,D., Depoortere,R., Rostene,W., Perrault,G. & Sanger,D.J. 1999. Dopamine D₃ receptor agonists produce similar decreases in body temperature and locomotor activity in D₃ knock-out and wild-type mice. *Neuropharmacology* **38**, 555-565.
- Brand,E., Chatelain,N., Keavney,B., Caulfield,M., Citterio,L., Connell,J., Grobbee,D., Schmidt,S., Schunkert,H., Schuster,H., Sharma,A.M. & Soubrier,F. 1998. Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. *Hypertension* **31**, 725-729.
- Capponi,A.M. & Vallotton,M.B. 1976. Renin release by rat kidney slices incubated in vitro. Role of sodium and of alpha- and beta-adrenergic receptors, and effect of vincristine. *Circ. Res.* **39**, 200-203.
- Carey,R.M., Van Loon,G.R., Baines,A.D. & Ortt,E.M. 1981. Decreased plasma and urinary dopamine during dietary sodium depletion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **52**, 903-909.
- Casson,I.F., Lee,M.R., Brownjohn,A.M., Parsons,F.M., Davison,A.M., Will,E.J. & Clayden,A.D. 1983. Failure of renal dopamine response to salt loading in chronic renal disease. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **286**, 503-506.
- Castro,S.W. & Strange,P.G. 1993. Differences in the ligand binding properties of the short and long versions of the D₂ dopamine receptor. *J. Neurochem.* **60**, 372-375.
- Chatziantoniou,C., Ruan,X. & Arendshorst,W.J. 1995. Defective G protein activation of the cAMP pathway in rat kidney during genetic hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 2924-2928.
- Chen,C. & Lokhandwala,M.F. 1995. Potentiation by enalaprilat of fenoldopam-evoked natriuresis is due to blockade of intrarenal production of angiotensin-II in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **352**, 194-200.
- Chen,C. & Lokhandwala,M.F. 1992. Dopamine receptor agonists in cardiovascular pharmacotherapy. *Indian Journal of Pharmacology* **24**, 72-81.

- Cholewa,B.C. & Mattson,D.L. 2001. Role of the renin-angiotensin system during alterations of sodium intake in conscious mice. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.* **281**, R987-R993.
- Churchill,P.C. 1987. Calcium channel antagonists and renin release. *Am. J. Nephrol.* **7 Suppl 1**, 32-38.
- Churchill,P.C. & Churchill,M.C. 1985. A₁ and A₂ adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**, 589-594.
- Della Bruna,R., Pinet,F., Corvol,P. & Kurtz,A. 1991. Regulation of renin secretion and renin synthesis by second messengers in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 98-110.
- Dimitrov,T.G., Kiprova,D.I., Maleeva,A.I. & Terziyska,S.A. 1977. Influence of pentobarbital-natrium (Nembutal) narcosis on blood pressure, plasma renin activity, aldosterone, sodium and potassium in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Dokl. Bulg. Acad. Nauk.* **30**, 1653-1656.
- Doggrell,S.A. 2002. The therapeutic potential of dopamine modulators on the cardiovascular and renal systems. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **11**, 631-644.
- Eklof,A.C. 1997. The natriuretic response to a dopamine DA₁ agonist requires endogenous activation of dopamine DA₂ receptors. *Acta Physiol. Scand.* **160**, 311-314.
- Epstein,M. 1985. Aging and the kidney: clinical implications. *Am. Fam. Physician* **31**, 123-137.
- Felder,C.C., Campbell,T., Albrecht,F. & Jose,P.A. 1990. Dopamine inhibits Na⁺-H⁺-exchanger activity in renal BBMV by stimulation of adenylate cyclase. *Am. J. Physiol.* **259**, F297-F303.
- Felder,R.A., Eisner,G.M. & Jose,P.A. 2000. D₁ dopamine receptor signalling defect in spontaneous hypertension. *Acta Physiol. Scand.* **168**, 245-250.

Ferreira,A., Bettencourt,P., Pestana,M., Correia,F., Serrao,P., Martins,L., Cerqueira-Gomes,M. & Soares-da-Silva,P. 2001. Heart failure, aging, and renal synthesis of dopamine. *Am. J. Kidney Dis.* **38**, 502-509.

Finkbeiner,E.W. 1997. Untersuchungen zur Reninsekretion am Modell isolierter superfundierter juxtaglomerulärer Zellen der Rattenniere und die über A₁ Rezeptoren vermittelte Beeinflussbarkeit durch Adenosin. Dissertation Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Fishburn,C.S., Belleli,D., David,C., Carmon,S. & Fuchs,S. 1993. A novel short isoform of the D₃ dopamine receptor generated by alternative splicing in the third cytoplasmic loop. *J. Biol. Chem.* **268**, 5872-5878.

Fliser,D., Zeier,M., Nowack,R. & Ritz,E. 1993. Renal functional reserve in healthy elderly subjects. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 1371-1377.

Fliser,D., Bischoff,I., Hanses,A., Block,S., Joest,M., Ritz,E. & Mutschler,E. 1999. Renal handling of drugs in the healthy elderly. Creatinine clearance underestimates renal function and pharmacokinetics remain virtually unchanged. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **55**, 205-211.

Fliser,D., Franek,E., Joest,M., Block,S., Mutschler,E. & Ritz,E. 1997. Renal function in the elderly: impact of hypertension and cardiac function. *Kidney Int.* **51**, 1196-1204.

Fliser,D. & Ritz,E. 1998. Relationship between hypertension and renal function and its therapeutic implications in the elderly. *Gerontology* **44**, 123-131.

Fray,J.C., Lush,D.J. & Park,C.S. 1986. Interrelationship of blood flow, juxtaglomerular cells, and hypertension: role of physical equilibrium and Ca²⁺. *Am. J. Physiol.* **251**, R643-R662.

Freeman,R.H., Davis,J.O., Dietz,J.R., Villarreal,D., Seymour,A.A. & Echtenkamp,S.F. 1982. Renal prostaglandins and the control of renin release. *Hypertension* **4**, 106-112.

- Friedrich, J.O., Adhikari, N., Herridge, M.S. & Beyene, J. 2005. Meta-analysis: low-dose dopamine increases urine output but does not prevent renal dysfunction or death. *Ann. Intern. Med.* **142**, 510-524.
- Galbusera, M., Garattini, S., Remuzzi, G. & Mennini, T. 1988. Catecholamine receptor binding in rat kidney: effect of aging. *Kidney Int.* **33**, 1073-1077.
- Giros, B., Martres, M.P., Pilon, C., Sokoloff, P. & Schwartz, J.C. 1991. Shorter variants of the D₃ dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 1584-1592.
- Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J. & Schwartz, J.C. 1989. Alternative splicing directs the expression of two D₂ dopamine receptor isoforms. *Nature* **342**, 923-926.
- Goldberg, L. 1972. Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications. *Pharmacological reviews* **1**, 1-29.
- Goormaghtigh, N. 1945. Facts in favour of an endocrine function of the renal arterioles. *J. Pathol. Bacteriol.* **57**, 392-404.
- Goyal, V.K. 1982. Changes with age in the human kidney. *Exp. Gerontol.* **17**, 321-331.
- Greven, J. & Klein, H. 1977. Effects of dopamine on whole kidney function and proximal transtubular volume fluxes in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **296**, 289-292.
- Hackbarth, H. & Harrison, D.E. 1982. Changes with age in renal function and morphology in C57BL/6, CBA/HT6, and B6CBAF1 mice. *J. Gerontol.* **37**, 540-547.
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D. & Taugner, R. 1990. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* **70**, 1067-1116.
- Hackenthal, E. & Taugner, R. 1986. Hormonal signals and intracellular messengers for renin secretion. *Mol. Cell Endocrinol.* **47**, 1-12.

- Haithcock,D., Jiao,H., Cui,X.L., Hopfer,U. & Douglas,J.G. 1999. Renal proximal tubular AT₂ receptor: signaling and transport. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10 Suppl 11**, S69-S74.
- Handa,R.K., Krebs,L.T., Harding,J.W. & Handa,S.E. 1998. Angiotensin IV AT₄-receptor system in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* **274**, F290-F299.
- Hano,T., Shiotani,M., Baba,A., Nishio,I. & Masuyama,Y. 1995. DA₁ receptor-mediated renin release from isolated rat glomeruli. *Hypertens. Res.* **18 Suppl 1**, S141-S143.
- Hansell,P., Fasching,A., Sjoquist,M., Anden,N.E. & Ulfendahl,H.R. 1987. The dopamine receptor antagonist haloperidol blocks natriuretic but not hypotensive effects of the atrial natriuretic factor. *Acta Physiol. Scand.* **130**, 401-407.
- Harvey,J.N., Worth,D.P., Brown,J. & Lee,M.R. 1986. Studies with fenoldopam, a dopamine receptor DA₁ agonist, in essential hypertension. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **21**, 53-61.
- Hayashi,M., Yamaji,Y., Kitajima,W. & Saruta,T. 1990. Aromatic L-amino acid decarboxylase activity along the rat nephron. *Am. J. Physiol.* **258**, F28-F33.
- Henry,D.P., Aoi,W. & Weinberger,M.H. 1977. The effects of dopamine on renin release in vitro. *Endocrinology* **101**, 279-283.
- Hirota,K., Kudo,M., Kudo,T., Kitayama,M., Kushikata,T., Lambert,D.G. & Matsuki,A. 2000. Barbiturates inhibit K⁺-evoked noradrenaline and dopamine release from rat striatal slices - involvement of voltage sensitive Ca²⁺ channels. *Neurosci. Lett.* **291**, 175-178.
- Hollon,T.R., Bek,M.J., Lachowicz,J.E., Ariano,M.A., Mezey,E., Ramachandran,R., Wersinger,S.R., Soares-da-Silva,P., Liu,Z.F., Grinberg,A., Drago,J., Young,W.S., Westphal,H., Jose,P.A. & Sibley,D.R. 2002. Mice lacking D₅ dopamine receptors have increased sympathetic tone and are hypertensive. *J. Neurosci.* **22**, 10801-10810.

- Hussain,T., Abdul-Wahab,R. & Lokhandwala,M.F. 1997. Bromocriptine stimulates Na⁺-K⁺-ATPase in renal proximal tubules via the cAMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **321**, 259-263.
- Hussain,T., Abdul-Wahab,R., Kotak,D.K. & Lokhandwala,M.F. 1998. Bromocriptine regulates angiotensin II response on sodium pump in proximal tubules. *Hypertension* **32**, 1054-1059.
- Hussain,T. & Lokhandwala,M.F. 1998. Renal dopamine receptor function in hypertension. *Hypertension* **32**, 187-197.
- Janssen,B.J., De Celle,T., Debets,J.J., Brouns,A.E., Callahan,M.F. & Smith,T.L. 2004. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H1618-H1624.
- Jeffrey,R.F., MacDonald,T.M., Marwick,L. & Lee,M.R. 1988. The effect of carbidopa and indomethacin on the renal response to gamma-L-glutamyl-L-dopa in normal man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **25**, 195-201.
- Johnson,R.J. & Schreiner,G.F. 1997. Hypothesis: the role of acquired tubulointerstitial disease in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Kidney Int.* **52**, 1169-1179.
- Jose,P.A., Asico,L.D., Eisner,G.M., Pocchiari,F., Semeraro,C. & Felder,R.A. 1998. Effects of costimulation of dopamine D₁- and D₂-like receptors on renal function. *Am. J. Physiol.* **275**, R986-R994.
- Jose,P.A., Eisner,G.M. & Felder,R.A. 1993. Dopaminergic defect in hypertension. *Pediatr. Nephrol.* **7**, 859-864.
- Jose,P.A., Eisner,G.M. & Felder,R.A. 2002. Role of dopamine receptors in the kidney in the regulation of blood pressure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **11**, 87-92.
- Jose,P.A., Eisner,G.M. & Felder,R.A. 2003. Regulation of blood pressure by dopamine receptors. *Nephron Physiol* **95**, 19-27.
- Jose,P.A., Raymond,J.R., Bates,M.D., Aperia,A., Felder,R.A. & Carey,R.M. 1992. The renal dopamine receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 1265-1278.

- Kansra,V., Hussain,T. & Lokhandwala,M.F. 1997. Alterations in dopamine DA₁ receptor and G proteins in renal proximal tubules of old rats. *Am. J. Physiol.* **273**, F53-F59.
- Kim,K.M., Gainetdinov,R.R., Laporte,S.A., Caron,M.G. & Barak,L.S. 2005. G Protein-coupled receptor kinase regulates Dopamine D₃ receptor signaling by modulating the stability of a receptor-filamin- β -arrestin complex: a case of autoreceptor regulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 12774-12780.
- Kinoshita,S., Sidhu,A. & Felder,R.A. 1989. Defective dopamine-1 receptor adenylate cyclase coupling in the proximal convoluted tubule from the spontaneously hypertensive rat. *J. Clin. Invest.* **84**, 1849-1856.
- Kondo,K., Suzuki,H., Handa,M., Nagahama,S., Yasui,T., Fujimaki,M., Ogihara,T. & Saruta,T. 1981. Central and peripheral effects of dopamine on the renin-angiotensin-aldosterone system in conscious rats. *Jpn. Cic. J.* **45**, 1121-1125.
- Kopp,U.C. & DiBona,G.F. 1984. Interaction between neural and nonneural mechanisms controlling renin secretion rate. *Am. J. Physiol.* **246**, F620-F626.
- Kritz,W. & Kaissling,B. 2000. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kurtz,A., Della-Bruna,R., Pfeilschifter,J. & Bauer,C. 1988a. Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int.* **33**, 798-803.
- Kurtz,A., Della-Bruna,R., Pratz,J. & Caverio,I. 1988b. Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamine receptors mediating renin release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12**, 658-663.
- Küster,E.K. 2000. Die Rolle des intrarenalen Dopamins und seiner Rezeptoren bei der Regulation der Nierenfunktion. Dissertation Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Lapointe,J.Y., Bell,P.D. & Cardinal,J. 1990. Direct evidence for apical Na⁺-2Cl⁻-K⁺ cotransport in macula densa cells. *Am. J. Physiol* **258**, F1466-F1469.
- Lee,M.R. 1982. Dopamine and the kidney. *Clin. Sci. (Lond)* **62**, 439-448.

- Lee,M.R., Critchley,J.A., Gordon,C.J., Makarananda,K., Sriwatanakul,K., Balali-Mood,M. & Boye,G.L. 1990. Ethnic differences in the renal sodium dopamine relationship. A possible explanation for regional variations in the prevalence of hypertension? *Am. J. Hypertens.* **3**, 100S-103S.
- Li,L. & Schafer,J.A. 1998. Dopamine inhibits vasopressin-dependent cAMP production in the rat cortical collecting duct. *Am. J. Physiol.* **275**, F62-F67.
- Lim,D.Y., Kang,T.J., Hong,S.P., Chung,C.H., Choi,C.H., Lee,S.I., Park,Y.W., Kwack,J.J., Ki,J.D., Kim,C.W. & Park,C.Y. 1997. Influence of pentobarbital-Na on stimulation-evoked catecholamine secretion in the perfused rat adrenal gland. *Korean J. Intern. Med.* **12**, 163-175.
- Lorenz,J.N., Greenberg,S.G. & Briggs,J.P. 1993a. The macula densa mechanism for control of renin secretion. *Semin. Nephrol.* **13**, 531-542.
- Lorenz,J.N., Weihprecht,H., He,X.R., Skott,O., Briggs,J.P. & Schnermann,J. 1993b. Effects of adenosine and angiotensin on macula densa-stimulated renin secretion. *Am. J. Physiol.* **265**, F187-F194.
- Luippold,G., Beilharz,M. & Mühlbauer,B. 2001a. Reduction of glomerular hyperfiltration by dopamine D₂-like receptor blockade in experimental diabetes mellitus. *Nephrol. Dial. Transplant.* **16**, 1350-1356.
- Luippold,G., Küster,E., Joos,T.O. & Mühlbauer,B. 1998. Dopamine D₃ receptor activation modulates renal function in anesthetized rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **358**, 690-693.
- Luippold,G., Zimmermann,C., Mai,M., Kloor,D., Starck,D., Gross,G. & Mühlbauer,B. 2001b. Dopamine D₃ receptors and salt-dependent hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2272-2279.
- Luippold,G., Max,A., Albinus,M., Osswald,H. & Mühlbauer,B. 2003. Role of the renin-angiotensin system in the compensation of quinpirole-induced blood pressure decrease. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **367**, 427-433.

- Maignan,E., Dong,W.X., Legrand,M., Safar,M. & Cuche,J.L. 2000. Sympathetic activity in the rat: effects of anaesthesia on noradrenaline kinetics. *J. Auton. Nerv. Syst.* **80**, 46-51.
- Malmberg,A., Jackson,D.M., Eriksson,A. & Mohell,N. 1993. Unique binding characteristics of antipsychotic agents interacting with human dopamine D_{2A}, D_{2B}, and D₃ receptors. *Mol. Pharmacol.* **43**, 749-754.
- Masuzawa,M., Nakao,S., Miyamoto,E., Yamada,M., Murao,K., Nishi,K. & Shingu,K. 2003. Pentobarbital inhibits ketamine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens: a microdialysis study. *Anesth. Analg.* **96**, 148-52.
- Matsumoto,M., Hidaka,K., Tada,S., Tasaki,Y. & Yamaguchi,T. 1995. Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D₄ receptor. *Molecular Brain Research J.* **29**, 157-162.
- Meneton,P., Ichikawa,I., Inagami,T. & Schnermann,J. 2000. Renal physiology of the mouse. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278**, F339-F351.
- Missale,C., Lombardi,C., De Cotiis,R., Memo,M., Carruba,M.O. & Spano,P.F. 1989. Dopaminergic receptor mechanisms modulating the renin-angiotensin system and aldosterone secretion: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **14 Suppl 8**, S29-S39.
- Missale,C., Nash,S.R., Robinson,S.W., Jaber,M. & Caron,M.G. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* **78**, 189-225.
- Mühlbauer,B. & Osswald,H. 1993. Urinary dopamine excretion in conscious rats: effect of carbidopa in different states of sodium balance. *Ren. Physiol. Biochem.* **16**, 117-124.
- Mühlbauer,B. 1996. Die therapeutische Wirksamkeit von Dopamin beim akuten Nierenversagen. [The therapeutic effect of dopamine in acute kidney failure]. *Anaesthetist* **45**, 657-669.
- Mühlbauer,B., Gleiter,C.H., Gies,C., Luippold,G. & Löschmann,P.A. 1997. Renal response to infusion of dopamine precursors in anaesthetized rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **356**, 838-845.

- Nakano,M., Ito,Y., Kohtani,K., Mizuno,T. & Tauchi,H. 1985. Age-related change in brush borders of rat kidney cortex. *Mech. Ageing Dev.* **33**, 95-102.
- Nishi,A., Eklof,A.C., Bertorello,A.M. & Aperia,A. 1993. Dopamine regulation of renal Na⁺K⁺-ATPase activity is lacking in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* **21**, 767-771.
- Navar,L.G., Lewis,L., Hymel,A., Braam,B. & Mitchell,K.D. 1994. Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensins I and II in anesthetized rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 1153-1158.
- Navar,L.G., Harrison-Bernard,L.M., Nishiyama,A. & Kobori,H. 2002. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* **39**, 316-322.
- Nürnbergger,A., Rübiger,M., Mack,A., Diaz,J., Sokoloff,P., Mühlbauer,B. & Luippold,G. 2004. Subapical localization of the dopamine D₃ receptor in proximal tubules of the rat kidney. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 1647-1655.
- Oates,N.S., Ball,S.G., Perkins,C.M. & Lee,M.R. 1979. Plasma and urine dopamine in man given sodium chloride in the diet. *Clin. Sci. (Lond)* **56**, 261-264.
- O'Connell,D.P., Vaughan,C.J., Aherne,A.M., Botkin,S.J., Wang,Z.Q., Felder,R.A. & Carey,R.M. 1998. Expression of the dopamine D₃ receptor protein in the rat kidney. *Hypertension* **32**, 886-895.
- Olsen,N.V., Hansen,J.M., Ladefoged,S.D., Fogh-Andersen,N. & Leyssac,P.P. 1990. Renal tubular reabsorption of sodium and water during infusion of low-dose dopamine in normal man. *Clin. Sci. (Lond)* **78**, 503-507.
- Pech,B.S. 2003. Untersuchung der Nierenfunktion von Mäusen im Hinblick auf Altersabhängigkeit und Dopamin D₃-Rezeptorfunktion.
- Pereira,C.N., Machado,F.R., Guimaraes,H.P., Senna,A.P. & do-Amaral,J.L. 2004. Hemodynamics and renal function during administration of low-dose dopamine in severely ill patients. *Sao Paulo Med. J.* **122**, 141-146.

- Rahman,M.K., Nagatsu,T. & Kato,T. 1981. Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates. *Biochemical Pharmacology* **30**, 645-649.
- Reid,I.A., Chou,L., Chang,D. & Keil,L.C. 1986. Role of dopamine in the inhibition of vasopressin secretion by L-dopa in carbidopa-treated dogs. *Hypertension* **8**, 890-896.
- Ricci,A. 1990. The renal dopaminergic system in ageing. *J. Auton. Pharmacol.* **10 Suppl 1**, s19-s24.
- Ricci,A., Mammola,C.L., Vega,J.A., Zaccheo,D. & Amenta,F. 1996. Density and pattern of dopamine D₂-like receptors in the cerebellar cortex of aged rats. *Neurobiol. Aging* **17**, 45-52.
- Ricci,A., Marchal-Victorion,S., Bronzetti,E., Parini,A., Amenta,F. & Tayebati,S.K. 2002. Dopamine D₄ receptor expression in rat kidney: evidence for pre- and postjunctional localization. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 1091-1096.
- Sanada,H., Yao,L., Jose,P.A., Carey,R.M. & Felder,R.A. 1997. Dopamine D₃ receptors in rat juxtaglomerular cells. *Clin. Exp. Hypertens.* **19**, 93-105.
- Schnermann,J. & Briggs,J. 1982. Concentration-dependent sodium chloride transport as the signal in feedback control of glomerular filtration rate. *Kidney Int. Suppl.* **12**, S82-S89.
- Schricker,K. & Kurtz,A. 1993. Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* **265**, F180-F186.
- Seri,I. & Aperia,A. 1988. Contribution of dopamine 2 receptors to dopamine-induced increase in glomerular filtration rate. *Am. J. Physiol.* **254**, F196-F201.
- Sheikh-Hamad,D., Wang,Y.P., Jo,O.D. & Yanagawa,N. 1993. Dopamine antagonizes the actions of angiotensin II in renal brush-border membrane. *Am. J. Physiol.* **264**, F737-F743.
- Shigetomi,S., Ueno,S., Kohno,H., Tosaki,H., Suenaga,K., Hashimoto,S. & Fukuchi,S. 1986. [Role of renal dopamine receptor in the pathogenesis of hypertension after sodium loading]. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* **62**, 26-33.

- Sigetomi,S. & Fukuchi,S. 1993. [Dopamine and hypertension]. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* **69**, 953-962.
- Skott,O. 2002. Renin. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.* **282**, R937-R939.
- Skott,O. & Baumbach,L. 1985. Effects of adenosine on renin release from isolated rat glomeruli and kidney slices. *Pflügers Arch.* **404**, 232-237.
- Soares-da-Silva,P. & Fernandes,M.H. 1991. A study on the renal synthesis of dopamine in aged rats. *Acta Physiol. Scand.* **143**, 287-293.
- Sokoloff,P., Giros,B., Martres,M.P., Bouthenet,M.L. & Schwartz,J.C. 1990. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* **347**, 146-151.
- Sosath,B.A. 1999. Untersuchungen zur Regulation der Reninsekretion an isolierten superfundierten juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere. Dissertation Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Sowers,J.R., Barrett,J.D. & Sambhi,M.P. 1981. Dopaminergic modulation of renin release. *Clin. Exp. Hypertens.* **3**, 15-25.
- Spornitz,U.M. 1996. *Anatomie und Physiologie - Lehrbuch und Atlas.* 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin.
- Stephenson,R.K., Sole,M.J. & Baines,A.D. 1982. Neural and extraneural catecholamine production by rat kidneys. *Am. J. Physiol.* **242**, F261-F266.
- Sun,D. & Schafer,J.A. 1996. Dopamine inhibits AVP-dependent Na⁺ transport and water permeability in rat CCD via a D₄-like receptor. *Am. J. Physiol.* **271**, F391-F400.
- Sun,D., Wilborn,T.W. & Schafer,J.A. 1998. Dopamine D₄ receptor isoform mRNA and protein are expressed in the rat cortical collecting duct. *Am. J. Physiol.* **275**, F742-F751.
- Tappe,M. 2003. Die Bedeutung des renalen D₃-Rezeptors für die Vermittlung der pathologischen diabetischen Hyperfiltration. Dissertation Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Taugner,C., Poulsen,K., Hackenthal,E. & Taugner,R. 1979. Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney. *Histochemistry* **62**, 19-27.

Taugner,R. & Ganten,D. 1982. The localization of converting enzyme in kidney vessels of the rat. *Histochemistry* **75**, 191-201.

Thews, Mutschler & Vaupel 1999. *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*. 9 Aufl. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Thienpont,L.M., Van Landuyt,K.G., Stoeckl,D., Saeyens,W., De Keukeleire,D. & De Leenheer,A.P. 1995. Evaluation of 2-iminoimidazolidin-4-one and thymine as respective internal standards for normal-phase and reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of creatinine in human serum. *J. Chromatography B* **665**, 63-69.

Todd,R.D., Mack,K.J., Gandelman,K.Y., Hickok,J.M. & O'Malley,K.L. 1992. Dopamine D₂ receptor subtypes couple to different second messenger systems. *Neurochem. Int.* **20 Suppl**, 23S-26S.

Ueda,A., Ozono,R., Oshima,T., Yano,A., Kambe,M., Teranishi,Y., Katsuki,M. & Chayama,K. 2003. Disruption of the type 2 dopamine receptor gene causes a sodium-dependent increase in blood pressure in mice. *Am. J. Hypertens.* **16**, 853-858.

Vallon,V., Osswald,H., Blantz,R.C. & Thomson,S. 1997. Potential role of luminal potassium in tubuloglomerular feedback. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 1831-1837.

Vieira-Coelho,M.A., Hussain,T., Kansra,V., Serrao,M.P., Guimaraes,J.T., Pestana,M., Soares-da-Silva,P. & Lokhandwala,M.F. 1999. Ageing, high salt intake, and renal dopaminergic activity in Fischer 344 rats. *Hypertension* **34**, 666-672.

Wang,Q., Hummler,E., Maillard,M., Nussberger,J., Rossier,B.C., Brunner,H.R. & Burnier,M. 2001. Compensatory up-regulation of angiotensin II subtype 1 receptors in alpha ENaC knockout heterozygous mice. *Kidney Int.* **59**, 2216-2221.

Weber,R. 2004. Untersuchungen der Nierenfunktion von diabetischen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout Mäusen. Dissertation Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

- Weinberger, M.H., Aoi, W. & Henry, D.P. 1975. Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro. *Circ. Res.* **37**, 318-324.
- Weisinger, R.S., Blair-West, J.R., Denton, D.A., McBurnie, M., Ong, F., Tarjan, E. & Williams, R.M. 1990. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on salt appetite and thirst of BALB/c mice. *Am. J. Physiol.* **259**, R736-R740.
- Whitfield, L., Sowers, J.R., Tuck, M.L. & Golub, M.S. 1980. Dopaminergic control of plasma catecholamine and aldosterone responses to acute stimuli in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**, 724-729.
- Wiederkehr, M.R., Di Sole, F., Collazo, R., Quinones, H., Fan, L., Murer, H., Helmle-Kolb, C. & Moe, O.W. 2001. Characterization of acute inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger NHE-3 by dopamine in opossum kidney cells. *Kidney Int.* **59**, 197-209.
- Wurfer, K., Hackenthal, E., Metz, R., Nobiling, R., Simon, T. & Taugner, R. 1988. Interzonal and intrazonal heterogeneities in the renin status of the preglomerular arterioles in five species. *Histochemistry* **89**, 283-287.
- Williams, G.H. & Fisher, N.D. 1997. Genetic approach to diagnostic and therapeutic decisions in human hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **6**, 199-204.
- Worth, D.P., Harvey, J.N., Brown, J., Worrall, A. & Lee, M.R. 1986. Domperidone treatment in man inhibits the fall in plasma renin activity induced by intravenous γ -L-glutamyl-L-dopa. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **21**, 497-502.
- Yamaguchi, I., Yao, L., Sanada, H., Ozono, R., Mouradian, M.M., Jose, P.A., Carey, R.M. & Felder, R.A. 1997. Dopamine D_{1A} receptors and renin release in rat juxtaglomerular cells. *Hypertension* **29**, 962-968.
- Zeng, C., Yu, P., Zheng, S., Eisner, G.M. & Jose, P.A. 2001. D₃ dopamine receptors positively regulate D₁ dopamine receptors and negatively regulate AT₁ angiotensin receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, Abstract

LISTE DER PUBLIKATIONEN

Staudacher, T.; Bagdi, S.A. Inkompatibilitäten in erythromycinhaltigen Zubereitungen. *PZ-Prisma* 2000, **4**: 213-222.

Staudacher, T.; Schneider, S.; Gross, G.; Mühlbauer, B.; Luippold, G. Blood pressure regulation in conscious dopamine D₃ receptor knockout mice. *Naunyn-Schmiedeberger's Arch. Pharmacol.* 2003, **367**, **Suppl. 1**: 415

Freier Vortrag zur 44. Frühjahrstagung der DGPT – Mainz 2003

Staudacher, T.; Piesch, C.; Gross, G.; Mühlbauer, B.; Luippold, G. Age-dependent changes in arterial blood pressure in dopamine D₃ receptor knockout mice. *Naunyn-Schmiedeberger's Arch. Pharmacol.* 2004, **369**, **Suppl. 1**: 401

Freier Vortrag zur 45. Frühjahrstagung der DGPT – Mainz 2004

Staudacher, T. und Luippold, G. Pilze und ihre Inhaltstoffe. *Deutsche Apothekerzeitung* 2004, **36**: 40-46

Staudacher, T.; Piesch, C.; Gross, G.; Mühlbauer, B.; Luippold, G. Age-dependent increase in blood pressure of dopamine D₃ receptor knockout mice.

Kidney & Blood Pressure Research 2004, **27**: P06.06, 345

Nieren- und Hochdruckkrankheiten 2004, **33/9**: P06.06, 504

Posterbeitrag zum 35. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie – Basel 2004

Staudacher, T.; Maier, R.; Albinus, M.; Mühlbauer, B and Luippold, G. Role of the dopaminergic system on the renin secretion of isolated juxtaglomerular cells. *Naunyn-Schmiedeberger's Arch. Pharmacol.* 2005, **371**, **Suppl. 1**: 376

Freier Vortrag zur 46. Frühjahrstagung der DGPT – Mainz 2005

Dilger, V.; Staudacher, T.; Wehrmann, M.; Drescher, K.; Gross, G.; Mühlbauer, B.; Luippold, G. Albuminuria and renal morphometry in longterm diabetic dopamine D₃ receptor knock-out mice. *Naunyn-Schmiedeberger's Arch. Pharmacol.* 2005, **371**, **Suppl. 1**: 377

Abstract zur 46. Frühjahrstagung der DGPT – Mainz 2005

Pfeil, K.; Staudacher, T.; Luippold, G. Infusion of benserazide abolishes glomerular hyperfiltration in diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberger's Arch. Pharmacol.* 2005, **371**, **Suppl. 1**: 378

Abstract zur 46. Frühjahrstagung der DGPT – Mainz 2005

Staudacher, T.; Pech, B.; Tappe, M.; Gross, G.; Mühlbauer, B.; Luippold, G. Salt-dependent changes of arterial blood pressure in dopamine D₃ receptor knockout mice.

Publikation in Vorbereitung

Herrn Prof. Dr. Oßwald danke ich für die Bereitstellung der Laborgeräte, des Arbeitsplatzes und für die anregenden ideenreichen Gespräche.

Herrn Klaus Stieler möchte ich für die Wartung und Pflege unserer Laborausrüstung und insbesondere für die Herstellung der Superfusionskammern danken.

Den Tierpflegern Herrn Schuster, Herrn Schuller und Herrn Zent danke ich für die Betreuung meiner Tiere und für die Unterstützung bei den jeweiligen Tierexperimenten.

Frau Dr. Delabar danke ich für ihre Unterstützung, Mühe und die Geduld bei den Kreatininmessungen. Ferner danke ich Ihnen für meine Betreuung während der Ausbildung zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation.

Frau PD Dr. Albinus möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass sie mir mit Rat und Tat in den vielen Bereichen der Zellpräparation und des Radioimmunoassays beigegeben ist und mir die entscheidenden Fingerfertigkeiten zur Bewältigung dieser Aufgabe beigebracht hat.

Frau Piesch danke ich für die Unterstützung bei der Katecholaminbestimmung mit Hilfe der HPLC und für die Hilfe bei den vielen, vielen kleinen Dingen, die während des Laboralltages ständig anfielen.

Frau Maier möchte ich für ihre unermüdliche Ausdauer beim Pipettieren, sowie für ihre gesamte Unterstützung bei der Bewältigung der sehr zahlreichen RIAs und den vielen damit verbundenen Aufgaben danken.

Frau Prof. Dr. Drews danke ich ganz herzlich für die Diskussionen und Hinweise sowie für die Betreuung meiner Arbeit innerhalb der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Herrn PD. Dr. Luippold danke ich ganz herzlich für die Anleitung während meiner Arbeit, insbesondere für die richtungsweisenden Hinweise, die ständige Verfügbarkeit und die entscheidenden Diskussionen.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernd Mühlbauer möchte ich ganz herzlich für die Betreuung, Unterstützung, die spannenden Diskussionen und für die vielen entscheidenden Hinweise danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch noch bei Frau Pfeil und Frau Dilger, deren Mitbetreuung mir sehr viel Spass gemacht hat, für die nette, gelegentliche Zerstreuung während der Laborarbeit danken.

LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER

Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Prof. Dr. G. Drews

Prof. Dr. L. Heide

Prof. Dr. K.-A. Kovar

Prof. Dr. S. Laufer

Prof. Dr. G. Luippold

Prof. Dr. B. Mühlbauer

Prof. Dr. H. Oßwald

Prof. Dr. P.C. Schmidt

Prof. Dr. J.E. Schulz

Prof. Dr. M.A. Wahl