

Aus dem Institut für Pharmakologie der Universität Tübingen
Abteilung Pharmakologie und experimentelle Therapie
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. H. Oßwald

**Lokalisation renaler Dopamin D₃-Rezeptoren mittels
konfokaler
laser-scan Mikroskopie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MARCUS RÄBIGER
aus
Stuttgart
2005

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Mühlbauer

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Rosendahl

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Gegenstand der Arbeit	1
1.2	Bisheriger Kenntnisstand	1
1.2.1	Biosynthese und Vorkommen von Dopamin	1
1.2.2	Wirkung von exogen zugeführtem Dopamin auf die Nierenfunktion	3
1.2.3	Bedeutung des endogenen Dopamins in der Niere	5
1.2.4	Bedeutung von Dopamin für die neuronale Kontrolle der Nierenfunktion	8
1.2.5	Dopaminrezeptoren	9
1.2.5.1	Identifizierung und Klassifikation	9
1.2.5.2	Renale Lokalisation	11
1.2.6	Der Dopamin D3-Rezeptor	12
1.2.6.2	Struktur und Signaltransduktion	12
1.2.6.2	Liganden an Dopamin D3-Rezeptoren	14
1.2.6.3	Funktionelle Befunde	15
1.2.6.4	Hypothesen zur pathophysiologischen Bedeutung des D3R	16
1.2.7	Anatomie des proximalen Tubulus	17
1.2.8	Der tubuläre Endocytoseapparat	18
1.3	Fragestellungen	19

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1.	Versuchstiere	21
2.1.2.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	21
2.1.3.	Antikörper, direkte Fluoreszenzmarker und Seren	22
2.1.3.1	Primärantikörper und Kontrollpeptide	22
2.1.3.2.	Direkte Fluoreszenzmarker	24
2.1.3.3.	Sekundärantikörper	25
2.1.3.4	Normalsera	25
2.1.4.	Lösungen und Puffer	25
2.1.4.1	Lösungen und Puffer für Immunfluoreszenzexperimente	25
2.1.4.2	Lösungen und Puffer für Ligandenbindungsexperimente	26
2.1.5	Geräte	27

2.2 Methoden

2.2.1	Immunfluoreszenznachweis des Dopamin D3-Rezeptors in Niere und Gehirn verschiedener Rattenstämme	27
2.2.1.1	Perfusionsfixierung und Organentnahme	27
2.2.1.2	Renale Denervierung	29
2.2.1.3	Einbettung und Anfertigung von Kryostatschnitten	29
2.2.1.4	Präinkubation	30
2.2.1.5	Inkubation mit primären Antikörpern	30
2.2.1.6	Inkubation mit sekundären Antikörpern	31
2.2.1.7	Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie	32
2.2.1.8	Bildbearbeitung	33
2.2.2	Ligandenbindungsexperimente	34
2.2.2.1	Organentnahme und Isolation von Zellmembranen	35
2.2.2.2	Proteinquantifizierung nach Bradford	36
2.2.2.3	Reaktionsansatz für Sättigungsexperimente	37
2.2.2.4	Auftrennung des Reaktionsgemisches nach der Filtrationsmethode	38
2.2.2.5	Bestimmung der gebundenen Aktivität	39
2.2.2.6	Auswertung der Bindungsdaten	40

3. Ergebnisse

3.1	Immunfluoreszenz-Untersuchungen	41
3.1.1	Nachweis cerebraler D3R der Ratte	41
3.1.2.	Nachweis renaler D3R bei verschiedenen Rattenstämmen	45
3.1.2.1	Auswirkung chronisch renaler Denervation	49
3.1.3.	D3R Fluoreszenz und potentiell kolokalisierte Strukturen	51
3.1.3.1	Darstellung des Bürstensaumes mit Phalloidin	51
3.1.3.2	Aquaporin-2 als Markerprotein kortikaler Sammelrohre	53
3.1.3.3	NHE 3	55
3.1.3.4	β -Adaptin	57
3.2	Sättigungsexperimente	59
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	63

4. Diskussion	
4.1. Methodendiskussion	67
4.1.1 Lokalisation eines Antigens mit polyklonalen Antikörpern	67
4.1.2 Inkubationsbedingungen	67
4.1.3 Kontrollen	68
4.1.4 Autofluoreszenz	69
4.1.5 Effizienz der renalen Denervierung	70
4.1.6 Nachweis cerebraler D3R als Positivkontrolle	70
4.1.7 Ligandenbindungsexperimente	72
4.2. Lokalisation renaler D3R	72
4.2.1 Lokalisation durch direkte Nachweisverfahren	72
4.2.2 Funktionelle Hinweise auf die Lokalisation des D3R	76
4.3. D3R und seine möglichen funktionellen Beziehungen im PT	79
4.3.1 Endosomale Lokalisation im Rahmen von Regulationsprozessen?	80
4.3.2 Subapikal tubuläre D3R als Teil eines autokrinen DA-Systems?	81
4.3.3 Funktionelle Bedeutung des D3R für Funktion von Endosomen	82
4.4 NHE 3 im proximalen Tubulus	83
4.4.1 Funktionelle Verknüpfung von NHE und Dopaminrezeptoren	84
4.4.2 Bedeutung von NHE3 bei der Endozytose	85
4.5 Fazit und Ausblick	86
5. Zusammenfassung	88
6. Zitierte Literatur	89

Abkürzungsverzeichnis

AADC:	(aromatic) amino acid decarboxylase
Ag/Ak:	Antigen/Antikörper
AP-2:	adaptor complex 2
BBM:	brush border membrane
CCV:	clathrin coated vesicle
CCD:	cortical collecting duct
CHO:	Chinese Hamster ovary cells
DA:	Dopamin
DT:	Distaler Tubulus
D3R / D1R:	Dopamin D ₃ /D ₁ -Rezeptor
GFR:	glomeruläre Filtrationsrate
GPCR:	G-Protein coupled receptor
HEK293:	human embryonic kidney cells
HPLC:	high pressure liquid chromatography
Ic _j :	Islands of Calleja
IgG:	Immunglobulin G
IF:	Immunfluoreszenz
JG-Zellen	Reninsezernierende Zellen im juxtaglomerulären Apparat
NA:	Noradrenalin
NHE:	Na ⁺ -H ⁺ -Exchanger
OK-Zellen:	opossum kidney
PCR:	polymerase chain reaction
PT:	Proximaler Tubulus
RBF:	renaler Blutfluss
RT-PCR:	reverse transcriptase-PCR
SD:	Sprague-Dawley-Ratte
SHR:	spontaneously hypertensive rat
TAL	thick ascending limb (aufsteigender Schenkel der Henle'schen Schleife)
TH:	Tyrosinhydroxylase
WKY:	Wistar-Kyoto-Ratte

1. Einleitung

1.1 Gegenstand der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die **Lokalisation des Dopamin D3-Rezeptors (D3R)** in den Nieren verschiedener Rattenstämme untersucht. Hierbei kam in erster Linie eine indirekte Immunfluoreszenz (IF)-Markierung zur Anwendung. Um eine genauere morphologische Zuordnung der D3R Fluoreszenz treffen zu können, wurden verschiedene Gegenfärbungen eingesetzt.

Zur Untersuchung der Hypothese einer **neuronalen Lokalisation** des D3R in der Niere wurde außerdem die Auswirkung chronischer renaler Denervierung auf die Nachweisbarkeit des Rezeptorproteins untersucht. Mit der IF-Methode sollte dabei zunächst eine eher qualitative Aussage über die Bedeutung renaler Nerven für das Vorhandensein von D3R in der Rattenniere gemacht werden, während als quantifizierendes Verfahren ein Bindungsassay mit dem D3R-selektiven Radioliganden [³H]-7-OH-DPAT zur Anwendung kam.

1.2. Bisheriger Kenntnisstand

1.2.1 Biosynthese und Vorkommen von Dopamin

Dopamin (3,4-Di-hydroxy-L-phenylethylamin) (DA) gehört wie Adrenalin und Noradrenalin zu den Katecholaminen. Es handelt sich bei diesen Stoffen um biogene Amine, die aus den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin gebildet werden. Der initiale und zugleich geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katecholaminsynthese ist die Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-DOPA (3,4-Di-hydroxy-L-phenylalanin) durch die Tyrosinhydroxylase (TH). L-Phenylalanin wird ebenfalls durch dieses Enzym zu L-Tyrosin hydroxyliert [Siegel et al., 1998].

TH ist intrazytoplasmatisch in katecholaminergen Neuronen, den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes, sowie in extraneuronalen intestinalen Geweben zu finden [Eisenhofer et al., 1997] In der Niere kommt TH vermutlich

nur in sehr geringen Mengen in neuronalen Strukturen vor [Mühlbauer et al., 1997a].

Der nächste Schritt der Katecholaminsynthese ist die Decarboxylierung von L-DOPA zu Dopamin unter Wirkung der DOPA-Decarboxylase. Da dieses Enzym in der Lage ist, neben L-DOPA noch weitere aromatische Aminosäuren umzusetzen, wird es auch als aromatic amino acid decarboxylase (AADC) bezeichnet. Neben katecholamin-produzierenden Neuronen ist AADC in verschiedenen extraneuronalen Geweben zu finden. Hohe Konzentrationen des Enzyms finden sich auch in den Zellen des proximalen Tubulus der Niere (PT), die dadurch in der Lage sind, tubulär resorbiertes L-Dopa zu Dopamin umzusetzen [Baines und Chan, 1980].

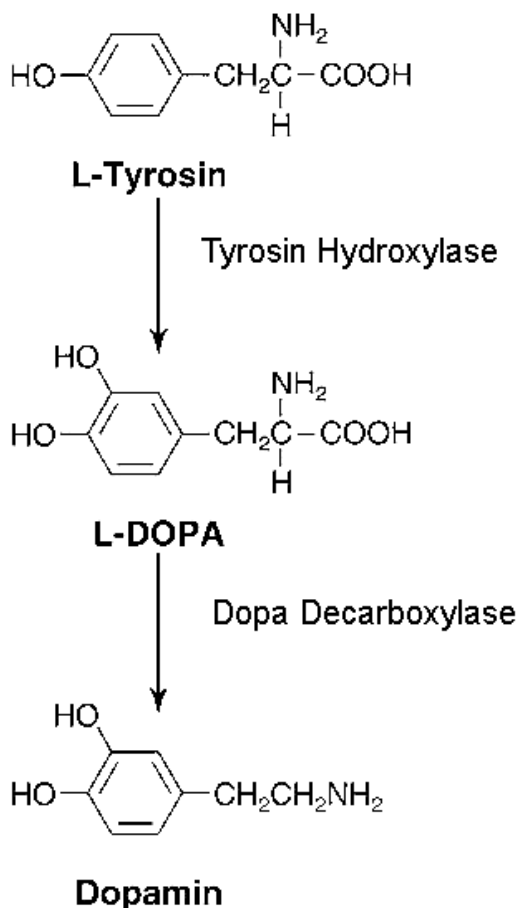


Abb.1 Synthese von Dopamin aus L-Tyrosin. Aus: [Siegel et al. 1998]

Durch eine weitere Hydroxylierung unter Einwirkung der Dopamin- β -hydroxylase entsteht aus Dopamin Noradrenalin, das im Nebennierenmark und wenigen Neuronen des Hirnstammes durch die Phenylethanolamin-N-methyltransferase (PNMT) zu Adrenalin methyliert werden kann [Siegel et al., 1998].

Der enzymatische Abbau von Dopamin erfolgt durch seine O-Methylierung durch die von Mg^{2+} -Ionen abhängige Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und die Deaminierung durch die Monoaminoxidase (MAO). Endprodukte sind Homovanilinsäure und DOPAC, die vorwiegend konjugiert ausgeschieden werden. Die abbauenden Enzyme sind in diversen Geweben, darunter auch die Niere vorhanden [Kopin, 1985].

1.2.2 Wirkung von exogen zugeführtem Dopamin auf die Nierenfunktion

Ein diuretischer und natriuretischer Effekt parenteral verabreichten Dopamins wurde erstmals 1964 beim Menschen beschrieben [Mc Donald et al., 1964]. Diese Effekte werden bereits mit niedrigen Dosierungen von Dopamin erreicht, bei denen noch keine systemische Wirkungen auftreten sollten („Nierendosis“ : 1-3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$). In höheren Dosierungen kann Dopamin auch α - und β -adrenerge Rezeptoren aktivieren. Allerdings sind die Übergänge dieser gedachten Selektivität fließend, wie sich später zeigte. Die genannten renalen Wirkungen führten aus pathophysiologischen Überlegungen zum Einsatz von Dopamin bei der Prophylaxe des akuten Nierenversagens (ANV) im intensivmedizinischen Bereich, was sich jedoch aus heutiger Sicht nicht mehr als sinnvolle Praxis darstellt, da sich in einer Vielzahl klinischer Studien weder eine prophylaktische Wirkung für das Auftreten eines ANV, noch eine Verbesserung der Prognose des bereits manifesten ANV zeigen ließ. Hinzu kommt, daß DA bereits in „Nierendosis“ durchaus zu kardialen Komplikationen führen kann, vor allem bei schwerkranken Intensivpatienten. Über eine Vielzahl weiterer unerwünschter Wirkungen wurde berichtet [Denton, 1996; ANZICS Studie, 2000].

Der natriuretischen Wirkung von Dopamin liegt nach heutiger Kenntnis eine reversible Hemmung mehrerer Mechanismen zu Grunde, die an der Rückresorption von Natrium, hauptsächlich im PT, beteiligt sind. Es handelt sich hierbei in erster Linie um die am basolateralen Zellpol lokalisierte $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase [Aperia et al., 1987; Seri et al., 1988] und den an der luminalen

Plasmamembran zu findenden Na^+/H^+ -Austauscher [Felder CC et al., 1990; 1993]. Außerdem wurde über eine inhibitorische Wirkung von Dopamin auf den luminalen Na^+P_i -Kotransporter berichtet, der auch für den phosphaturischen Effekt von DA verantwortlich sein soll [Perrichot et al., 1995; Baines und Draganova 1998].

Mit der Entdeckung multipler Dopaminrezeptoren und deren Klassifikation als D1- und D2-ähnliche („D1-like“ und „D2-like“)(s. Kap 1.2.5.) ging die Entwicklung spezifischer Liganden einher, die eine in zunehmendem Maße differenzierte Betrachtung der Wirkung von Dopamin ermöglichten. Untersuchungen mit „selektiv“ wirksamen Liganden bergen allerdings die Gefahr einer Überschätzung der diskriminativen Qualitäten der jeweiligen Substanz und müssen daher mit Vorsicht interpretiert werden.

Es wurde gezeigt, daß neben Dopamin auch selektive D1-like Rezeptoragonisten eine Steigerung der GFR, des RBF sowie der fraktionellen Na^+ -Ausscheidung hervorrufen können [Übersicht bei Jose et al., 1992] während selektive D1-Antagonisten in der Lage sein sollen, diese Effekte zu antagonisieren [Jose et al., 1998]. Auch die Freisetzung von Renin aus juxtaglomerulären Zellen wird durch Dopamin, vor allem über D1-like Rezeptoren vermittelt, stimuliert. Dies ist ein Effekt, der besonders unter arteriöler Vasodilatation ausgeprägt ist [Sanada et al., 1997].

Die Bedeutung von D2-like Rezeptoren für die Regulation der Nierenfunktion hingegen wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Bei Hunden konnte durch intrarenale Gabe des D2-like-Agonisten Quinpirol sowohl GFR als auch RBF gesenkt werden [Siragy et al., 1992], während der D2-like Antagonist YM-09151 in der Lage ist, eine Diurese und Natriurese zu induzieren, die wiederum durch die D2-like Agonisten Quinpirol und LY171555 aufgehoben werden. Die Steigerung der GFR unter D2-like-Blockade soll dabei durch Dilatation des Vas afferens verursacht sein [Siragy et al., 1990]. Weiterhin konnte an mit D2-like Agonisten vorbehandelten Ratten eine Steigerung des RBF nach Gabe des D2-Antagonisten Domperidon beobachtet werden.

Diese Befunde legen also indirekt einen vasokonstriktiven Effekt der D2-like Aktivierung nahe [Jose et al., 1998].

Während, wie oben erwähnt, D1-like Agonisten eine Steigerung der Reninfreisetzung auslösen, sollen D2-like Agonisten an Zellen des juxtaglomerulären Apparates eine Hemmung der Reninfreisetzung bewirken [Sanada et al., 1997]. Diese Befunde unterstützen folglich die Annahme, daß die Funktionen von D1- und D2-like Rezeptoren in der Niere einander weitgehend entgegengesetzt sind [Jose et al., 1998].

Im Widerspruch hierzu finden sich allerdings Untersuchungen, in denen über glomeruläre und vaskuläre Wirkungen der D2-like-Agonisten Bromocriptin [Stier et al., 1982] und Quinpirol [Seri und Aperia, 1988; Luippold et al., 1998b] im Sinne einer Steigerung von snGFR und RBF bei narkotisierten Ratten berichtet wird.

Die Feststellung, daß die beobachteten Wirkungen von Dopamin und seiner Analoga abhängig von der Salz- und Volumenbeladung des Organismus sind [Pelayo et al., 1983; Hedge et al., 1989; Hansell und Fasching, 1991] wurde herangezogen, um diese Widersprüche zu erklären. Eine Abhängigkeit der Wirkungen von D2-like Rezeptoren von der Natriumbeladung des Organismus wurde postuliert. Demnach sollen D1- und D2-like Rezeptoren unter Natriumbeladung synergistisch eine natriuretische Wirkung ausüben, wobei aus der Gruppe der D2-like Rezeptoren vor allem der D3R von Bedeutung zu sein scheint [Luippold et al., 1998a].

Die teilweise divergenten Befunde aus älteren Untersuchungen mit pharmakologisch als selektiv postulierten Liganden sind nicht zuletzt durch die Existenz weiterer Subtypen von Dopaminrezeptoren (z.B. des D3-Rezeptors innerhalb der D2 "like" Gruppe) mit pharmakologisch differenten Eigenschaften zu erklären. Die bislang bekannten Subtypen werden in Kapitel 1.2.5. beschrieben.

Unter der Bedingung eines Natriummangels hingegen bewirken D2-like Rezeptoren eine Natriumretention, für die ebenfalls in erster Linie D3R verantwortlich sein sollen [Jose et al., 2000].

1.2.3 Bedeutung des endogenen Dopamins in der Niere

Dopamin wird außerhalb von Nervenendigungen auch im Epithel des proximalen Tubulus gebildet und renal ausgeschieden. Der Ursprung des im Urin ausgeschiedenen Dopamins war allerdings lange Zeit unklar. Die Vermutung, es handle sich hierbei um die renale Elimination plasmatischen Dopamins, wurde verworfen, da die große Menge des ausgeschiedenen Katecholamins mit der Höhe seiner Konzentration im Plasma nicht erklärbar ist [Da Prada und Zürcher 1976].

Dopaminerge Neurone der Niere wurden ebenfalls als mögliche Quellen für das im Urin gemessene Dopamin angeführt [Dinerstein et al., 1979]. Allerdings wird neuronal freigesetztes Dopamin größtenteils wieder in Nervenendigungen aufgenommen, beziehungsweise auf venösem Wege aus der Niere abtransportiert [Stephenson, 1982]. In Experimenten an denervierten Tieren konnte schließlich gezeigt werden, daß die Dopaminsekretion der Niere weitgehend, [Baines, 1982] wenn nicht vollständig [Mühlbauer und Osswald, 1994] unabhängig vom Vorhandensein renaler Nerven ist und das im Urin ausgeschiedene DA folglich überwiegend extraneuronal in der Niere gebildet werden muß. Als Substrat dieser renalen Dopaminsynthese spielt plasmatisches L-DOPA vermutlich die entscheidende Rolle.

Die Zellen des PT weisen eine hohe Aktivität der (Aromatischen)-Aminosäuren Decarboxylase (AADC) auf [Goldstein et al., 1972] und es konnte vielfach gezeigt werden, daß sie zur Synthese von Dopamin aus glomerulär filtriertem oder zirkulierendem L-DOPA in der Lage sind [Baines und Chan, 1980; Zimlichman et al., 1988; Hayashi et al., 1990; Soares da Silva und Fernandes, 1990; Wolfvitz et al., 1993]. Hinweise auf die hohe Enzymaktivität der renalen AADC ergaben sich daneben in Experimenten an Hunden, bei denen nach arterieller Applikation von L-DOPA nur etwa die Hälfte der in der Nierenarterie gemessenen Konzentration der Aminosäure im renal venösen Blut auftauchte, ohne dass L-DOPA im Urin ausgeschieden wurde, während andererseits eine erhöhte renal-venöse DA-Konzentration beobachtet werden konnte [Ball et al.,

1982]. Hagege und Richet gelang es mit Histofluoreszenz-Untersuchungen in den S1 und S2 Abschnitten des PT die Bildung von DA aus L-DOPA und seine Ansammlung in vesikulären Strukturen darzustellen [Hagege und Richet, 1985]. Die Lokalisation dieser DA „Vesikel“ stimmt mit der immunhistochemisch gefundenen Verteilung der renalen AADC weitgehend überein [Bertorello et al., 1988].

Die Beobachtung, daß eine gesteigerte Na^+ -Zufuhr mit einem Anstieg der renalen Dopaminausscheidung einhergeht, ohne dabei die Plasmaspiegel für DA wesentlich zu verändern [Alexander et al., 1974], wies auf die natriuretische Wirkung von renal gebildetem Dopamin hin [Ball et al., 1978].

Als ein möglicher Effektormechanismus des in den Tubuluszellen synthetisierten Dopamins wurde von der Arbeitsgruppe um Aperia eine nicht-rezeptorvermittelte, autokrine Hemmung der basolateralen Na-K-ATPase vorgeschlagen. Die Aktivität dieser Ionenpumpe konnte sowohl durch Hochsalz-Ernährung als auch durch In-vitro-Inkubation von isolierten proximalen Tubulussegmenten mit DA oder L-DOPA gehemmt werden, was als Ursache der unter Salzbelastung beobachteten Natriurese gewertet wird [Bertorello et al., 1988]. Eine Hemmung der Decarboxylierung von L-DOPA durch den AADC Inhibitor Benserazid ist in der Lage, dessen Wirkung auf die Na-K-ATPase in vitro und in vivo aufzuheben. Dies weist ebenfalls auf die Bedeutung von lokal im Tubulus gebildeten DA als Vermittler der hochsalz-induzierten Natriurese hin, ohne jedoch eine rezeptorvermittelte renal-vaskuläre Wirkung von Dopamin auszuschließen [Aperia et al., 1987]. Eine inhibitorische Wirkung von DA auf die jejunale Na-K-ATPase, die dort mit verminderter Na-Resorption einhergeht, wird als zu den renalen Dopaminwirkungen gleichsinnige Beeinflussung des Na-Haushaltes diskutiert [Vieira-Coelho et al., 2000].

Da in einigen neueren Studien sowohl an gesunden Probanden als auch an Versuchstieren ein Zusammenhang von DA-Ausscheidung und Na^+ -Exkretion nicht reproduziert werden konnte [Barendregt et al., 1995; Mühlbauer und Osswald 1992; Luippold et al., 2000b], erscheint die Bedeutung des tubulär gebildeten und im Urin erscheinenden DA für die Na^+ -Exkretion unter physiologischen Bedingungen heute als belanglos .

In mehreren Studien konnte dagegen dargestellt werden, daß Zufuhr von Proteinen oder Aminosäuren eine Steigerung der renalen DA-Ausscheidung nach sich ziehen. Sowohl durch proteinreiche Ernährung von Probanden [Williams et al., 1986] als auch durch orale, parenterale oder intraperitoneale Gabe von Aminosäuren bei der Ratte [Kaufman et al., 1989; Mühlbauer et al., 1997b] konnte eine Steigerung der DA-Ausscheidung in den Urin hervorgerufen werden. Weiterhin wurde jedoch gezeigt, daß lediglich die Katecholaminvorstufen L-Tyrosin und L-Phenylalanin für die beobachtete Steigerung der DA-Ausscheidung verantwortlich sind [Mühlbauer et al., 1997b]. Dieser Effekt tritt unabhängig von GFR-Steigerung und Natriurese auf und ist im Gegensatz zu diesen nicht durch den D2 Antagonisten S(-)-Sulpirid hemmbar [Mühlbauer et al., 1997c].

1.2.4 Bedeutung von Dopamin für die neuronale Kontrolle der Nierenfunktion

Die Niere wird von sympathischen Efferenzen erreicht, die zum überwiegenden Teil aus unmyelinisierten Nervenfasern gebildet werden. Diese entfalten ihre Wirkungen an Widerstandsgefäßen, JG-Zellen und allen Abschnitten des renalen Tubulussystems. Stimulation renaler Nerven mit steigender Reizintensität oder -frequenz resultiert zunächst in einer Steigerung der Reninsekretion, gefolgt von einer Steigerung der Na⁺-Resorption und schließlich einer Reduktion von RBF und GFR. Wahrscheinlich erfolgen tubuläre und vaskuläre Innervation über Nervenfasern unterschiedlicher Qualität.

In Bezug auf die antinatriuretischen Wirkungen einer neuronalen Stimulation im PT ist eine über noradrenerge α_{1B} -Rezeptoren vermittelte Steigerung der Aktivität der basolateralen Na-K-ATPase belegt [DiBona, 2000]. Es wird angenommen, daß Dopamin entweder über präsynaptische Rezeptoren [Barili, 1997] an der Regulation der Aktivität renaler Nerven beteiligt ist oder, wie im vorangehenden Abschnitt erwähnt, direkt die Na-K-ATPase moduliert.

Allerdings sprechen sowohl biochemische als auch morphologische Hinweise gegen die Existenz einer physiologisch relevanten dopaminergen Innervation

der Niere [Soares da Silva, 1992; DiBona und Kopp, 1997]. So wurde Dopamin zwar in renalen Nerven des Hundes nachgewiesen [Dinerstein et al., 1972], es konnte jedoch bisher kein überzeugender Nachweis seiner funktionellen Bedeutung als Neurotransmitter in der Niere erbracht werden. Es kann daher angenommen werden, daß neuronales DA in der Niere seine hauptsächliche Bedeutung als Synthesevorstufe für NA besitzt [DiBona und Kopp, 1997]. Es scheinen zudem große Unterschiede im Dopamingehalt renaler Nerven zwischen verschiedenen Spezies zu bestehen; für die Ratte soll dieser vergleichsweise gering sein [Soares da Silva, 1992].

1.2.5 Dopaminrezeptoren

1.2.5.1 Identifizierung und Klassifikation

Aus der Untersuchung von Dopamin in seiner Rolle als Neurotransmitter im ZNS waren große Unterschiede in Affinität und Wirkungen der Substanz in verschiedenen Hirnregionen schon seit langem bekannt. Diese Befunde legten die Existenz multipler Rezeptoren für Dopamin nahe. In den späten 70er Jahren wurde das Vorkommen zweier Subtypen von Dopaminrezeptoren postuliert, von denen der D1R positiv mit der Adenylatzyklase (AC) gekoppelt, der D2R hingegen vermeintlich unabhängig von diesem Signalweg sein sollte [Kebabian und Calne, 1979]. Analog hierzu konnte auch in der Peripherie die Existenz spezifischer Dopaminrezeptoren nachgewiesen werden [Goldberg et al., 1978], die aufgrund zunächst noch angenommener Strukturunterschiede von den zentralnervösen Rezeptoren abgegrenzt und in der älteren Literatur häufig als DA1 bzw. DA2-Rezeptor bezeichnet wurden [Jose et al., 1992]. Mit fortschreitenden molekularbiologischen Möglichkeiten gelang es jedoch, eine strukturelle Übereinstimmung zwischen zentralen und peripheren Rezeptoren zu belegen, so daß diese Unterscheidung aufgegeben wurde [Nash et al., 1993; Missale et al., 1998].

Die zunächst ausschließlich auf pharmakologischen Daten beruhende Einteilung in D1 und D2-Rezeptor wurde zu Beginn der 90er Jahre entscheidend erweitert. So konnte nach der Aufklärung der genomischen Struktur des D2-Rezeptors [Bunzow et al., 1988] und dessen beider Splicevarianten D2_{long} und D2_{short} [Dal Toso et al., 1989] ein weiterer, dem D2-Rezeptor eng verwandter Subtyp von Dopaminrezeptor identifiziert werden, der D3-Rezeptor [Sokoloff et al., 1990]. Im selben Jahr gelang es mit Screeningverfahren auf der Grundlage des bereits identifizierten D2-Rezeptor Genes auch den D1-Rezeptor zu klonieren [Dearry et al., 1990]. Im Wettlauf um die Identifikation weiterer Subtypen folgte die Publikation der Klonierung eines D4-Rezeptors mit hoher Affinität zu Clozapin aus einer humanen Neuroblastomzelllinie [Van Tol et al., 1991; Matsumoto et al., 1995] und die Darstellung der Genstruktur des eng mit dem humanen D1-Rezeptor verwandten D5-Rezeptors [Sunahara et al., 1991]. Ungefähr zeitgleich wurde bei der Ratte ein sogenannter D1b-Rezeptor beschrieben [Tiberi et al., 1991], der heute als Äquivalent des humanen D5-Rezeptors angesehen wird.

Die Untersuchung der Signaltransduktionswege dieser Rezeptorsubtypen sowie ihrer pharmakologischen Profile führten in Übereinstimmung mit der oben genannten Klassifikation von Keabian und Calne zu deren Einteilung in D1-like und D2-like Rezeptoren. Dabei wird die D1-like Familie von den in ihrer Proteinsequenz zu 82 % homologen D1R und D5R gebildet. D1-like Rezeptoren sind positiv über ein G_{αs}-Protein mit der Adenylatcyclase (AC) gekoppelt, während man heute annimmt, dass die zur Familie der D2-like zählenden D2_{long}, D2_{short}, D3 sowie D4 Rezeptoren über ein G_{i/o}-Protein negativ mit der AC gekoppelt sind [Missale et al., 1998]. Hierbei scheint es aber organ-, eventuell auch speziesspezifische Ausnahmen zu geben, so dass die Kopplung der D2-like Familie noch unbefriedigend geklärt ist. Die Sequenzhomologie zwischen den humanen D3R und D2R beträgt insgesamt 52% [Giros et al., 1990].

1.2.5.2 Renale Lokalisation

Zumindest die grundsätzliche Existenz aller bislang klonierter Rezeptorsubtypen konnte in der Niere nachgewiesen werden [Missale et al., 1998] und ihre anatomische Verteilung wurde mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht:

Dopamin D1-Rezeptoren konnten immunhistochemisch in arteriellen Gefäßen der Niere, im juxtaglomerulären Apparat, dem proximalen- (PT) und distalen Tubulus (DT) sowie in kortikalen Sammelrohren (CCD) nachgewiesen werden [O'Connell et al., 1995]. Die Ergebnisse von Radioligandenbindungsstudien mit D1R-selektiven Agonisten blieben bezüglich einer glomerulären Lokalisation widersprüchlich [Missale et al., 1998], während an Zellen des glomerulären Mesangiums ein in vitro Nachweis von funktionell aktiven D1R gelang [Bryson et al., 1992].

Für die Subgruppe der D2-like Rezeptoren wurde mit Radioligandenbindungsstudien und funktionellen Untersuchungen eine präsynaptische Verteilung in sympathischen Nerven der Adventitia renaler Gefäße sowie in Glomerula postuliert [Lokhandwala et Amenta 1991]. Solchen präsynaptischen D2-like Rezeptoren wird eine inhibitorische Beeinflussung der NA-Freisetzung aus renalen Nerven zugeschrieben. Auch für humanes Nierengewebe konnte ein hemmender Effekt von D2-like Agonisten auf die NA-Freisetzung gezeigt werden [Rump et al., 1993]. Neben der präsynaptischen Lokalisation gibt es schon seit längerem funktionelle Hinweise auf eine renal-vaskuläre oder glomeruläre, postsynaptische Lokalisation der D2-like Rezeptoren in der Niere [Siragy et al., 1990].

Autoradiografische Untersuchungen mit [³H]-Spiroperidol weisen auf eine kortikale Lokalisation von D2-like Rezeptoren in PT, DT und CCD sowie in renalen Arterien hin [Amenta et al., 1990]. Eine differenzierte Betrachtung der Verteilung dieser Rezeptoren im PT des Hundes stellte die Koexpression von D1- und D2-like Rezeptoren in BBM und basolateralen Membranen fest. [Felder CC et al., 1989].

Der Nachweis von mRNA verschiedener D2-like Rezeptoren (D2_{long} und D3) erfolgte in Cortex, Medulla und Mikrogefäßen der Rattenniere [Gao et al., 1994]. Daneben wurde auch mit autoradiografischen Methoden versucht, die renale Verteilung des D3R zu ermitteln, wobei die höchste Rezeptordichte im PT gefunden wurde [Amenta et al., 1997].

Eine erste immunhistochemische Darstellung des D3R wurde von O'Connell und Mitarbeitern berichtet, die diesen sowohl in Podozyten als auch in tubulären und arteriellen Lokalisationen nachgewiesen haben wollen [O'Connell et al., 1998]. Eine eng mit der Arbeitsgruppe um O'Connell kooperierenden Gruppe berichtete ebenfalls von der immunhistochemischen Darstellung einer D3R-Reaktivität in renalen Arterien [Amenta et al., 2000]. Allerdings wurden diese Befunde in der nachfolgenden Zeit nicht von anderen Gruppen bestätigt, der entsprechende Antikörper existiert nicht mehr [persönliche Mitteilung].

Trotz mehrerer kommerziell angebotener Antikörper gegen verschiedene Epitope des D3R wurde neben den erwähnten beiden Arbeiten mit dieser Methode zunächst kein weiterer Nachweis des Rezeptorproteins publiziert. Erst der Arbeitsgruppe um Sokoloff gelang mit einem selbst hergestellten Antikörper die überzeugende Darstellung einer D3R-Immunreaktivität an Hirngewebe [Diaz et al., 2000]. Zur Untersuchung der renalen Lokalisation des D3R-Proteins wurde uns dieser Antikörper freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1.2.6 Der Dopamin D3-Rezeptor

1.2.6.1 Struktur und Signaltransduktion

Wie alle anderen DA-Rezeptoren zählt auch der D3R zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Diese zeichnen sich durch sieben transmembran-Domänen aus, mit denen sie in der Zellmembran verankert sind. Wie bereits erwähnt, wurde das 446 AS große D3R-Protein im Jahre 1990 zunächst aus der cDNA-Bank einer Ratte kloniert und in CHO Zellen exprimiert [Sokoloff et al., 1990]. Die Analyse des auf Chromosom 3 lokalisierten humanen D3R ergab eine Sequenzhomologie zur Ratte von 88% [Giros et al., 1990].

Entgegen der ursprünglichen Meinung, der D3R sei unabhängig von der Adenylatzyklase (AC) und G-Proteinen [Sokoloff et al., 1990], konnte durch seine Expression in verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen werden, daß er wie die anderen D2-like Rezeptoren negativ mit der AC gekoppelt ist.

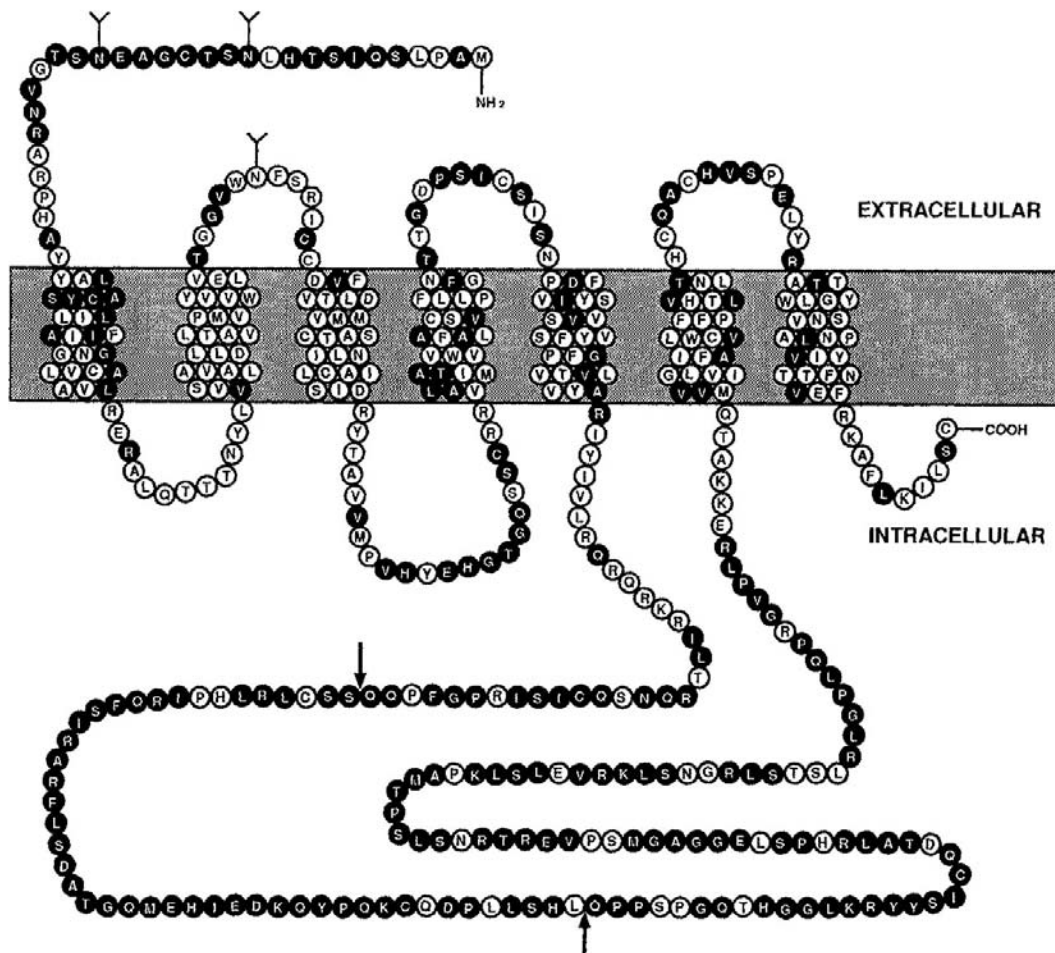


Abb. 2 Proteinsequenz des Dopamin D3-Rezeptors (D3R). Aus: [O'Connell et al., 1998]

Diese Kopplung ist allerdings deutlich weniger stark ausgeprägt als bei den anderen Mitgliedern der D2-like Familie [Bouthenet et al., 1991], was darauf zurückgeführt wird, daß der D3R aufgrund einer rigiden Molekülstruktur nur geringe Effizienz bei der Aktivierung inhibitorischer G-Proteine ($G_{i/o}$) besitzt [Vanhauwe et al., 2000].

Wie alle D2-like Rezeptoren sind auch D3R in der Lage, $G_{i/o}$ -abhängig den zellulären K^+ -Efflux zu steigern und somit eine Hyperpolarisation der Zelle

auszulösen, was vermutlich bei präsynaptisch gelegenen Rezeptoren eine Hemmung der DA-Freisetzung im Rahmen von Autoregulationsvorgängen bewirkt [Missale et al., 1998]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß D3R den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle inhibieren, was ebenfalls Teil eines negativen Feedback Mechanismus sein könnte [Seabrook et al., 1994].

1.2.6.2 Liganden an Dopamin D3-Rezeptoren

Wie von Sokoloff berichtet besitzt DA eine 20-fach höhere Affinität für den D3R im Vergleich zum D2R [Sokoloff et al., 1990]. Es existiert eine Vielzahl von Substanzen, die sowohl an D3R als auch an D2R binden, wobei sich die Tendenz zeigen läßt, daß die meisten Agonisten mit höherer Affinität an D3R binden, die meisten Antagonisten hingegen den D2R bevorzugen [Vanhauwe et al., 2000] und daher D3R selektive Antagonisten wie z.B. U-991941 eine seltene Ausnahme darstellen [Waters et al., 1993; Luippold et al., 2000].

Zur Untersuchung der Lokalisation und funktionellen Bedeutung der einzelnen Subtypen von Dopaminrezeptoren sind selektive Liganden von größter Bedeutung. Vor allem in Hinblick auf mögliche therapeutische Anwendungen bei psychiatrischen Erkrankungen wurde nach der Klonierung des D3R große Hoffnung auf die Entwicklung selektiv wirksamer Substanzen gesetzt. Man erhoffte sich somit eine Beeinflussung der Rezeptoren des limbischen Systems unter Vermeidung der schwerwiegenden extrapyramidalen Nebenwirkungen, wie sie bei DA-Antagonisten mit höherer Affinität für D2R, z.B. den Butyrophenonen, auf Grund der Hemmung vorwiegend striataler D2R auftreten [Baldessarini et al., 1993; Large und Stubbs 1994].

Der D3R selektive Ligand 7-OH-DPAT (7-Hydroxy-Dipropyl-aminotetralin) wurde erstmals in den 80er Jahren synthetisiert und nach dem damaligen Stand der Kenntnis als DA-Agonist mit gewisser Selektivität für den D2-Autorezeptor klassifiziert [Feenstra et al., 1983]. Die Charakterisierung der Substanz als etwa 100-fach affiner für D3R gegenüber D2R gelang bald nach Entdeckung des D3R [Levesque et al., 1992]. Diese hohe Selektivität ist allerdings, wie die Autoren betonen, nur unter strenger Einhaltung bestimmter *in vitro* Bedingungen, wie einer moderaten NaCl-Konzentration (<50 mM) und dem

Zusatz von EDTA zum Inkubationsmedium, gewährleistet. Vor allem die Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen soll hierbei von großer Bedeutung für die postulierte D3 vs. D2 Selektivität sein [Levesque 1996]. So wird erklärt, daß aus Bindungsstudien an Hirngewebe, in denen $MgCl_2$ im Inkubationsmedium enthalten war [Hillefors-Berglund und Euler, 1994] über eine deutlich höhere Rezeptordichte berichtet werden konnte, als es in Abwesenheit dieses Salzes möglich war [Levesque, 1996].

Allerdings konnte auch unter physiologischen NaCl Konzentrationen noch eine 64-fache D3 vs. D2 Selektivität für das R(+)-Enantiomer des 7-OH-DPAT gezeigt werden [Baldessarini et al., 1993]. Obwohl die Aussagekraft von in vivo Versuchen mit 7-OH-DPAT aufgrund der berichteten Milieuabhängigkeit der D3 vs. D2 Selektivität in Frage gestellt wurde [Large und Stubbs, 1994; Levesque, 1996; Sokoloff, 2001 pers. Mitteilung], konnten in unserer Arbeitsgruppe Befunde erhoben werden, die eine solche Selektivität der Substanz durchaus nahelegen [Luippold et al., 1998a].

1.2.6.3 Funktionelle Befunde

Die GFR und der RPF werden vorwiegend über den **Widerstand der afferenten (R_{aff}) und efferenten (R_{eff}) Gefäße** des glomerulären Apparates reguliert („Autoregulation“). Hieran sind neben Katecholaminen zahlreiche weitere humorale Faktoren beteiligt (z.B. ADH, AT II, Adenosin). Eine Erhöhung des R_{aff} bewirkt dabei eine Reduktion sowohl des RPF als auch der GFR, während eine Steigerung des R_{eff} ebenfalls eine Reduktion des RPF, jedoch eine Steigerung der GFR nach sich zieht.

Im distalen Tubulus liegen die Zellen der Macula densa in unmittelbaren Nähe zum glomerulären Gefäßpol desselben Neprons. Zusammen mit der afferenten und efferenten Arteriole, den reninspeichernden Zellen und der extraglomerulären Matrix bilden diese den **juxtaglomerulären Apparat**. Aus einem Anstieg der NaCl Konzentration in diesem Bereich des DT resultiert eine Reduktion der GFR. Dieser Mechanismus wird als tubulo-glomerulärer Feedback (TGF) bezeichnet und stellt einen Mechanismus der renalen Autoregulation dar [Schnerman et al., 1984].

Daneben spielen eine myogene druckreflektorische Erhöhung des R_{aff} (Bayliss-Effekt), eine durch lokale Barorezeptoren vermittelte Aktivierung des RAAS und vermutlich weitere Mechanismen eine Rolle.

Auch die Zellen des **glomerulären Mesangiums** sind über ihre Fähigkeit zur Kontraktion an der Regulation der GFR beteiligt.

Bei anästhesierten SD-Ratten bestanden die Effekte einer D3R Stimulation durch parenterale Gabe von 7-OH-DPAT in pharmakologischen Dosen in einer dosisabhängigen Steigerung der GFR, der FE_{Na} sowie der Gesamtdiurese [Luippold et al., 1998a]. Desweiteren kam es zu einer signifikanten Erhöhung des renalen Gefäßwiderstandes und infolge dessen einer deutlichen Verringerung des RBF, während der systemische Blutdruck unbeeinflusst blieb. Zusammen mit den Befunden aus Mikropunktionsuntersuchungen, die unter 7-OH-DPAT Infusion einen Abfall des hydrostatischen Druckes in späten Abschnitten der efferenten Arteriole bei Steigerung des glomerulären Filtrationsdruckes zeigten, legen diese Beobachtungen eine vorwiegende Konstriktion postglomerulärer Gefäße als Effektormechanismus der Wirkung des D3R-Agonisten nahe [Luippold et al., 2000].

Während eine Vorbehandlung mit dem D2R-Antagonisten S(-)-Sulpirid die genannten 7-OH-DPAT Wirkungen nicht beeinflusste, wurden diese durch den selektiven D3R-Antagonisten U-99194A [Waters et al., 1993] vollständig aufgehoben [Luippold et al., 2000]. Die Effekte der ebenfalls als D3R-Agonist klassifizierten Substanz PD 128,907 entsprechen weitgehend den von Luippold und Mitarbeitern erhobenen Befunden [Akunne et al., 1995].

1.2.6.4 Hypothesen zur pathophysiologischen Bedeutung des D3R

Die Befunde zur natriuretischen Wirksamkeit von D3R-Agonisten unter Salzbelastung legen Spekulationen über deren Bedeutung bei der Entstehung eines salzabhängigen Hypertonus nahe. Derartige Überlegungen wurden unter anderem durch die Arbeit von Asico et al. gestützt, die an D3R-defizienten Mäusen die Entwicklung eines renin-abhängigen Hypertonus nachweisen konnten [Asico et al., 1998]. Eine Bedeutung des D3R für die Hemmung der Reninsekretion war zuvor beschrieben worden und kann dazu herangezogen werden, diese Befunde zu erklären [Sanada et al., 1997].

Für das bereits in den 60er Jahren von Dahl etablierte Modell eines genetisch determinierten salzabhängigen Hypertonus ist bislang die Pathogenese ungeklärt. Dahl war es gelungen, zwei genetisch eng miteinander verwandte Rattenstämme zu züchten, von denen der eine (DAHL-SS) eine vom Salzgehalt der aufgenommenen Nahrung abhängige Hypertonie entwickelt [Dahl, 1961]. Bei diesen Tieren scheint eine Störung der Natriurese vorzuliegen. Funktionelle Untersuchungen mit selektiven D3R-Liganden weisen nun darauf hin, daß ein Defekt im D3R bzw. dessen verminderte Expression mitverantwortlich ist für den Hypertonus der DAHL-SS Tiere [Luippold et al., 2001].

1.2.7 Anatomie des proximalen Tubulus

Im Verlaufe dieser Arbeit erwies sich der proximale Tubulus und dabei vor allem der subapikal im PT gelegene vakuoläre Apparat als besonders interessante Struktur, auf die im Folgenden deshalb besonders eingegangen werden soll. Der PT läßt sich anatomisch in die kortikal gelegene pars convoluta und die über Markstrahlen (medullary rays) in die Medulla absteigende pars recta einteilen. Aufgrund ihrer Ultrastruktur und biochemischer Charakteristika wird eine Unterteilung des PT in drei Segmente (S1-S3) vorgenommen, von denen die ersten beiden die pars convoluta bilden, während die pars recta vorwiegend S3 zugeordnet wird. Während der Übergang von S1 zu S2 durch graduelle Veränderungen in der Zellstruktur erfolgt, findet im Anfangsbereich der pars recta ein abrupter Wechsel von S2 zu S3 Zellen statt. Zellen des S1 sind im Vergleich zu S2 Zellen etwas größer (hochprismatische Zellen), sie interdigitieren stärker miteinander und weisen höhere und dichter stehende Mikrovilli, sowie längere und zahlreichere Mitochondrien auf, wohingegen die Zahl der Lysosomen bei männlichen Ratten (nicht jedoch bei weiblichen !) in S2 höher ist. Der vakuoläre Apparat sowie die Aktivität lysosomaler Proteinasen sind im S1 am ausgeprägtesten und nehmen distalwärts deutlich ab. Zellen des S3 sind cuboid und interdigitieren kaum miteinander, sie besitzen eine geringere Anzahl von Mitochondrien und einen

schwach ausgeprägten vakuolären Apparat, jedoch bei der Ratte höhere Mikrovilli als S1 und S2 [Maunsbach und Christensen, 1992].

1.2.8 Der tubuläre Endocytoseapparat

Ein wichtiger Anteil des endozytotischen Apparates im PT wird von Clathrin-haltigen Strukturen gebildet, die vor allem für die Aufnahme von integralen Membranproteinen wie beispielsweise G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), verantwortlich sind [Kirchhausen 2000].

Das Protein Clathrin liegt in sogenannten coated pits vor, die sich in den Einstülpungen der apikalen Zytoplasmamembran am Fuße der Mikrovilli des Bürstensaumes finden [Rodman et al., 1984]. Ausgehend von diesen coated pits kommt es zur Formation von c.a. 100nm großen Vesikeln (Clathrin coated vesicles, CCV), die von einem regelmäßigen Gerüst aus Clathrin ummantelt sind. Die CCV werden nun in das intrazelluläre endosomale Kompartiment verlagert, wo sie nach Fusion mit Endosomen ihr Clathringerüst verlieren. Clathrin wird zur Plasmamembran zurücktransportiert [Goldstein et al., 1979].

Der „vakuoläre Apparat“ im PT besteht morphologisch betrachtet aus röhrenförmigen Einstülpungen der apikalen Zytoplasmamembran und vesikulären Anteilen mit stark variierendem Durchmesser sowie dichten apikalen Tubuli. Bei den Vesikeln handelt es sich um Endosomen und Vakuolen, die gemeinsam mit den im Zytoplasma verteilten Lysosomen ein saures Kompartiment innerhalb der Tubuluszelle darstellen [Kriz und Kaissling, 1992].

Vielfach wird eine operationale Einteilung in ein frühes und ein spätes endosomales Kompartiment vorgenommen. Das frühe Endosom ist dabei der Ort von Sortierprozessen (sorting endosome), bei denen sich entscheidet, ob ein Protein zur Plasmamembran „recycled“ oder zur Degradation in das späte endosomale Kompartiment weitertransportiert wird. Die Beziehung zwischen frühem und spätem Kompartiment wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren

vertreten die Annahme, daß frühe Endosomen *de novo* aus der Fusion von CCV entstehen und späte Endosomen Residuen dieses frühen Kompartiments darstellen. Eine andere Hypothese zufolge handelt es sich bei den frühen Endosomen um ein stabiles Kompartiment, mit dessen apikaler Seite CCV fusionieren und von basal aus ~0.4 µm große Transportvesikel (ECV) abgeschnürt werden, die Material in das späte Kompartiment transportieren [Clague, 1998]. Die großen Vakuolen des späten Kompartiments können einen Durchmesser von mehr als 1µm erreichen und besitzen, wie oben erwähnt, keinen Clathrin-Mantel [Maunsbach und Christensen, 1992].

1.3. Fragestellungen der Arbeit

Vor den genannten Hintergründen und offenen Fragen sollte in der vorliegenden Arbeit der Dopamin D3-Rezeptor weiter untersucht werden. Im einzelnen sollten die folgenden Fragestellungen geklärt werden:

- 1.) Bestätigung der Existenz des D3R in Nierengewebe verschiedener Rattenspezies mit Hilfe unterschiedlicher anti-D3R Antikörper, erstmalig auch unter Einsatz des anti-D3R-Ak der Arbeitsgruppe um Sokoloff. Vorbedingung hierzu war die Etablierung einer geeigneten Methode der Gewebepräparation für die Immunfluoreszenzdarstellung des empfindlichen Antigens.
- 2.) Strukturelle Zuordnung des dargestellten Fluoreszenzsignals unter Verwendung geeigneter Gegenfärbungen (Adaptin, NHE-3, Aquaporin-2) mit bereits gut dokumentierter renaler Lokalisation.
- 3.) Untersuchung der Abhängigkeit des Vorkommens renaler D3R vom Innervationszustand der Nieren unter Einsatz von Immunfluoreszenz und Radioliganden-Bindungsassay.
- 4.) Semiquantitative Darstellung renaler D3R verschiedener Rattenspezies mit Hilfe des Radioliganden-Bindungsassay.
- 5.) Erstellen von Hypothesen über mögliche funktionelle Bedeutung des D3R in den fluoreszenzmikroskopisch dargestellten Lokalisationen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten, deren Körpergewicht altersabhängig zwischen 160 und 300g variierte.

Genetisch handelte es sich dabei um Tiere der folgenden Stämme:

-Sprague-Dawley	Charles-River, Sulzfeld
-DAHL-SS (kochsalz-sensitiv)	MeB, Ry, Dänemark
-DAHL-SR (kochsalz-resistent)	MeB, Ry, Dänemark

Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 22°C und 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus in Gruppenkäfigen zu durchschnittlich vier Tieren gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter der Marke Altromin®.

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Bovines Serumalbumin	Serva, Heidelberg
BioRad Protein assay	BioRad, München
DAKO-Pen®	DAKO, Glostrup, Dänemark
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
FluorSave® Reagent	Calbiochem, Bad Soden
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glasfaserfilter GF/B	Whatman, Maidstone, GB
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Indikatorpapier pH 6,6 – 8,0	Macherey-Nagel, Düren
2-Propanol (Isopropanol)	Roth, Karlsruhe
2-Methylbutan (Isopentan)	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na-EDTA	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt

NaOH	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Polyethylenimin (PEI)	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfourid (PMSF)	Serva, Heidelberg
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Tissue Tek [®]	Sakura, Zoeterwoude, NL
Trapanal [®] (Thiopental-Natrium)	Byk Gulden, Konstanz
TRIS	Merck, Darmstadt
Triton [®] X-100	Fluka, Neu-Ulm
TWEEN-20	Merck, Darmstadt

2.1.3 Antikörper, direkte Fluoreszenzmarker und Seren

2.1.3.1 Primärantikörper und Kontrollpeptide

-A1: Anti- Dopamin D3-Rezeptor (Ratte) *ADI, San Antonio, TX, USA*

Polyklonaler Antikörper aus der Wirtsspezies Kaninchen, affinitätsgereinigt.

Als Immunisierungspeptid diente ein 19 AS langes Peptid aus der 3. intrazytoplasmatischen Domäne des Dopamin D3-Rezeptors der Ratte. Auch auf schriftliche Nachfrage hin wurde vom Hersteller die Sequenz dieses Peptids nicht näher spezifiziert.

-KP1: Kontrollpeptid D3R *ADI, San Antonio, TX, USA*

-A2: Anti-Dopamin D3-Rezeptor (Mensch?,Ratte?) *Biotrend, Köln*

Polyklonaler Antikörper aus der Wirtsspezies Kaninchen, IgG-Fraktion, lyophilisiert.

Als Immunisierungspeptid diente ein dem aminoterminalen Ende (AS 2-10-Cys) des D3-Rezeptors entsprechender Abschnitt. Die Angaben des Herstellers nahmen lediglich Bezug auf spezifische immunhistochemische Anfärbungen von Neuronen im Hirn der Ratte (und keiner weiteren Spezies), was bei Unklarheit über die Ursprungsspezies der Sequenz zu der Annahme führte, es handle sich um einen Antikörper gegen das Peptid D3R-(2-10-Cys) der Ratte.

-A5: Anti - β_1/β_2 -Adaptin (AP-1/AP-2) *Sigma Chemical, St.Louis, MO, USA*

Monoklonaler Antikörper aus Myelom/Splenozyten-Hybridomzellen der Maus gegen das bovine AP-2 Protein. Kreuzreaktivität mit AP-1/AP-2 der Spezies Ratte.

-A7 : Anti - Na^+/H^+ -Austauscher-3 (NHE-3) *Chemicon, Temecula, CA., USA*

Polyklonaler Antikörper aus der Wirtsspezies Huhn gegen ein 22 AS langes Peptid aus der C-terminalen Domäne des humanen NHE-3 Proteins. Es soll Kreuzreaktivität mit dem NHE-3 von Ratte und Rind bestehen.

-A8 : Anti- Na^+/H^+ -Austauscher-3 (NHE-3) *Biotrend, Köln*

Polyklonaler Antikörper aus der Wirtsspezies Kaninchen gegen ein 22 AS langes Peptid aus der C-terminalen Domäne des humanen NHE-3 Proteins. Angegebene Kreuzreaktivitäten wie A7.

2.1.3.2 Direkte Fluoreszenzmarker

Sytox[®] Green Nucleic Acid Stain *Molecular Probes,
Temecula, CA, USA*

Hochaffiner Farbstoff für Nukleinsäuren toter Zellen mit sehr kräftiger Fluoreszenz bei einem Anregungsoptimum im Bereich des 488 nm- Lasers.

Neurotrace[®] Nissl-Stain dark red *Molecular Probes,
Temecula, CA, USA*

Farbstoff für das rauhe endoplasmatische Retikulum neuronaler Zellen (Nissl Substanz). Anregungsoptimum bei 640 nm.

Alexa[®] Fluor 633 Phalloidin*Molecular Probes, Temecula, CA, USA*

Phallotoxine binden spezifisch an F-Actin, das in der Niere vor allem in den Mikrovilli des Bürstensaumes sowie in der glomerulären mesangialen Matrix vorkommt.

2.1.3.3 Sekundärantikörper**Wirt und Spezifität****Konjugat**

Ziege anti-Kaninchen (go-ra)

AlexaFluor[®] 488

Ziege anti-Maus (go-mo)

Cy[®]-5

Ziege anti-Kaninchen (go-ra)

Cy[®]-5

Ziege anti-Huhn (go-ch)

AlexaFluor[®] 633(AlexaFluor[®] 488 Konjugatantikörper:*Molecular Probes, Temecula, CA, USA*Cy[®]-5 Konjugatantikörper:*Jackson Immuno Research, USA)***2.1.3.4 Normalsera**

Ziegen-Normalserum

Gibco BRL, Eggenstein

Esel-Normalserum

Dianova, Hamburg

2.1.4 Lösungen und Puffer**2.1.4.1 Lösungen und Puffer für Immunfluoreszenzexperimente**TBS Puffer 50 mM TRIS / 150 mM NaCl (pH 7,5)

6,05 g TRIS

8,76 g NaCl

ad 1000 ml aq. bidest.

Titration des pH-Wertes mit HCl 37%

Präinkubationslösung

0,5 ml Normalserum Ziege (5 %)

40 mg Bovines Serumalbumin (0,4 %)

10 mg Gelatine (0,1 %)

10 mg TWEEN-20 (0,1 %)

ad 10 ml TBS 0,05 M

Zunächst Lösen der Gelatine in TBS bei ca. 40°C, Zugabe der restlichen Substanzen erst nach Abkühlung.

Antikörperverdünnungslösung : TBS-NGST20

0,5 ml Normalserum Ziege (5 %)

5 mg TWEEN-20 (0,05 %)

ad 10 ml TBS 0,05 M

Waschlösung : TBS-GT20

200 mg Gelatine (0,1 %)

100 mg TWEEN-20 (0,05 %)

ad 200 ml TBS 0,05 M

2.1.4.2 Lösungen und Puffer für LigandenbindungsexperimenteTHB-Puffer : 25mM TRIS / 40 mM HEPES

6,06 g TRIS

19,06 g HEPES

ad 2000ml aq.bidest.

Homogenisierungspuffer : THB-320 mM Sucrose / 0,5 mM Na-EDTA / 10 µMPMSF

10,95 g Sucrose

19 mg Na-EDTA

ad 100 ml THB

PMSF - Stammlösung 10 mM

1,7 mg PMSF ad 500 µl Isopropanol

Zugabe von 5 µl PMSF Stammlösung je 5 ml Homogenisierungspuffer kurz vor dem Einbringen des zu homogenisierenden Gewebes.

2.1.5 Geräte

Konfokales Laser-scan Mikroskop (cLSM):

Zeiss LSM 410 Invert

Zeiss, Jena

Gefriermikrotom:

Minot IEC custom microtome

Damon IEC, USA

Gewebehomogenisator :

Potter S

Braun, Melsungen

2.2. Methoden

2.2.1 Immunfluoreszenznachweis des Dopamin D3-Rezeptors in Niere und Gehirn verschiedener Rattenstämme

2.2.1.1 Perfusionsfixierung und Organentnahme

Um aus jedem Tier Material sowohl für Western-Blot Experimente (diese konnten wegen Präzipitation des Antikörpers in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet werden) als auch für Immunfluoreszenzfärbungen zu gewinnen, wurde zunächst eine der Nieren entnommen und anschließend die Perfusionsfixierung durchgeführt.

Die Ratten wurden zunächst mit Trapanal® (80mg/kg KG i.p.) in tiefe Narkose versetzt, deren vollständiger Eintritt durch das Erlöschen jeglichen Schmerzreflexes kontrolliert wurde.

Nach Zugang durch einen medianen Bauchdeckenschnitt wurde zunächst die linke Niere dargestellt. Die V. renalis wurde eröffnet und durch leichten Fingerdruck auf Arterie und Nierenparenchym das Organ weitgehend ischämisiert. In diesem Zustand wurde eine Arterienklemme auf die A. renalis gesetzt. Das Organ wurde unter Belassung der Klemme im Tier entnommen und sofort mit einer Rasierklinge makroskopisch in einen vorwiegend medullären und einen kortikalen Anteil getrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung in Western-blot Experimenten wurden die Präparate bei -80°C gelagert.

Der Bauchschnitt wurde nun zum Zwerchfell hin erweitert und dieses entlang der Rippenbögen mit der Schere abgesetzt. Um Herz und Aorta freizulegen wurden nun beidseits die Rippen lateral durchtrennt, die Thoraxwand nach oben geklappt sowie der Thymus entfernt. Mit einer feinen Schere wurde die Herzspitze über dem linken Ventrikel abgeschnitten und das rechte Herz in Höhe des Vorhofs inzidiert um einen Abfluss für Blut und Perfusionslösungen zu ermöglichen. Ein dünner Katheterschlauch wurde über den linken Ventrikel in der Aorta ascendens platziert. Über diesen Katheter wurden nun zunächst 50 ml auf ca. 37°C vorgewärmte isotone NaCl Lösung infundiert, wobei es bei erfolgreicher Perfusion zu einer raschen Entfärbung der Abdominalorgane kam. Es folgten 50-100 ml Paraformaldehydlösung (2%). Die verbliebene Niere wurde entnommen und quer in 3-4 mm dicke Scheiben geschnitten. Zur Entnahme des Gehirns wurde die Kalotte von occipital her mit einer kräftigen Schere eröffnet und ihre parietalen Anteile weitgehend entfernt. Bei der Entnahme wurde besonderes Augenmerk auf die Erhaltung der Abschnitte des frontobasalen Riechhirns gelegt, das durch seine exponierte Lage ansonsten besonders leicht beschädigt wird.

Die Qualität der Perfusionsfixierung ließ sich beim Zerteilen der Organe anhand des Grades der Entblutung einschätzen. Die Organstücke wurden zur Nachfixation für eine Stunde in 2%ige Paraformaldehydlösung eingelegt, danach für 15 min in NaCl oder PBS gespült und schließlich für ca. 12h bei 4°C in 30 %iger Sucroslösung dehydriert [vgl. Pfaff et al., 1999].

2.2.1.2 Renale Denervierung

Zunächst wurden die Versuchstiere durch gewichtsadaptierte intraperitoneale Gabe von Thiopental (Trapanal[®]) in tiefe Narkose versetzt. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einem beheizbaren Op-Tisch fixiert, um eine intraoperative Unterkühlung zu verhindern. Zur Kontrolle der Körpertemperatur wurde eine Temperatursonde rektal eingeführt. Durch Bestreichen des Bauchfelles mit Paraffinöl wurde das Eindringen von Haaren ins Operationsgebiet weitgehend verhindert. Die Bauchhöhle wurde wie oben beschrieben durch einen medianen Schnitt eröffnet und die Eingeweide vorsichtig mit Hilfe von Bauchhaken verlagert. Es folgte die Darstellung der Nierenarterie und die mechanische Entfernung des perivaskulären Bindegewebes unter stereomikroskopischer Sicht. Um die vollständige Unterbrechung verbliebener Nervenfasern sicherzustellen, wurde die freipräparierte Arterie nun mehrmals zirkulär mit 10%iger alkoholischer Phenollösung betupft, durch eine Spülung der Bauchhöhle mit 0,9% NaCl wurden anschliessend verbliebene Phenolreste entfernt. Der Wundverschluß erfolgte in zwei Schichten mit Einzelknopfnähten, wobei Peritoneum, Faszia und Bauchmuskulatur mit resorbierbarem Faden, die Bauchhaut mit Nylonfäden versorgt wurden. Im Falle der „sham-operierten“ Tiere wurde die Niere ebenfalls für einige Minuten freigelegt, an der Arterie jedoch keine Manipulationen vorgenommen [vgl. Mühlbauer et al., 1997c].

2.2.1.3 Einbettung und Anfertigung von Kryostatschnitten

Die dehydrierten Organstücke wurden einzeln in kleine Blöcke aus TissueTek[®] eingebettet und diese anschliessend in kaltem Isopentan und nach Aushärtung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der eingebetteten Organstücke bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -80°C. Mit einem Gefriermikrotom wurden 10 – 16 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen wurden. Nach einer Trocknungszeit von einer Stunde bei RT wurden die Schnitte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Gehirnschnitte wurden unter Orientierung an

einem stereotaktischen Schnittbildatlas des Rattengehirns [Paxinos und Watson, 1997] in sagittalen und coronaren Ebenen geführt. Mit Hilfe der Lichtmikroskopie erfolgte eine orientierende Lokalisation der Schnittebenen.

2.2.1.4 Präinkubation

Nach Auftauen bei RT und Verdunstung des dabei entstandenen Kondenswassers wurde mit Hilfe eines DAKO[®]-Pen eine hydrophobe Barriere um die Schnitte gezogen, um so den Verbrauch von Antikörperlösungen zu minimieren. Nun wurden die Objektträger für 5 min in TBS getaucht, um das anhaftende Tissue-Tek[®] zu entfernen.

Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers sowie eine Bindung an sogenannte „konservierte Sequenzen“ oder Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurden die Schnitte nun für 1 h mit jeweils 100 µl Präinkubationslösung inkubiert. Dabei wurde als blockierendes Agens neben BSA auch Normalserum aus derselben Spezies verwendet, aus der auch die eingesetzten Sekundärantikörper stammten.

[alle Inkubationschritte vgl.: Pfaff et al., 1999; Diaz et al., 2000].

2.2.1.5 Inkubation mit primären Antikörpern

Zur Beendigung der Präinkubation wurde die Präinkubationslösung vom Objektträger abgeschüttelt. Es folgte die Inkubation mit einem oder zwei Primärantikörpern. Die Inkubationszeiten lagen abhängig von eingesetztem Gewebe und Antikörper zwischen 2 und 40 h bei RT, das aufgetragene Volumen von Antikörperlösung betrug 100 µl für jeden Schnitt. Die Endverdünnungen für die einzelnen Antikörper wurden empirisch ermittelt. Alle Inkubationen erfolgten im Dunkeln.

Bei Färbungen mit zwei Primärantikörpern wurden diese so gewählt, daß sie aus verschiedenen Wirtsspezies stammten, um ihre differenzierte Markierung über entsprechende Sekundärantikörper möglich zu machen.

Prinzipiell besteht die Möglichkeit, die Inkubationen mit verschiedenen Primärantikörpern hintereinander oder synchron durchzuführen. Unterschieden sich die für eine Doppelmarkierung gewählten Antikörper stark in den benötigten Inkubationszeiten oder kam es zu störenden Interaktionen (Präzipitation eines Antikörpers) in einer gemischten Antikörperlösung, so wurden die Schnitte zunächst mit dem einen und im Anschluss an eine Zwischenwäsche für 5 min in TBS-GT20 mit dem anderen Primärantikörper inkubiert (Aquaporin 2 und D3R). Wo eine synchrone Inkubation möglich war, wurde ein „Cocktail“ aus Primärantikörpern in den gewünschten Endkonzentrationen verwendet (Adaptin und D3R) [vgl.: Liddell und Weeks, 1996].

Um die Spezifität des anti-D3R-Antikörpers sicherzustellen, wurde die Antikörperlösung mit einem Überschuss des korrespondierenden Peptids (Kontrollpeptid K3) versetzt, was unter der Vorstellung einer Inaktivierung des Antikörpers durch spezifische Bindung an sein Antigen erfolgte. Hierzu wurden ca. 5 mg des Peptids in 500 µl der gebrauchsfertigen Antikörperlösung (Verdünnung der Ak-Stammlösung 1 : 1000 mit TBS-NGST20) gelöst und für 1h bei 4°C vorinkubiert. Es folgte die Inkubation der Schnitte wie oben beschrieben.

2.2.1.6 Inkubation mit sekundären Antikörpern

Nach einer Zwischenwäsche in TBS-GT20 für 4 x 10 min wurden die Kryostatschnitte nun zwischen 30 und 60 min bei RT im Dunkeln mit jeweils 100 µl einer geeigneten Sekundärantikörperlösung inkubiert. Es wurden hierzu fluoreszenzmarkierte Antikörper gewählt, die gegen IgG der Wirtsspezies des eingesetzten Primärantikörpers gerichtet waren. Für die Wahl des geeigneten Präinkubationsserums war die Wirtsspezies dieser Sekundärantikörper entscheidend. So wurde beispielsweise bei Einsatz eines Sekundärantikörpers aus der Spezies Ziege eine Präinkubation mit Ziegen-Normalserum durchgeführt, um auf diese Weise eine eventuelle unspezifische Gewebebindung des Sekundärantikörpers zu vermeiden. Bei Doppelmarkierungen wurden daher

soweit möglich Sekundärantikörper derselben Wirtsspezies gewählt. Um diese optisch voneinander differenzieren zu können, wurden Antikörperkonjugate mit Fluoreszenzstoffen eingesetzt, deren Anregungs- und Emissionsmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen lagen.

Um eine Aussage über die Spezifität der Bindung der verwendeten Sekundärantikörper machen zu können, wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen kein Primärantikörper eingesetzt und stattdessen lediglich mit TBS-NGST20 inkubiert wurde. Die dabei erhaltene Fluoreszenz wurde als unspezifisches Hintergrundsignal gewertet und zur Beurteilung der parallel dazu angefertigten kompletten Färbungen herangezogen. Die Inkubationsprozedur wurde mit einer Wäsche der Objektträger in TBS für 3x 10 min beendet, die Schnitte in noch feuchtem Zustand mit jeweils einem Tropfen FluorSave[®] bedeckt und mit einem Deckglas versiegelt. Nach einer Trocknungszeit von ungefähr 10 min wurden die Objektträger bis zur Betrachtung am cLSM -in der Regel wenige Stunden später- bei -20°C gelagert.

2.2.1.7 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Die fluoreszenzmarkierten Präparate wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskopes (cLSM) ausgewertet, das gegenüber konventionellen Fluoreszenzmikroskopen erhebliche Vorteile bietet. Grundprinzip jeder Fluoreszenztechnik ist die Nutzung von photosensiblen Substanzen (Fluorochrome), welche Licht bestimmter Wellenlänge absorbieren können und energieärmere Lichtquanten emittieren. Bei der Laser-Scan-Mikroskopie handelt es sich um eine Rastertechnik, bei der das Objekt punktwise von einem Laserstrahl abgetastet wird. Das Laserlicht wird über eine feine Öffnung gebündelt und durch ein Objektiv mit hoher Apertur auf das Objekt projiziert. Die vom Objekt ausgehende Strahlung (Laserlicht und Emissionsspektrum des Fluorochroms) wird durch eine hierzu spiegelbildlich angeordnete Optik aufgenommen, so daß die Brennpunkte beider Linsen genau im Objektpunkt zusammenfallen (Konfokalität). Lichtstrahlen, die außerhalb des gemeinsamen

Brennpunktes liegen kommen auf diese Weise nicht zur Darstellung. Diese sind bei nicht-konfokalen Mikroskopen zu einem großen Teil für die Unschärfe verantwortlich. Im cLSM ermöglicht das Prinzip der Konfokalität eine Fokussierung auf Bildpunkte in allen drei Dimensionen des Objekts. Die tatsächliche Dicke des Präparates kann daher bis zu 100 μm betragen, während auf Bildebenen von ca 1 μm Stärke fokussiert werden kann. Bei Immunfluoreszenzmarkierungen stellt allerdings die Eindringtiefe der Antikörper einen limitierenden Faktor für die Dicke des Präparates dar.

Das verwendete cLSM verfügt über drei Laser unterschiedlicher Wellenlänge und ebensoviele Detektoren (Photomultiplier), welche Mehrfachmarkierungen mit maximal drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglichen. Bei diesen Lasern handelt es sich um einen Ar/Kr-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und zwei He/Ne-Laser ($\lambda = 543$ und 633). Außerdem kann eine lichtmikroskopische (Nomarsky) sowie eine fluoreszenzoptische (Na-Lampe) Betrachtung gewählt werden. Die Anregung eines Objektes mit mehreren Lasern kann synchron erfolgen oder nacheinander durchgeführt, und die einzelnen Bilder anschließend überlagert werden. Das vom Objekt emittierte Licht wird entsprechend seiner Wellenlängen aufgetrennt und auf einen Photomultiplier gespiegelt, in dem ein elektrisches Signal generiert wird. Dieses kann nun digital weiterverarbeitet werden.

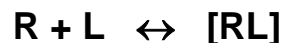
2.2.1.8 Bildbearbeitung

Die im cLSM installierte Software ermöglicht eine Speicherung der gewonnenen Bilder im TIFF-Format. Die so erstellten Dateien können entweder die Information eines einzigen Farbkanals (s/w-Bild) oder die aller drei Farbkanäle (RGB-Bild) enthalten. Ein Grafikbearbeitungsprogramm (z.B. adobe Photoshop 5.0, Adobe Systems, 1998) ermöglicht in letzterem Fall die (Wieder-) Auftrennung eines mehrfarbigen Bildes in seine drei Kanäle, was bei der Untersuchung von Kollokalisierungen von Interesse ist [Pfaff et al., 1999].

2.2.2 Ligandenbindungsexperimente

In einem Bindungsexperiment wird das untersuchte Bindungsprotein mit einem radioaktiven Liganden inkubiert, bis sich ein Gleichgewichtszustand zwischen den Bindungspartnern eingestellt hat.

Dabei folgt die Bindung eines Liganden (L) an einen Rezeptor (R) dem Massenwirkungsgesetz:



Gebundener und ungebundener Anteil des Radioliganden können voneinander getrennt und quantifiziert werden und erlauben Aussagen bezüglich der Qualität der Bindung (Affinität, Spezifität) wie auch der Menge an vorhandenen Bindungsstellen im Reaktionsansatz (B_{max}).

Unter **Affinität** einer Bindung versteht man die Stärke der Interaktion von Ligand und Bindungsstelle. Diese wird quantitativ mit der Dissoziationskonstante K_D erfasst. Beim einfachsten Fall, der Bindung eines Liganden an eine einzige Art von Bindungsstelle, gibt sie diejenige Ligandenkonzentration an, bei der die Hälfte aller Bindungsstellen gesättigt ist, also als Bindungsprotein-Liganden-Komplex vorliegt. Eine Bindung mit einer Dissoziationskonstante $K_D < 10$ nM nennt man hochaffin.

Mit den Erhaltungsgleichungen: $R_o = R + [RL]$; $L_o = L + [RL]$ und $B(ound) = [RL]$ gilt:

$$K_D \cdot B/L = R_o - B$$

Der Begriff **Spezifität** hingegen bedeutet, daß ein Ligand ausschließlich an eine Art von Bindungsstelle bindet. Der Ausdruck beinhaltet keine Aussage bezüglich der Stärke dieser Bindung.

Da Liganden, wenngleich nur mit geringer Affinität, an eine Vielzahl von Bindungsstellen binden können, muß zwischen dieser **unspezifischen**

Bindung und der Bindung an die eigentlich interessierende Bindungsstelle unterschieden werden. Durch Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem („kalten“) Liganden wird der gebundene „heiße“ Ligand aus den höher affinen Bindungsstellen, deren Anzahl im Ansatz begrenzt ist, verdrängt (**sättigbare Bindung**), nicht jedoch der unspezifisch gebundene, da bei der großen Zahl dieser unspezifischen Bindungsstelle keine Sättigung der Bindung auftritt.

Um eine quantitative Aussage über die in einem Reaktionsansatz enthaltene Menge an Bindungsprotein machen zu können, kann man die maximal erreichbare Konzentration an sättigbar gebundenem Liganden als Annäherungswert (**B_{max}**) bestimmen.

Das Bindungsverhalten von Ligand und Bindungsprotein hängt von diversen Milieubedingungen ab. Neben den physikalischen Parametern Zeit, Temperatur und Lichtbedingungen spielen chemische Größen wie pH-Wert, Konzentrationen einzelner Ionen sowie Osmolalität der Reaktionslösung, die Anwesenheit organischer Kofaktoren der Bindung (zB. GTP) oder Antioxidantien etc. eine Rolle.

2.2.2.1 Organentnahme und Isolation von Zellmembranen

Nach Tötung der Tiere durch Genickbruch und anschließender Dekapitation wurden beide Nieren sowie das Gehirn rasch entfernt und in eisgekühlte isotone Kochsalzlösung eingebracht. Nach Entfernung von Nierenkapsel und Fettgewebe wurden die Organe gewogen, anschließend in drei bis fünf Stücke zerteilt und dabei, soweit makroskopisch erfaßbar, ein Großteil des Kelchsystems abgetrennt. Die Stücke aus einer Niere wurden nun in jeweils 5 ml Homogenisierungspuffer unter Zusatz von 5 µl einer frisch angesetzten PMSF-Stammlösung als Proteaseninhibitor homogenisiert. Dies erfolgte mechanisch mittels eines PotterS (Braun, Melsungen) bei 1200 U/min und für die Dauer von 4 mal 10 Sekunden im Eisbett. Die erhaltenen Homogenate wurden nun bei ca. 1000x g (3040 rpm) und 4°C für 15 min zentrifugiert.

Nachdem in orientierenden Versuchen festgestellt worden war, daß auf diese Weise eine höhere Membranausbeute erreicht werden konnte, wurde der

erhaltene Überstand nun verworfen, das Sediment in 5 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Bedingungen für diese zweite Zentrifugation waren mit denen der ersten identisch. Der aus der zweiten Zentrifugation hervorgegangene Überstand wurde nun für 36 min bei 4°C ultrazentrifugiert. (Ultrazentrifuge, Beckman, 100 000 x g (39200 rpm), um so bisher noch in Suspension befindliche Membranstücke zu sedimentieren. Das auf diesem Wege aus einem Organ gewonnene „Pellet“ wurde unter Zugabe von 5 µl PMSF-Stammlösung in THB resuspendiert, zu 500 µl aliquotiert und bis zur schließlichen Verwendung in Bindungsexperimenten bei -80°C gelagert. Es wurden aus jedem Membranpräparat 100 µl für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach *Bradford* (s.u.) entnommen.

2.2.2.2 Proteinquantifizierung nach Bradford

Geht der Farbstoff Coomassie brilliant blue G-250 eine Bindung mit Proteinen ein, so verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Die Bestimmung der Zunahme des Extinktionswertes bei $\lambda=595$ nm nach Vermischen mit einer Proteinprobe ist also ein Maß für deren Proteinkonzentration [Bradford, 1976].

Zur exakten Quantifizierung des Proteingehaltes der Membranpräparationen wurde eine Standardverdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt, die 0, 10, 30, 50, 80, 100, 150 und 200 µg Protein/ml enthielt.

Die zu untersuchenden Proben wurden im Verhältnis 1:10; 1:50; 1:100 und 1:500 mit aq. bidest. verdünnt. Ein Volumen von 100 µl aller Standardverdünnungen und verdünnter Proben wurde mit 900 µl Coomassie-Reagenz vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Aus diesen Ansätzen wurden nun je 200 µl in eine Microtiterplatte überführt und photometrisch ausgewertet.

2.2.2.3 Reaktionsansatz für Sättigungsexperimente

Das im folgenden beschriebene Experiment zur Ermittlung der Gesamtkonzentration von Ligandenbindungsstellen in einer Membranpräparation (konzentrationsabhängige Sättigung) baut auf einer vorausgegangenen Rezeptorbindungsstudie mit [³H]-7-OH-DPAT (im folgenden [³H]-DPAT) auf, in der das Bindungsverhalten des Radioliganden bereits eingehend charakterisiert wurde [Luippold et al., 2001].

Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Bindung (on-Kinetik, Assoziation) ergab dabei ein Erreichen des Bindungsgleichgewichtes bei RT nach spätestens einer Stunde. Dies gilt für die Inkubation im praktisch ionenfreien Milieu, wie es durch Verwendung von TRIS und HEPES als Puffersubstanzen, sowie den Einsatz von EDTA bei der Membranpräparation erzeugt wird. Für diese Versuchsbedingungen wurde eine Affinitätskonstante von $K_D < 10 \text{ nM}$ bestimmt, es handelt sich also um eine hochaffine Bindung. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit „kaltem“ 7-OH-DPAT in 1000-fachem Überschuß im Bereich des K_D , d.h. einer Konzentration von 10 mM an 7-OH-DPAT. Die Reaktionsansätze zu den Sättigungsexperimenten wurden jeweils in doppelter Ausführung in 1,5 ml Eppendorfgefäßen angesetzt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 300 µl. In fester Reihenfolge wurde zunächst THB vorgelegt, „heißer“ Ligand, dann „kalter“ Ligand (in den Ansätzen zur Bestimmung der unspezifischen Bindung) und schließlich das Protein zugegeben. Um die gewünschte Endkonzentration des heißen Liganden im Ansatz zu erlangen, wurde von diesem zunächst eine konzentrierte Stammlösung (100 – 120 nM) angesetzt. Zur Ermittlung der sättigbaren Bindung wurden aufsteigende Konzentrationen von [³H]-DPAT in einem Bereich von 0,5- 50 nM eingesetzt, innerhalb dieses Bereiches wurden 6-8 Messpunkte bestimmt. Um Protein einzusparen genügte es, die unspezifische Bindung anhand von nur vier Meßpunkten zu bestimmen. Aus einer Stammlösung des „kalten“ Liganden ($c=100 \mu\text{M}$) wurde ein Volumen von 30 µl zu diesen Ansätzen zugegeben. Der Überschuß von „kaltem“ gegenüber „heißem“ Liganden war mit einer Konzentration von 10 µM also 1000fach bei K_D und noch 200fach bei

einer Konzentration von 50nM [³H]-DPAT. Jedem Ansatz wurden schließlich 100 µg (100 µl bei c[1mg/ml]) Membranprotein zugesetzt und damit die Bindungsreaktion gestartet. Nach einstündiger Inkubation bei RT und unter Abdunkelung erfolgte die Auftrennung des Gemisches durch Filtration [Protokoll nach M. Mai, in : Luippold et al., 2001].

2.2.2.4 Auftrennung des Reaktionsgemisches nach der Filtrationsmethode

Ziel des Bindungstests ist die Bestimmung der Menge des Radioliganden, die im Reaktionsansatz gebunden wurde. Hierzu muß der nicht-gebunden vorliegende Anteil des Liganden aus dem Gemisch entfernt werden. Da die physikalischen Unterschiede zwischen Membranbruchstücken (die aufgrund ihres Doppellipidcharakters in der Suspension als Vesikel vorliegen) und dem Radioliganden groß genug sind, kann diese Auftrennung mit Hilfe eines Filtrationsverfahrens erreicht werden. Die hierzu verwendete Filtrationsapparatur nach Osswald und Breidbach ermöglicht ein Absaugen von Einzelproben durch Glasfaserfilter hindurch. Eine Vakuumpumpe sorgt dabei für den konstanten Unterdruck, während eine Steuerungseinheit die Dauer des Absaugvorganges regelt, was für eine reproduzierbare Filtration nötig ist.

Um eine möglichst geringe Filterbindung des freien Liganden bei vollständiger Retention der membranständigen Rezeptor-Liganden-Komplexe zu erreichen, wurden die verwendeten Glasfaserfilter ungefähr 30 min lang in 0,3% Polyethylenimin (PEI) eingelegt. Diese Behandlung bewirkt zum einen eine weitere Verdichtung des Filters zum anderen dessen positive Ladung, die für die Bindung vorwiegend negativ geladener Membranfragmente und die Abstoßung des positiv geladenen Radioliganden von Vorteil ist. Die Absaugung erfolgte nach Erreichen der Sättigung durch Auftrag eines Volumens von 250 µl aus jedem Reaktionsansatz auf das Filter unter Spülung mit 2 x 4 ml kaltem TBS Puffer.

2.2.2.5 Bestimmung der gebundenen Aktivität

Nach dem Absaugen der Proben wurden die Filter in Meßgefäße eingelegt und mit jeweils 3 ml Szintillationsflüssigkeit bedeckt. Die Gefäße wurden verschlossen und kräftig geschüttelt, um die Äquilibration der beiden Medien im Gefäß zu beschleunigen. Zur Kontrolle der eingesetzten Menge an Radioaktivität wurden aus dem Restvolumen von 50 µl das von jedem Ansatz verblieben war, 30 µl entnommen und zusammen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit direkt in ein Zählgefäß pipettiert. Die Genauigkeit dieser Kontrollen ließ sich durch Eintrag der Probe in die vorgelegte Szintillationsflüssigkeit und kräftiges Schütteln optimieren.

Die Proben wurden nun im β-Szintillationszähler für die Dauer von je 5 min gemessen, wobei die Lichtimpulse gezählt werden, die in der Szintillationsflüssigkeit durch Einwirkung von β-Teilchen entstehen. Die gemessene Aktivität wird vom Zähler in dpm (disintegrations per minute; 60 dpm = 1 dps = 1 Bequerel) angegeben. Da die spezifische Aktivität des Radioliganden bekannt ist, kann aus diesem Zählwert die gebunden Menge des Liganden errechnet werden. Wenn von einer Bindungsstelle pro Rezeptormolekül ausgegangen wird, entspricht diese Zahl also der Konzentration der besetzten Bindungsstellen im Ansatz. Diese wird als Stoffmenge in Bezug zur eingesetzten Masse von Protein gesetzt [fmol/mg_{Protein}].

Rechenbeispiel für batch # 47 von ³H-7-OH-DPAT :

spezifische Aktivität = 5,88 TBq/mmol = 5,88 Bq/fmol = 353 dpm/fmol

m_{Protein} = 83 µg (da nur 250 µl entnommen)

Messwert = y [dpm/ 83µg_{Prot}]

$$\mathbf{C}_{\text{Bindungsstellen}} = \frac{\mathbf{y \text{ dpm}} \cdot \mathbf{fmol}}{\mathbf{83\mu g_{Prot}} \cdot \mathbf{353 \text{ dpm}}} = \frac{\mathbf{y \text{ fmol}}}{\mathbf{29299 \mu g_{Prot}}} = \frac{\mathbf{y \text{ fmol}}}{\mathbf{29,3 \text{ mg}_{Prot}}}$$

2.2.2.6 Auswertung der Bindungsdaten

Die einfachste und anschaulichste Art, ein Sättigungsexperiment grafisch darzustellen, erfolgt durch Auftrag der gemessenen proteingebundenen Aktivität gegen die Konzentration des eingesetzten Radioliganden. Man erhält dabei für die Gesamtbindung eine stetig steigende Kurve, die einer zusammengesetzten Funktion mit einem linearen und einem asymptotisch hyperbolen Anteil entspricht. Die nicht-sättigbare „unspezifische“ Bindung stellt darin die lineare Komponente. Subtrahiert man die unspezifische von der Gesamtbindung, so erhält man die „sättigbare“ Bindung, die bei dem beschriebenen Bindungstyp der Funktion nach Michaelis-Menten folgt. Der asymptotisch angenäherte Grenzwert dieser Funktion entspricht der Gesamtzahl der im Ansatz vorhandenen Bindungsstellen B_{\max} .

Die Affinitätskonstante K_D entspricht der Konzentration des Radioliganden bei $y = \frac{1}{2} B_{\max}$.

Zur exakten Ermittlung des B_{\max} können die Bindungsdaten als SCATCHARD-Plot aufgetragen werden. Diese Darstellung gibt genauere Hinweise auf die Art der Bindung und die Anzahl der Bindungsstellen. Eine einfache Bindung kommt im SCATCHARD-Plot als Gerade mit negativer Steigung zur Darstellung (Grafiken siehe Ergebnisteil, S. 60).

Die Achsenabschnitte des SCATCHARD-Plots sind definiert als:

$$x = B \quad \text{und} \quad y = B/L$$

nach Gleichung 2 ergibt sich für die Schnittpunkte der Geraden mit den Achsen:

$$\text{für } B/L = 0 \quad \rightarrow \quad B = R_0$$

$$\text{für } B = 0 \quad \rightarrow \quad B/L = R_0/K_D .$$

3. Ergebnisse

3.1 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

3.1.1 Nachweis cerebraler D3R der Ratte

Bei Nagern findet sich die höchste Dichte von D3R in frontobasalen Kerngebieten des limbischen Systems. Von diesen sind die *Islands of Calleja* (*Ic*) zum einen aufgrund ihrer starken D3R-Expression in Verbindung mit einer nur geringen Dichte an anderen D2-like Rezeptoren, zum anderen wegen ihrer klar vom umgebenden Hirngewebe abgrenzbaren Struktur besonders als Positivkontrolle für IF-Untersuchungen des D3R geeignet.

Mit Hilfe einer kräftigen Kernfärbung (Abb.4) gelang es sicher, die für die *Islands of Calleja* charakteristischen Neurone zu identifizieren. Es handelt sich hierbei um dicht gepackte kleine Granula-Neurone mit wenig Zytoplasma. Die Lokalisation des D3R konnte anschließend an benachbarten Schnittebenen untersucht werden. Eine orientierende Identifikation der Schnittebene erfolgte durch Vergleich auch am ungefärbten Präparat erkennbarer Strukturen mit dem Schnittbildatlas von Paxinos und Watson (Abb.1).

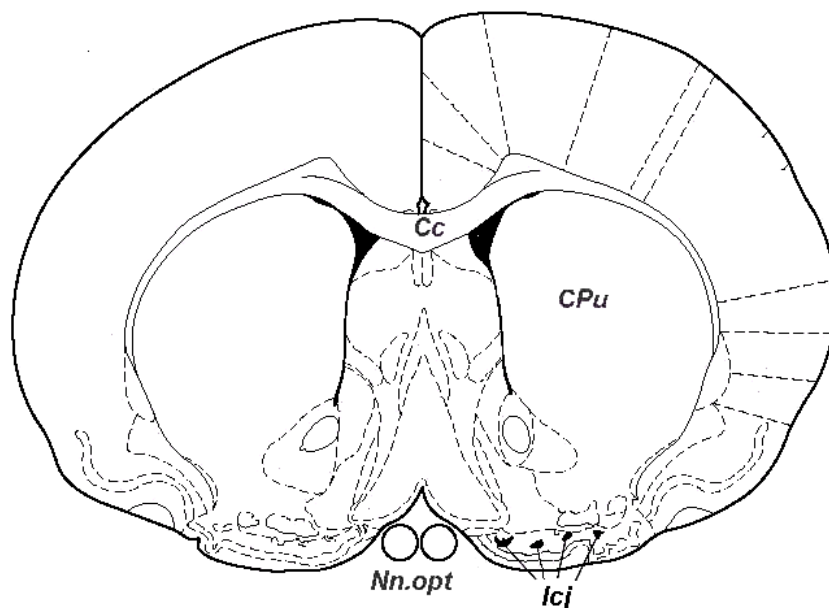


Abb. 3 Coronarer Schnitt durch das Vorderhirn der Ratte. (Stereotaktische Lokalisation: bregma 0,48 mm, interaural 9.48 mm). Korrespondierende Ebene zu Abb. 2. Ic: Islands of Calleja; CPU: Caudate putamen; Cc: Corpus callosum. Abb. nach: [Paxinos und Watson, 1997].

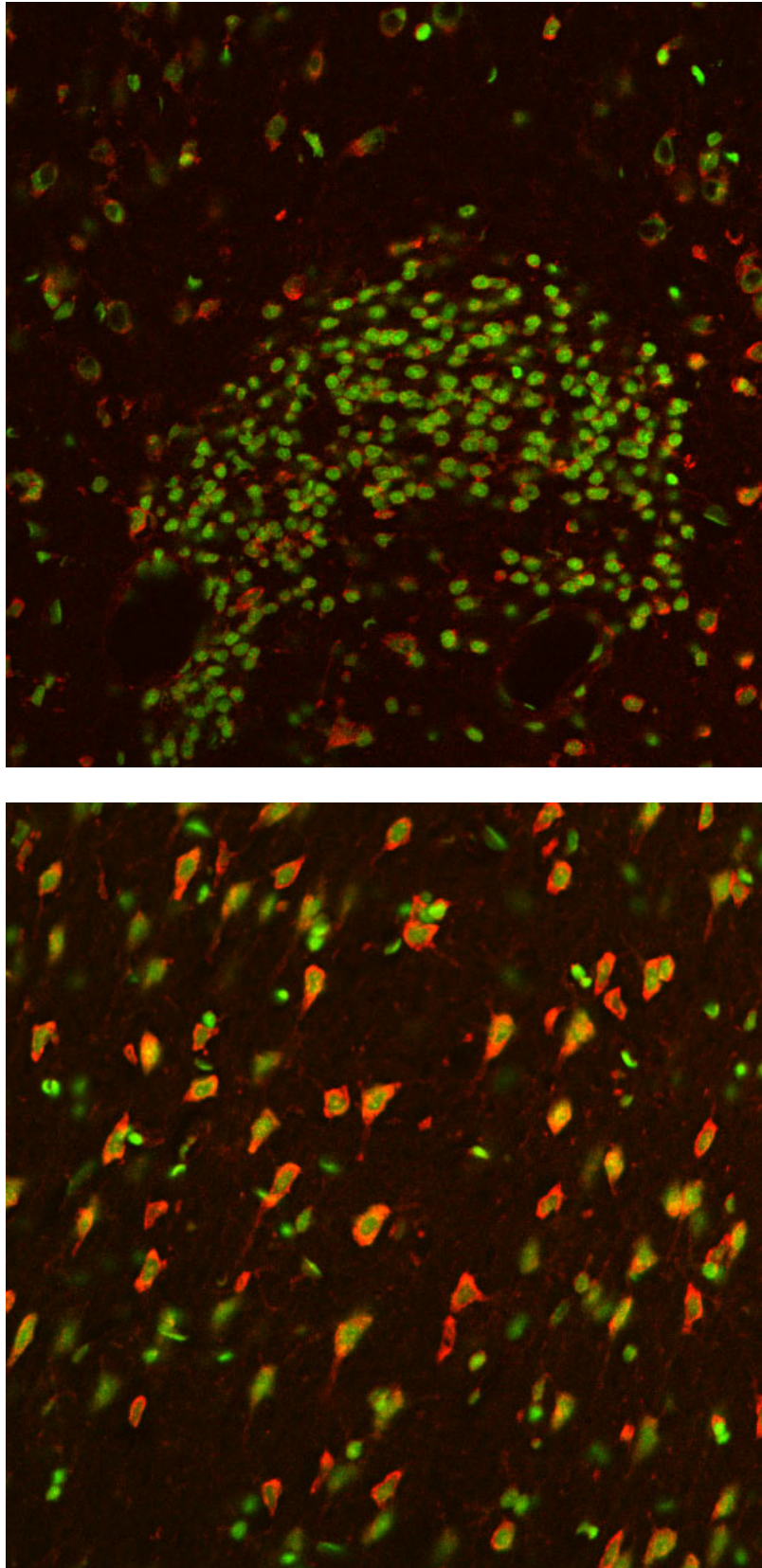


Abb.4 Darstellung von Neuronen mit direkter Immunfluoreszenz. Doppelmarkierung von Nissl-Substanz (rot) und Zellkernen (grün) A.: Coronar angeschnittene *Island of Calleja*. B.: Kortikale Pyramidenzellen erscheinen in derselben Darstellung reicher an Nissl-Substanz.

Das erhaltene anti-D3R Fluoreszenzsignal im Bereich der *Icj* kann auch bei stärkster Vergrößerung keiner klaren zellulären Lokalisation zugeordnet werden, es scheint vielmehr einer diffusen extrazellulären Anfärbung zu entsprechen. Eine punktförmige membranständige Fluoreszenz, wie sie von Diaz et al. mit diesem Antikörper gezeigt wurde, konnte nicht reproduziert werden. Die Inkubation aller Hirnschnitte mit anti-D3R erfolgte entsprechend dem Protokoll von Diaz et al. (2000) für die Dauer von 40h bei RT im Dunkeln. Die Konzentration des anti-D3R-Ak war [1:1000], als Sekundärantikörper kam Alexa[®]Fluor 488 markiertes goat-anti-rabbit IgG [1:200] zur Anwendung. Die Darstellung von Zellkernen wurde durch 20 minütige Inkubation mit Sytox[®] 488 in einer Endverdünnung von [1:50 000] erreicht. Eine Doppelmarkierung von Zellkernen und D3R war aufgrund des gemeinsamen Anregungsmaximums von Sytox[®] und des mit Alexa[®]488 markierten Sekundärantikörpers nicht möglich. Auch in anderen Hirnregionen konnte mit diesem Protokoll eine Anfärbung erzielt werden. Diese beschränkte sich jedoch auf die Kerne von Neuronen und war relativ ubiquitär, so daß von einer unspezifischen Bindung an Kernstrukturen ausgegangen wurde.

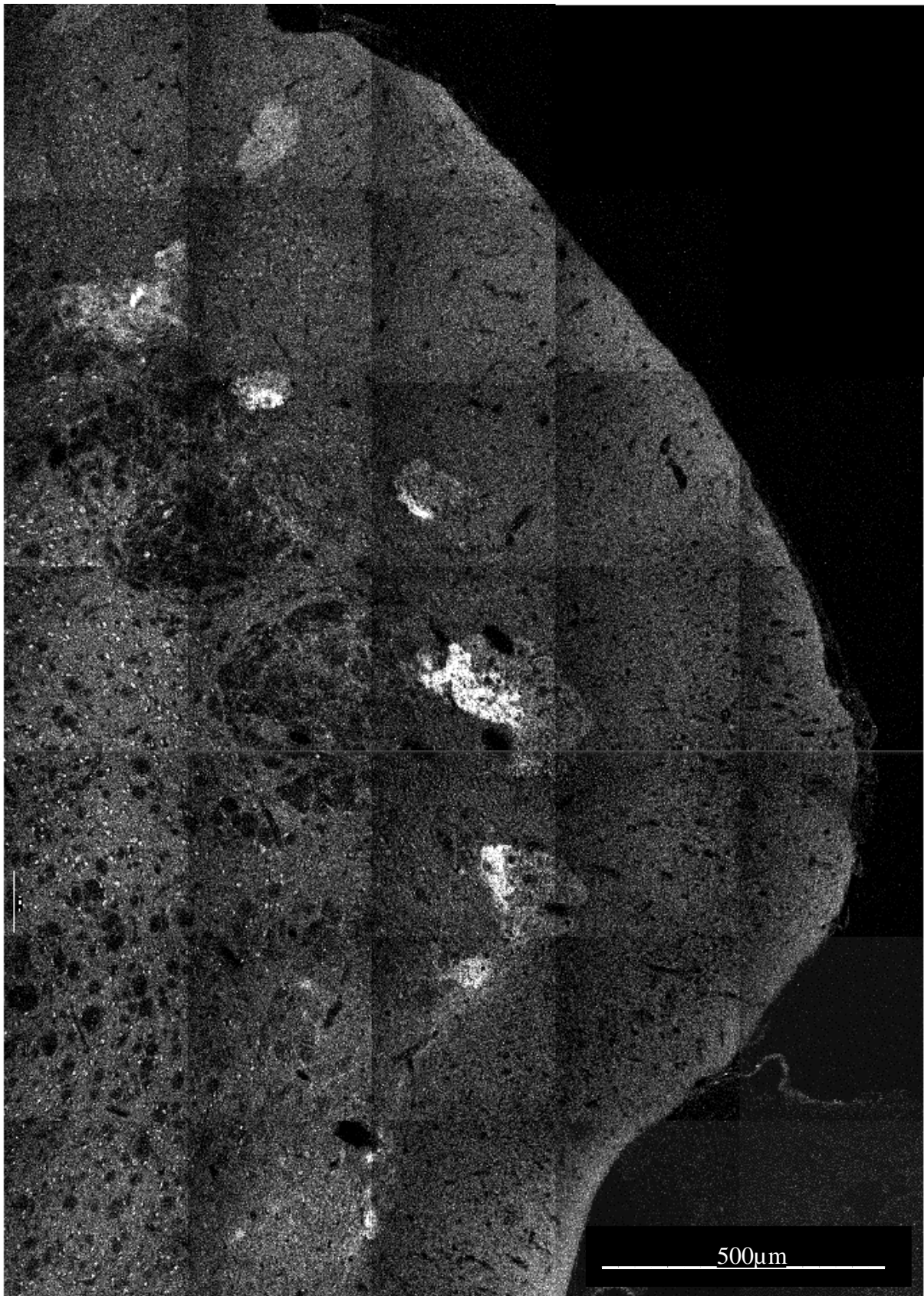


Abb. 5 Coronarschnitt durch das basale Vorderhirn einer SD-Ratte. D3R-Immunfluoreszenz in der Hilusregion quer getroffener *Islands of Calleja*. Montage aus 32 Einzelbildern zur Übersicht über die Hirnbasis.

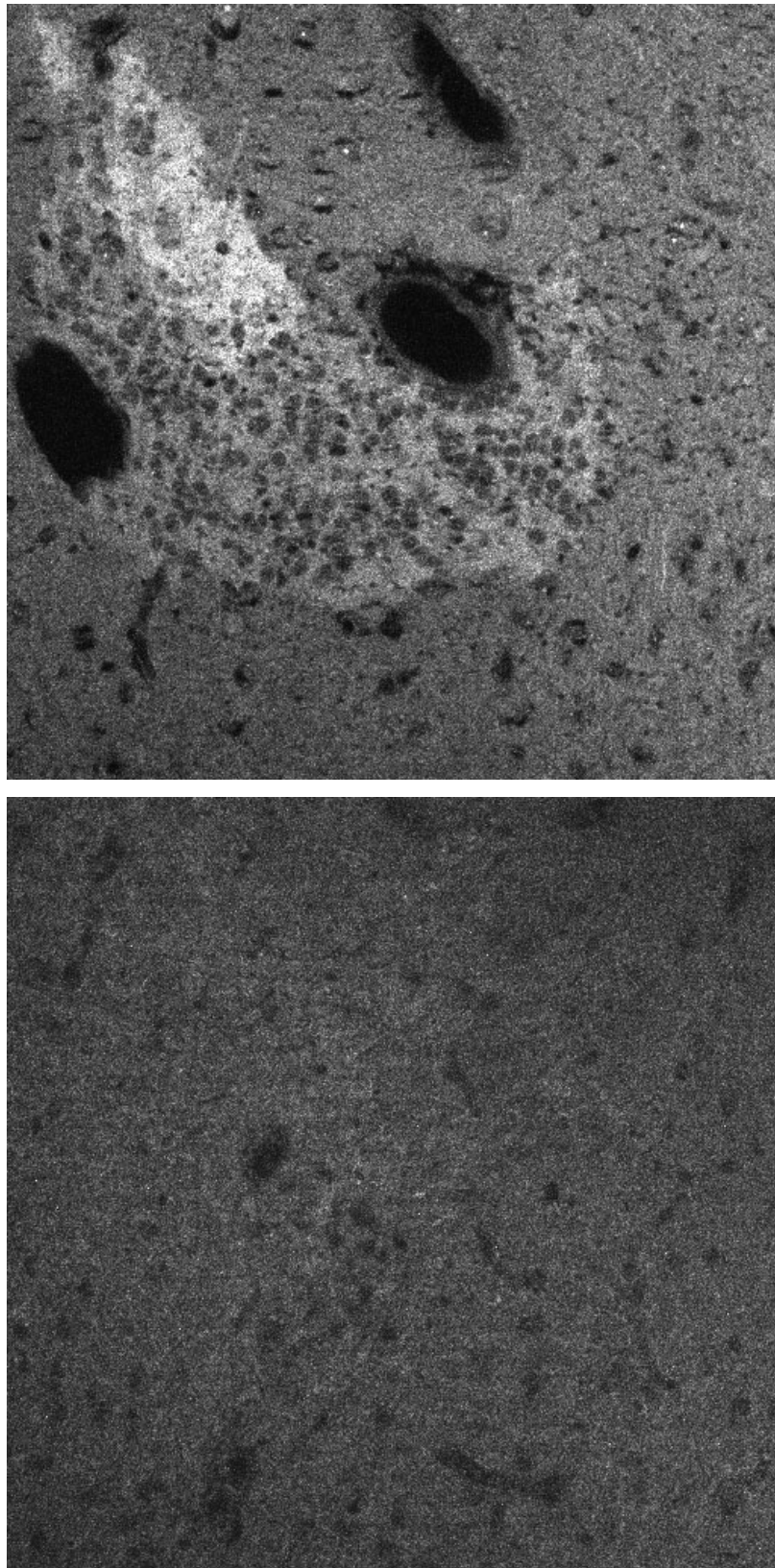


Abb. 6 Coronar angeschnittene *Island of Calleja (Icj)* in aufeinanderfolgenden Schnitten. A.: Anti-D3R Immunfluoreszenz in der hilären Region der *Icj*, die keiner klaren zellulären Lokalisation zuzuordnen ist. B: Negativkontrolle: Verfahren wie in A. nach Präabsorption des anti-D3R-Ak mit seinem Kontrollpeptid.

3.1.2 Nachweis renaler D3R bei verschiedenen Rattenstämmen

Nach der erfolgreichen Darstellung cerebraler D3R wurde unter Beibehaltung des Inkubationsprotokolls eine Untersuchung der renalen Lokalisation dieses Rezeptors durchgeführt. Neben SD-Ratten wurden dabei auch DAHL-SS und DAHL-SR Tiere sowie WKY-Ratten untersucht und ein Augenmerk auf eventuelle Unterschiede in der Expression des D3R zwischen diesen Stämmen gerichtet.

Die systematische Untersuchung des erhaltenen Fluoreszenzsignals durch Vergleich mit Negativkontrollen ergab ein stabil reproduzierbares Signal bei allen genannten Rattenstämmen, das bei Abwesenheit des Primärantikörpers im Inkubationsansatz oder nach dessen Vorinkubation mit seinem Kontrollpeptid vollständig ausblieb.

Es handelt sich hierbei um eine auf den PT konzentrierte Fluoreszenz, die sich regelmäßig in dessen S1 und S2 Abschnitten findet, wobei allerdings wegen Schwierigkeiten bei dessen anatomischer Abgrenzung eine eindeutige Aussage über den S3 Abschnitt nicht gemacht werden konnte.

Daneben fand sich eine geringe punktförmige Fluoreszenz, die Podozyten oder Zellen des glomerulären Mesangiums zuzuschreiben war, die jedoch deutlich zwischen einzelnen Versuchen variierte und teilweise gänzlich ausblieb.

Die erhaltene D3R-Fluoreszenz war sowohl in kortikalen als auch juxtaglomerulären Nephronen detektierbar, jedoch variierte der Anteil markierter Nephrone von Schnitt zu Schnitt deutlich und lag grob geschätzt zwischen 10 und 80%. Da keine eindeutigen Speziesunterschiede festgestellt werden konnten, wurde eine Variation in der Qualität der Gewebepräparation für dieses Phänomen verantwortlich gemacht. Einen Hinweis hierauf gab die Beobachtung, dass in eindeutig schlecht perfundierten Bereichen innerhalb eines Schnittes, wie sie durch die Anwesenheit von Erythrozyten identifiziert werden konnten, ein Fluoreszenzsignal stets ausblieb.

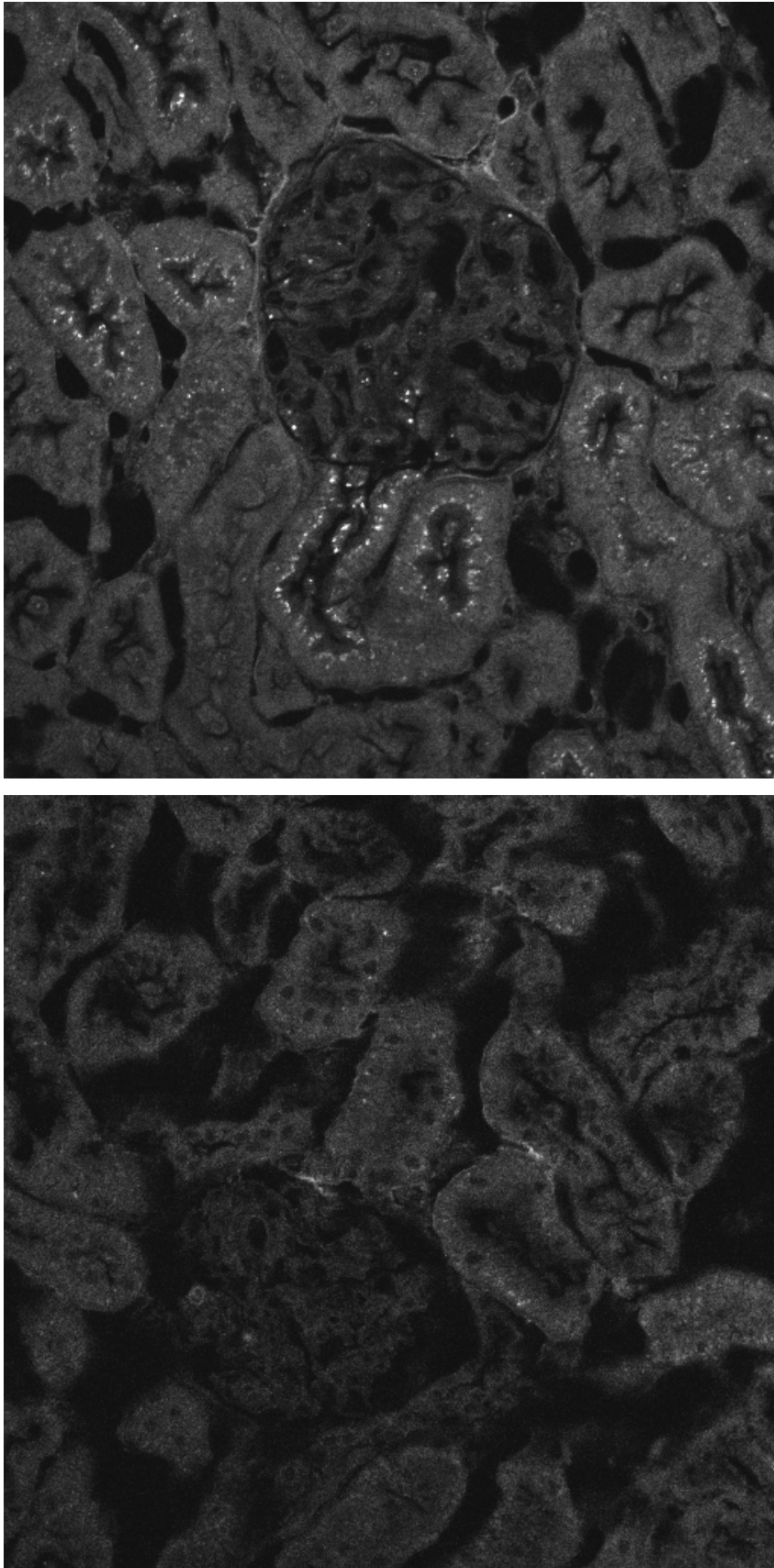


Abb. 7 Renaler Kortex der SD-Ratte. Anti-D3R (18h) A.: Punktförmige tubuläre Markierung in Abschnitten des PT sowie innerhalb eines Glomerulums. B.: Die Präinkubationskontrolle zeigt ein vollständiges Ausbleiben des Fluoreszenzsignals.

Das beschriebene subapikal gelegene Signal konnte bei allen untersuchten Rattenstämmen detektiert werden. Es fielen dabei keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen den Spezies auf. Ein Quantifizierungsversuch wurde nicht unternommen, da die Variation der Ergebnisse zwischen einzelnen Organen aus einer Spezies teilweise ausgeprägter waren als im Speziesvergleich, was auf die erwähnten Unterschiede bei der Gewebepfusion zurückgeführt wurde. Eine etwaige D3R-Defizienz bei DAHL-SS Tieren konnte somit mit dieser Methodik nicht bestätigt werden.

Das betreffende Fluoreszenzsignal ist direkt unterhalb des Bürstensaumes am apikalen Zellpol lokalisiert und reicht nur selten tiefer als $\sim 3 \mu\text{m}$ ins Zytosol hinein. Bürstensäume sowie der basolaterale Zellpol färben sich nicht an. Das Signal besitzt einen punktförmigen Charakter, was darauf hinweist, daß es sich hierbei um die Anfärbung eines vesikulären Kompartiments handelt.

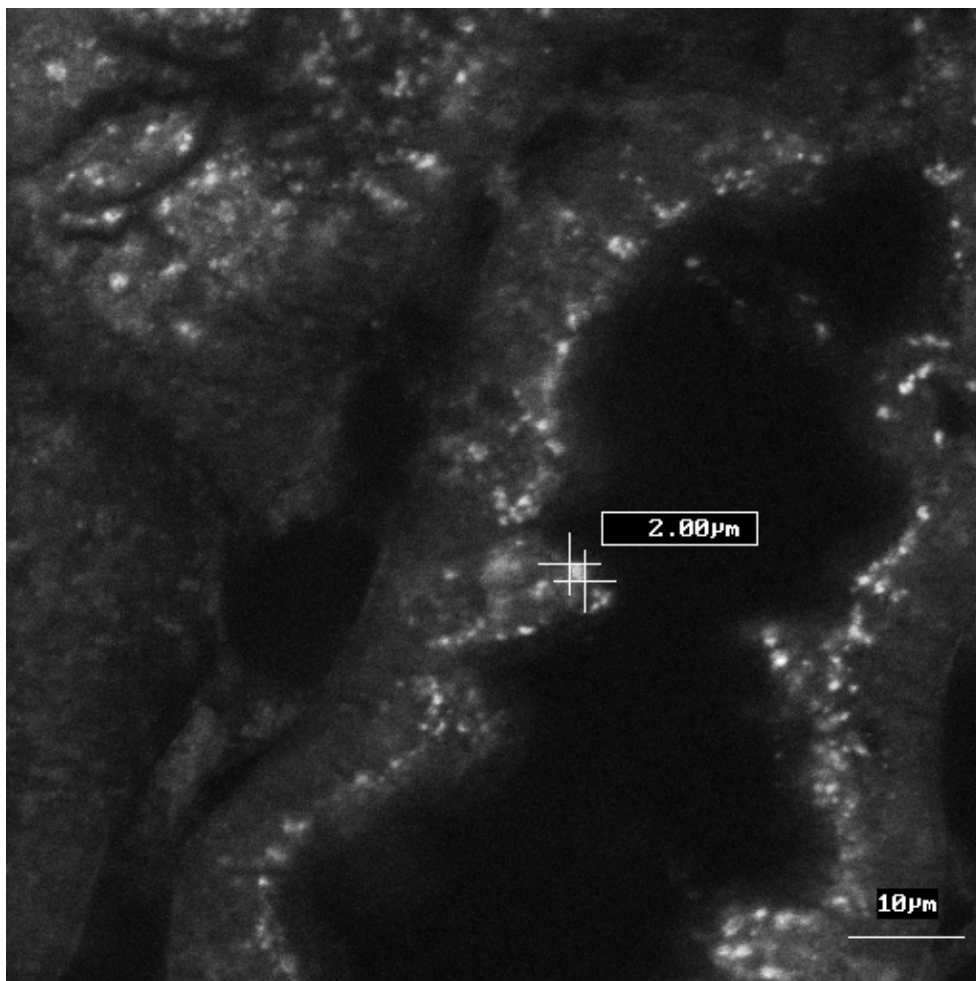


Abb. 8 Renaler Kortex der DAHL-SS Ratte. Proximaler Tubulus (S2). Anti-D3R-Ak; Alexa[®]green 488nm. Regelmäßig unterhalb des Bürstensaumes angeordnete Fluoreszenz mit punktförmigem Erscheinungsbild. (630fach x Zoom 3 ; Öl.)

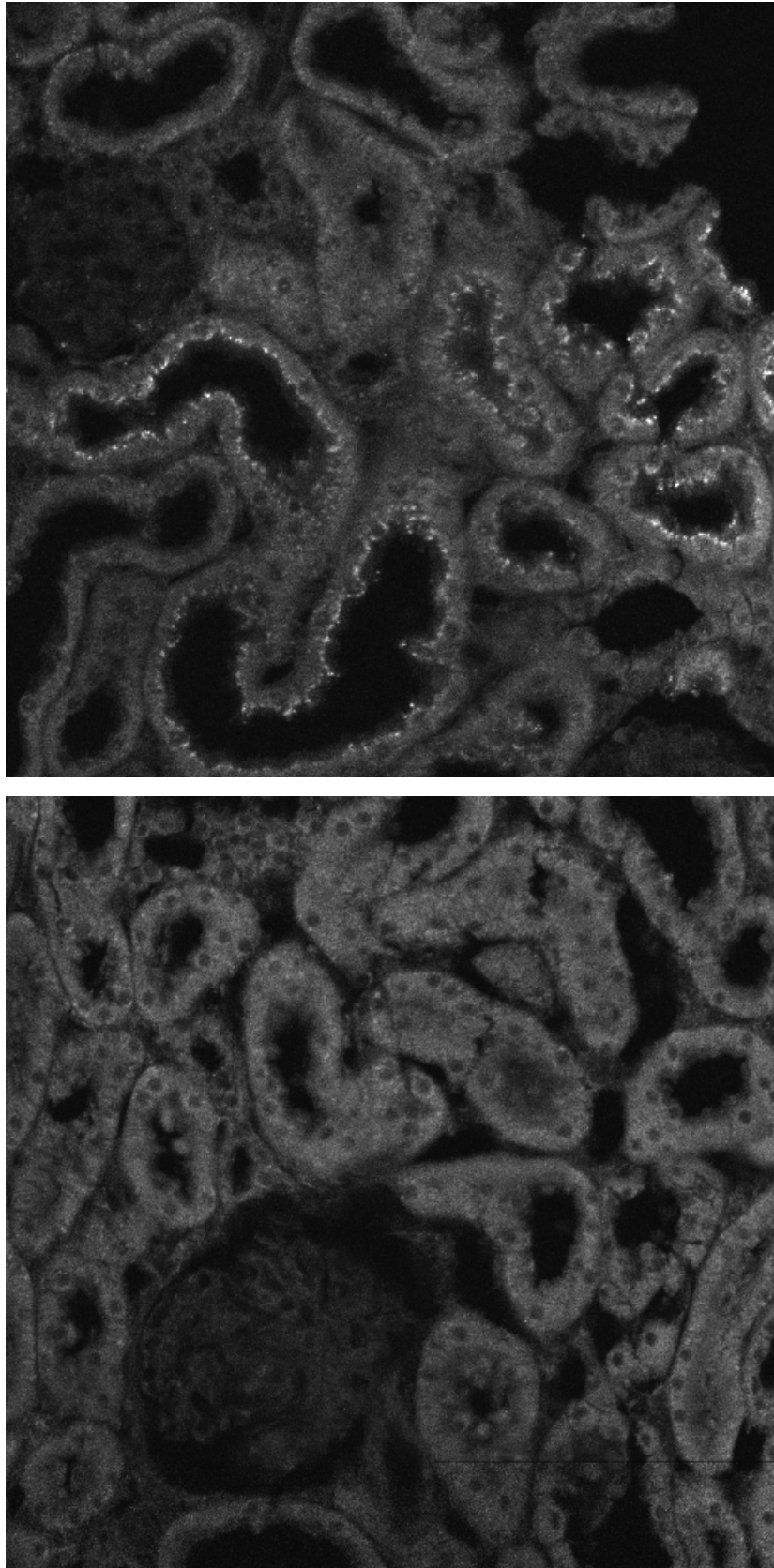


Abb. 9 Renaler Kortex der DAHL-SR Ratte. A.: Inkubationsbedingungen wie in Abb 6. D3R-Signal in S1 und S2 des PT. Glomerulum und Macula densa zeigen keine Anfärbung. B.: Präabsorptionskontrolle zeigt kein Fluoreszenzsignal.

3.1.2.1 Auswirkung chronisch renaler Denervation

In-vivo Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe begründeten die Hypothese, daß sich eine chronische Denervation auf die Dichte renaler D3R auswirkt.

Der Einfluss einer chronischen renalen Denervation (8 Tage post DNX) auf die oben beschriebene anti-D3R Fluoreszenz wurde an Gefrierschnitten einseitig denervierter SD-Ratten untersucht, die nach dem Standardinkubationsprotokoll für anti-D3R-Ak behandelt wurden. Dabei wurden jeweils die Ergebnisse aus einer denervierten Niere mit denen der kontralateralen, innervierten verglichen.

Die vesikulär strukturierte Fluoreszenz im PT findet sich dabei in beiden Gruppen in vergleichbarer Intensität, was im Gegensatz zur genannten Hypothese eine Unabhängigkeit des D3R -zumindest in seiner mit der hier eingesetzten Methodik nachgewiesenen Lokalisation- von der renalen Innervation nahelegt.

Eine genauere Quantifizierung eventueller Unterschiede der Rezeptordichte ist aufgrund möglicher Unterschiede bei der Perfusion jedoch kaum möglich.

Abb. 10 zeigt exemplarische Ergebnisse aus denervierten Nieren, die Befunde der kontralateralen Seite entsprechen den oben gezeigten.

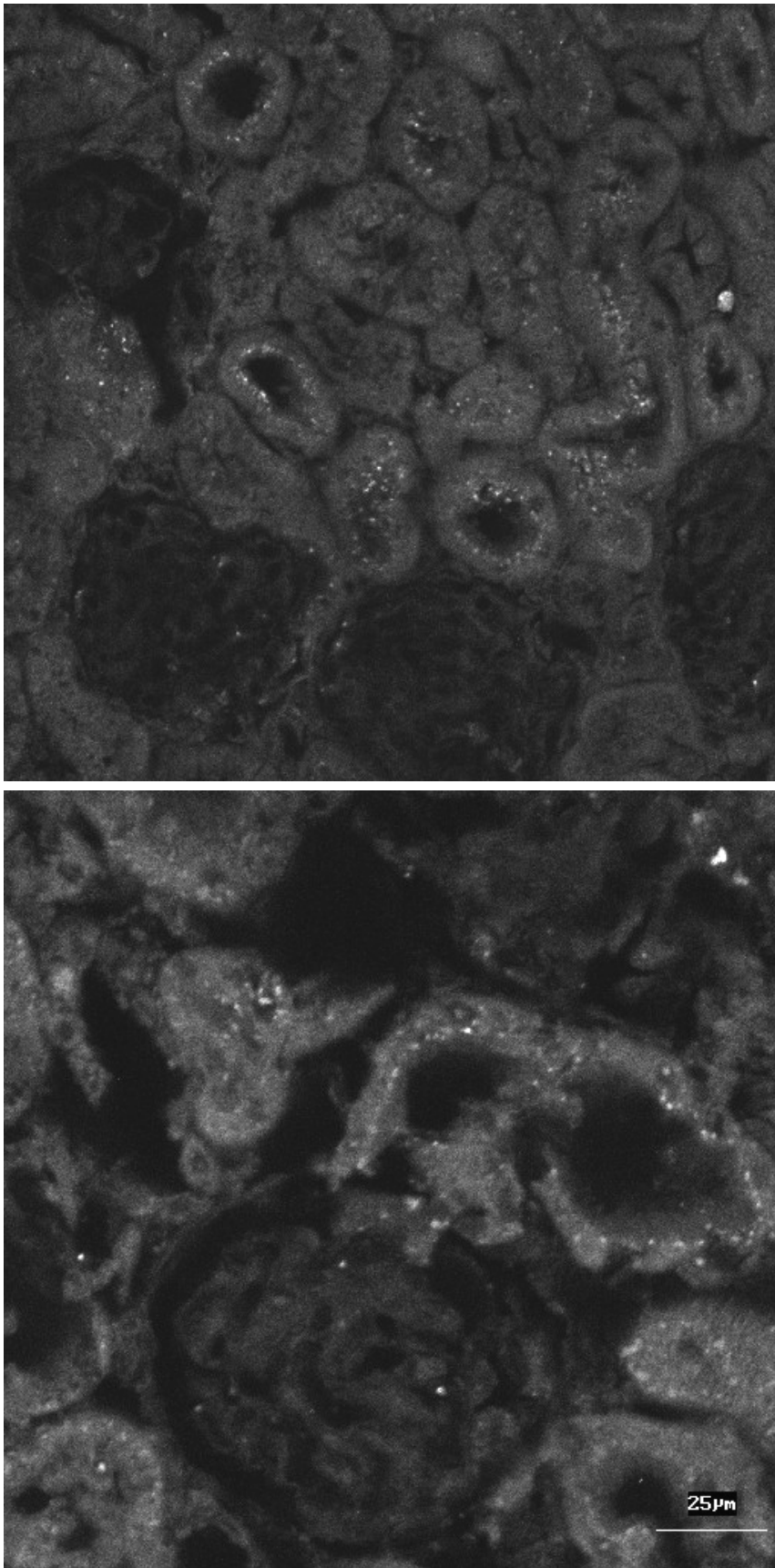


Abb 10. Chronisch denervierte Nieren der SD-Ratte. Inkubationsbedingungen identisch mit Abb.8.
A.: PT-Konvolut mit subapikaler Fluoreszenz. B.: Vergrößerung aus einer benachbarten Region.

3.1.3. D3R-Fluoreszenz und kolokalisierte Strukturen

Eine sichere Darstellung des Bürstensaumes der Zellen des proximalen Tubulus ist für eine exakte anatomische Orientierung notwendig, da dessen Anteil an der Gesamtbreite des Epithels charakteristisch für die verschiedenen Tubulusabschnitte ist. Bereits die intensive Anregung durch Laserlicht in Abwesenheit eines Fluoreszenzmarkers kann diese anatomische Struktur sichtbar machen. Je nach gewählter Wellenlänge geschieht dies entweder durch Autofluoreszenz des Bürstensaumes selbst [vgl.: Yip et al., 1998] oder durch kontrastbildende Autofluoreszenz des Zytoplasmas. In Abb. 11 wurde diese durch Anregung mit einem 543nm He/Ne-Laser induziert. Eine deutlichere Darstellung des Bürstensaumes wurde durch Anfärbung von F-Actin mit Hilfe eines fluoreszenzkonjugierten Phalloidins erreicht. Neben den Bürstensäumen wurden dabei glomeruläre Matrix sowie tubuläre Basalmembranen angefärbt. In einer Doppelfärbung mit anti-D3R-Ak zeigte sich, daß das D3R-Signal streng unterhalb der Bürstensäume lokalisiert ist.

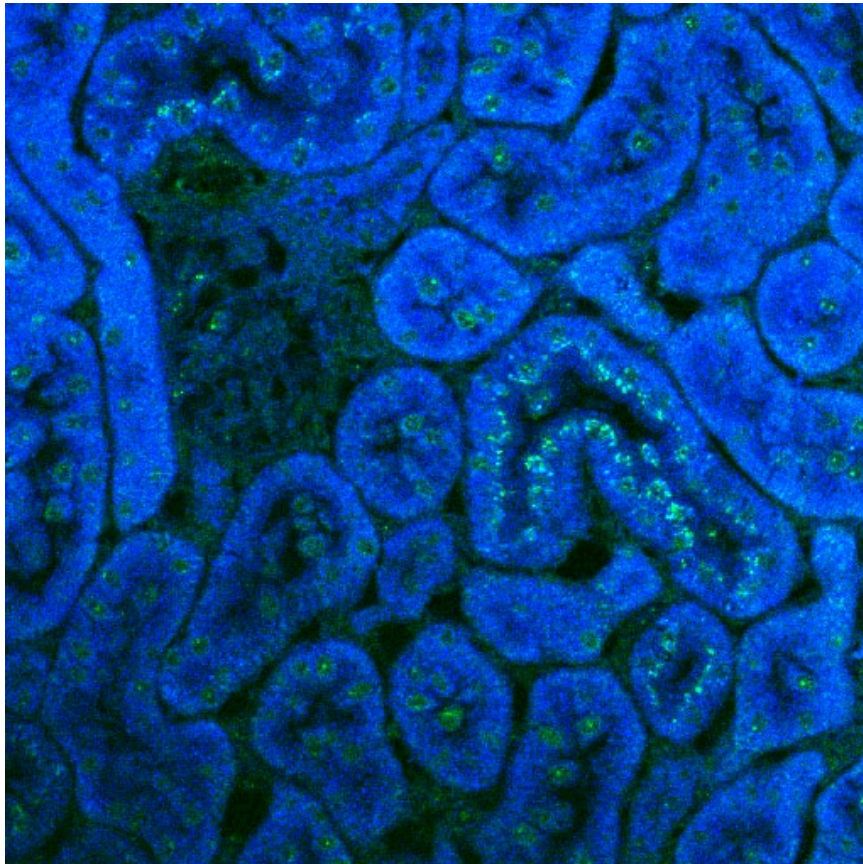


Abb.11 D3R-Fluoreszenz im PT. Bürstensäume (BB) kommen durch Kontrastwirkung mit zytoplasmatischer Autofluoreszenz zur Darstellung. Das D3R Signal liegt dabei streng unterhalb des BB.

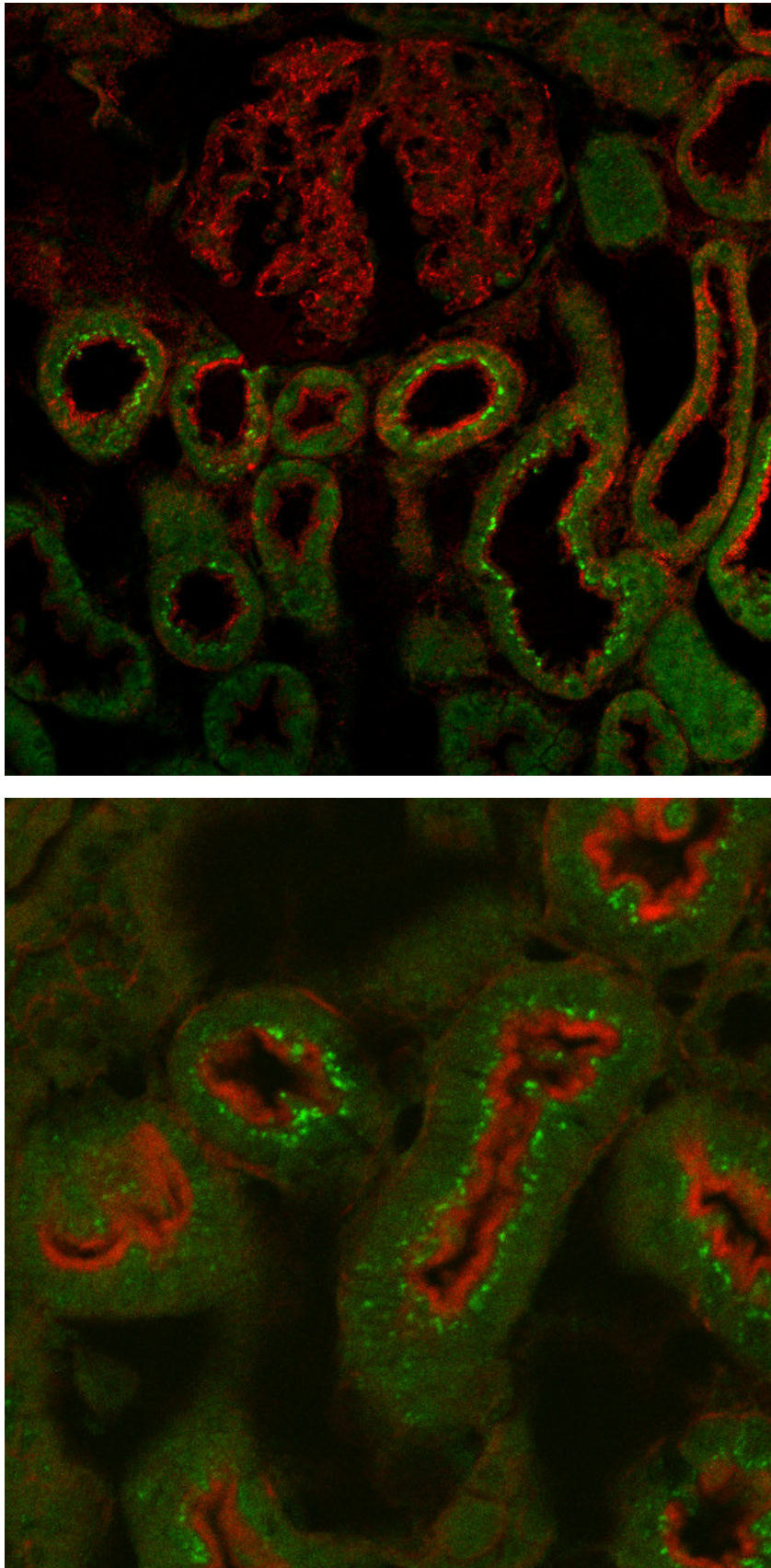


Abb. 12 Doppelfärbung von D3R und F-Actin. Das D3R-Signal (grün) liegt streng unterhalb des F-Actin-Signals (rot) im Bürstensaum. Phalloidin-Cy5[®] A.: Glomeruläre mesangiale Matrix, reich an F-Actin. B.: PT mit kräftiger Anfärbung für D3R und F-Actin.

3.1.3.2 Aquaporin-2 als Markerprotein kortikaler Sammelrohre

Zur Darstellung kortikaler Sammelrohre wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Markierung mit einem anti-Aquaporin-2 -Ak durchgeführt. Die bereits am ungefärbten Präparat mögliche morphologische Unterscheidung der cuboiden Zellen des CCD von benachbarten Strukturen konnte auf diesem Wege bestätigt werden. In den gefärbten CCD zeigte sich keine Fluoreszenz für den D3R. Besonders ausgeprägte Aqp-2 -Fluoreszenz fand sich in medullären Sammelrohren, hier überwiegend an der luminalen Membran lokalisiert.

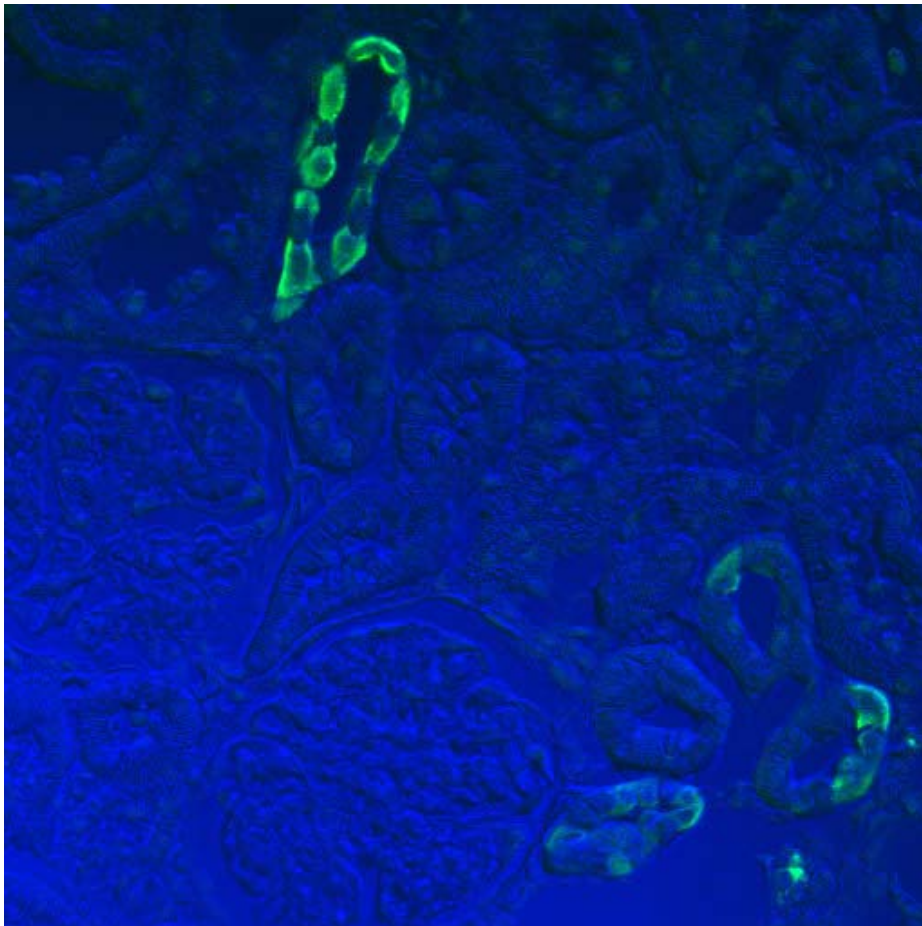


Abb. 13 Aquaporin-2 -Fluoreszenz in kortikalen Sammelrohren (CCD)(Anti-Aqp-2 , go-ch Cy[®]5). Kräftige, vorwiegend apikal aber auch basal gelegene Fluoreszenz in den cuboiden Zellen des CCD. Keine Anfärbung proximaler Tubuli.

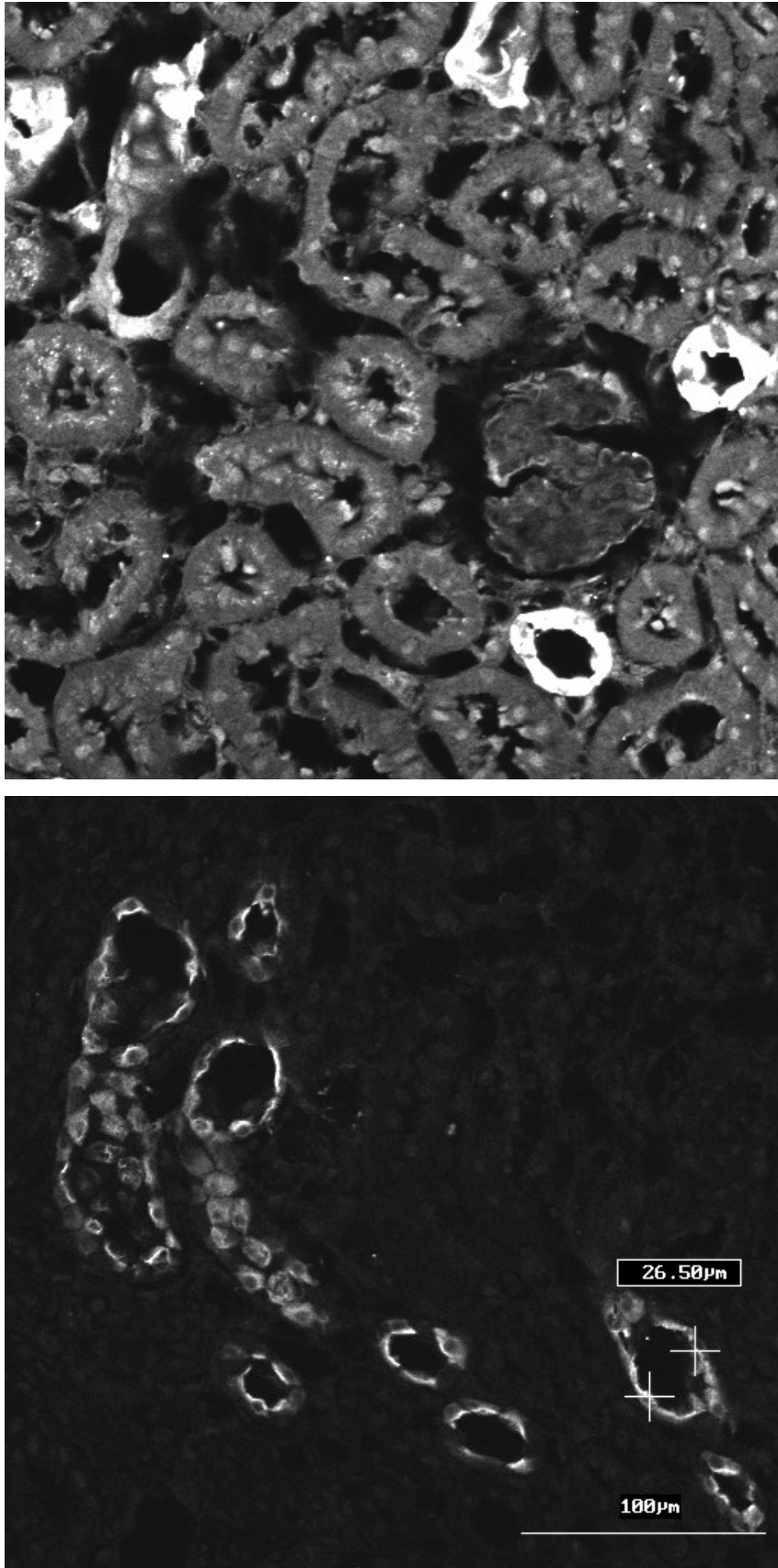


Abb 14. A.: Darstellung kortikaler Sammelrohre (CCD) mit anti-Aquaporin-2. Daneben schwächere anti-D3R-Fluoreszenz in proximalen Tubuli (PT). B.: luminale anti-Aquaporin-2 Fluoreszenz in medullären Sammelrohren.

3.1.3.3 NHE 3

Die tubuläre Lokalisation des D3R-Fluoreszenzsignals bietet Anlaß zu Spekulationen bezüglich einer eventuellen funktionellen Kopplung des D3R mit dem ebenfalls apikal im PT lokalisierten NHE-3 Protein. Um Anhalt für das Vorliegen einer eventuell korrespondierenden Lokalisation der beiden Moleküle zu erlangen, wurde eine Untersuchung der Verteilung von NHE-3 mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz durchgeführt. Dabei zeigte sich eine NHE-3-Fluoreszenz im Bereich der apikalen Plasmazellmembran des PT sowie in Henle'schen Schleifen. Im Gegensatz zur beobachteten D3R Fluoreszenz erschien diese als eine gleichmäßig das Tubuluslumen umgebende lineare Fluoreszenz, offensichtlich ohne Anfärbung eines vesikulären Kompartiments. Die Spezifität des erhaltenen NHE3-Fluoreszenzsignals wurde mit einer Präabsorptionskontrolle bestätigt.

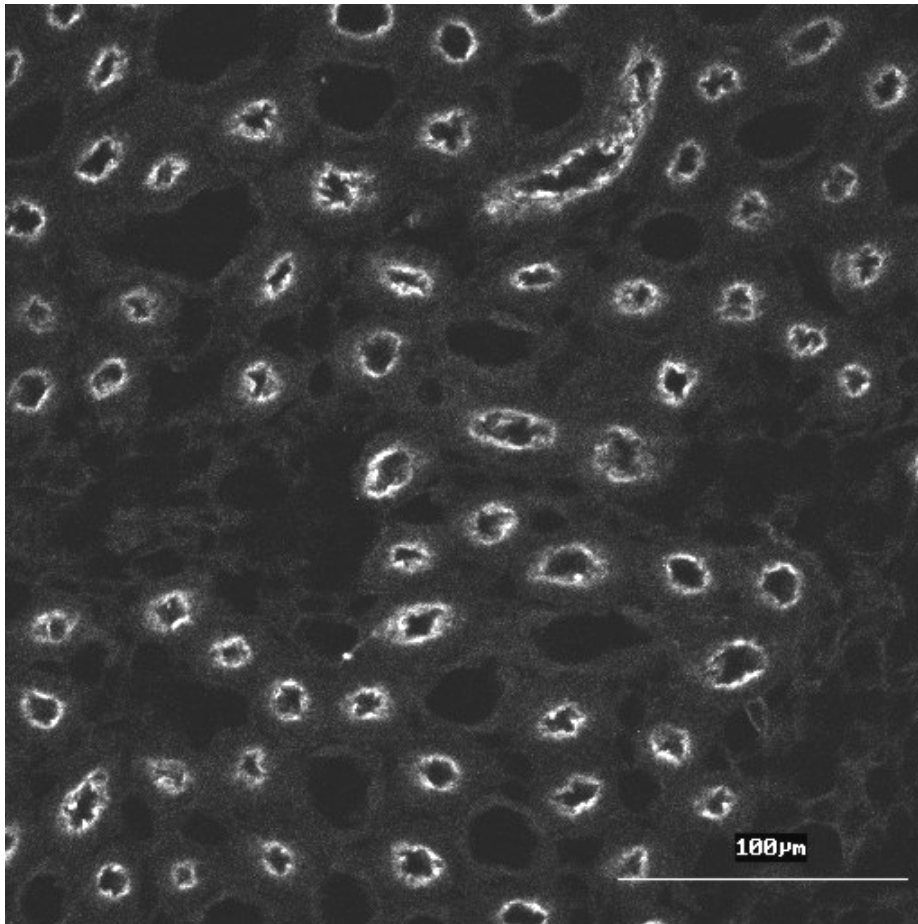


Abb. 15 Renale Medulla der DAHL-SR Ratte. Anti-NHE3-Ak (Fa.BioTrend), go-ra Alexa®Fluor 488. Luminale Fluoreszenz in Henleschen Schleifen.

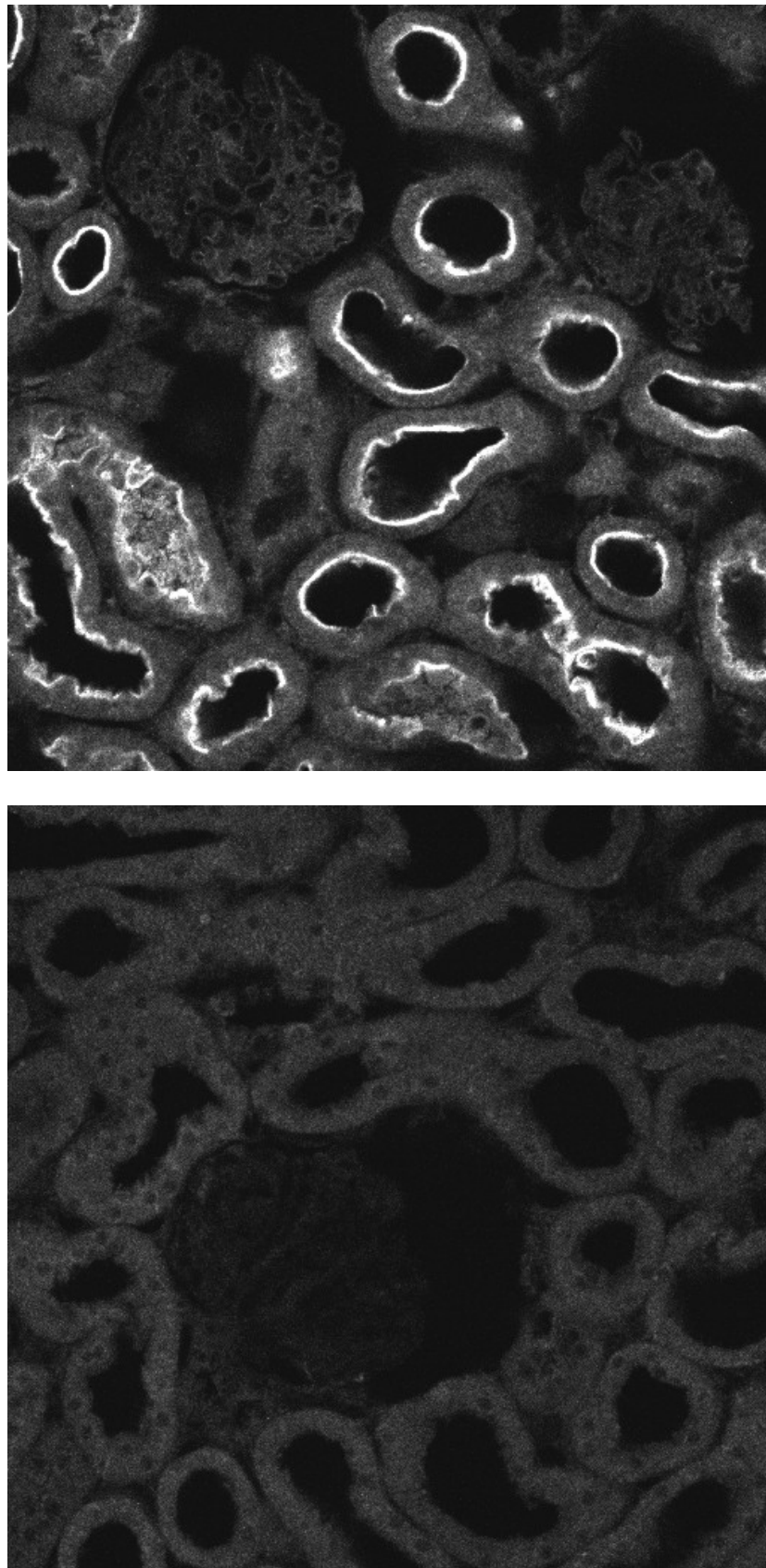


Abb. 16 Renaler Kortex der DAHL-SR Ratte. Anti-NHE3-Ak. A.: NHE3-Fluoreszenz im PT. Luminale Lokalisation mit linearem Charakter. B.: Präabsorptionskontrolle ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ für 1h bei Rt) mit vollständigem Ausbleiben der Markierung.

3.1.3.4 β -Adaptin

Die Lokalisation und Form des beobachteten D3R Signals legt einen Zusammenhang mit dem vakuolären Apparat des PT nahe. Als Marker der apikalen Plasmamembran proximaler Tubuluszellen wurde eine Doppelfärbung mit anti-D3R und anti- β -Adaptin-Ak vorgenommen.

Es ließ sich eine kräftige Anfärbung der apikalen Zellmembran mit dem anti- β -Adaptin-Ak erreichen. Diese entspricht der erwarteten Lokalisation des Adaptin-Komplexes und markiert das Vorhandensein von Clathrin-coated-pits, die an endozytotischen Vorgängen im PT beteiligt sind.

Das D3R-Signal liegt klar unterhalb der β -Adaptin Markierung, was nochmals dessen streng intrazytoplasmatische Lokalisation unterstreicht.

Eine Kolo­kalisierung der vesikulären D3R- mit der β -Adaptin-Fluoreszenz konnte nicht gezeigt werden.

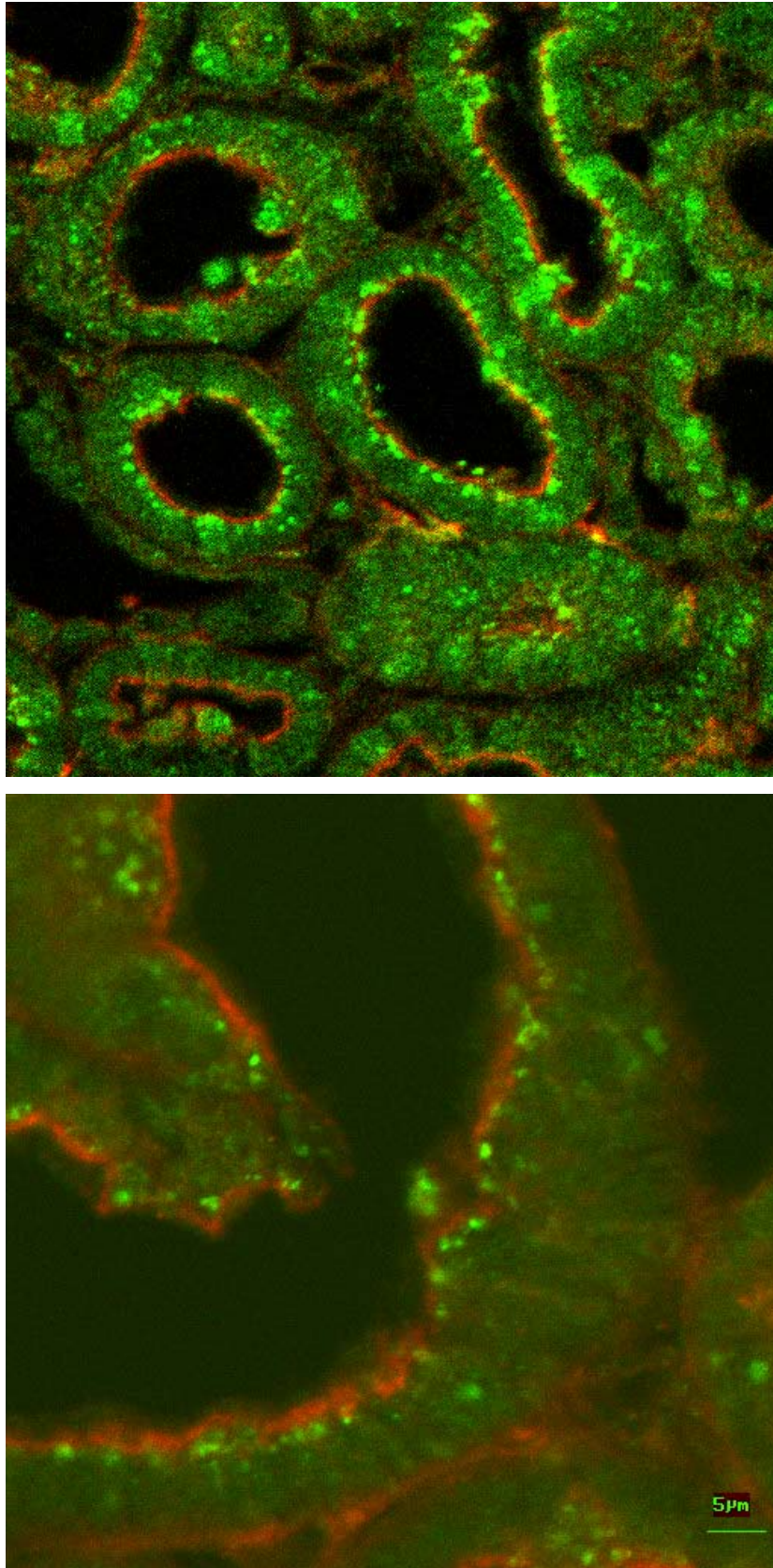


Abb. 17 Renaler Kortex der SD-Ratte. Doppelmarkierung mit anti-D3R, go-ra Alexa[®]green und anti-β-Adaptin, go-mo Cy[®]5 A.: Pars convoluta (S1-S2) eines PT B.:Vergrößerung aus demselben Schnitt wie A [x 630,Öl].

3.2 Sättigungsexperimente

Unter der Fragestellung, ob die chronische Denervation der Rattenniere mit einer Verminderung der Bindungsstellen (B_{\max}) für den selektiven D3R-Liganden [^3H]-7-OH-DPAT einhergeht, wurden Membranpräparationen aus Homogenaten sowohl der denervierten als auch der innervierten Nieren einseitig denervierter Ratten untersucht. Als Kompetitor wurde unmarkiertes („kaltes“) 7-OH-DPAT verwendet.

Im ungepaarten Vergleich der Mittelwerte der B_{\max} aus Nieren einseitig denervierter Ratten (6 Tiere) zeigt sich kein Einfluß der Denervation auf die ermittelte Rezeptordichte. Die beobachteten Schwankungen der B_{\max} -Werte waren allerdings zwischen einzelnen Versuchspaaren teilweise erheblich. (Tab.1)

Tab. 1 Bindungsdaten für [^3H]-7-OH-DPAT aus Nierenhomogenat hemidenervierter SD-Ratten. Organentnahme und Homogenisierung am 7.Tag post OP					
Bezeichnung des Organs :	Bindungs-experiment am:	Ligand: [^3H]-7-OH-DPAT	Competitor: [7-OH-DPAT]	n	B_{\max} (extrapoliert)
DNX I	29.8.00	0.5 – 50 nM	10 μM	1	220 fmol/mg
N.re I	29.8.00	0.5 – 50 nM	10 μM	1	270 fmol/mg
DNX II	5.9.00	1 – 60 nM	10 μM	1	keine Sättigung erreicht
N.re II	4.9.00	1 – 60 nM	10 μM	1	250 fmol/mg
DNX III	12.9.00	1 – 40 nM	10 μM	1	260 fmol/mg
N.re III	11.9.00	1 – 40 nM	10 μM	1	230 fmol/mg
DNX IV	15.9.00	1 – 40 nM	10 μM	1	230 fmol/mg
N.re IV	13.9.00	1 – 40 nM	10 μM	1	230 fmol/mg
DNX V	19.9.00	1 – 40 nM	10 μM	1	220 fmol/mg
N.re V	19.9.00 18.9.00	1 – 40 nM	10 μM	2	(160 fmol/mg) 230 fmol/mg
DNX VI	21.9.00	1 – 40 nM	10 μM	1	180 fmol/mg
N.re VI	20.9.00	1 – 40 nM	10 μM	1	170 fmol/mg
Mw DNX					222 fmol/mg
Mw N.re					230 fmol/mg

Die nach Vereinigung der Proteinpräparationen aus den oben genannten Experimenten durchgeführten Sättigungsversuche entsprechen augenscheinlich dem dort erhobenen Befund, entziehen sich jedoch aufgrund ihrer Zahl (je n=1) einer statistischen Analyse. Die Bestimmung der Menge unspezifisch gebundenen Radioligandens erfolgte hier durch Konkurrenz mit Dopamin, was eine geringere Gesamtbindung mit sich brachte (Tab.2).

Bezeichnung des Organs :	Bindungs-exp. am:	Ligand: [³H]7 OH-DPAT	Competitor [Dopamin]	n	B _{max} (extrapoliert)
DNX pool	3.10.01	1 – 40 nM	10 µM	1	80 fmol/mg
N.re pool	3.10.01	1 – 40 nM	10 µM	1	95 fmol/mg

In zwei weiteren Versuchsgruppen wurde die Auswirkung renaler Denervation durch den Vergleich der Dichte an D3R bei beidseits denervierten und sham-operierten Tieren untersucht. Sowohl bei Tieren der Spezies SD (2 x 3 Tiere) (Tab.3) als auch der Spezies DAHL-SS (2 x 4 Tiere) (Tab. 4) ließ sich keine Tendenz einer Veränderung der B_{max} durch die Denervation nachweisen.

Versuchsnummer :	Bindungs experiment am:	Ligand: [³H] 7-OH-DPAT	Competitor:	n	B _{max} (extrapoliert)
DNX 7-1	23./24.9.00	1 – 40 nM	1 µM DPAT	1	160 fmol/mg
Sham 7-1		1 – 40 nM	10 µM DPAT	1	220 fmol/mg
DNX 7-2	24.10.00	1 – 40 nM	1 µM DPAT	1	130 fmol/mg
Sham 7-2		1 – 40 nM	10 µM DPAT	1	210 fmol/mg
DNX 7-3	29.10.00	1 – 40 nM	10 µM Dopamin	1	150 fmol/mg
Sham 7-3		1 – 40 nM	10 mM DPAT	1	230 fmol/mg
DNX 7-3	29.10.00	1 – 40 nM	10 µM Dopamin	1	140 fmol/mg
Sham 7-3		1 – 40 nM	10 mM DPAT	1	240 fmol/mg
DNX 7-3	29.10.00	1 – 40 nM	10 µM Dopamin	1	(80 fmol/mg)
Sham 7-3		1 – 40 nM	10 mM DPAT	1	250 fmol/mg
DNX 7-3	29.10.00	1 – 40 nM	10 µM Dopamin	1	(90 fmol/mg)
Sham 7-3		1 – 40 nM	10 mM DPAT	1	250 fmol/mg

Tab. 4 Bindungsdaten für [³H]-7-OH-DPAT aus gepooltem Nierenhomogenat beidseitig denervierter bzw. sham-operierter DAHL-Ratten, Organentnahme und Homogenisierung nach der 3. Woche post Op (n=2 x 4 Tiere)

Versuchsnummer :	Bindungs-experiment am:	Ligand: [³ H]-7-OH-DPAT	Competitor:	n	B _{max} (extrapoliert)
DNX 8-1	30.9.00	1 – 40 nM	10 µM Dopamin	1	60 fmol/mg
Sham 8-1		1 – 40 nM	10 µM Dopamin 10 mM DPAT	1	130 fmol/mg
DNX 8-2	2.10.00	1 – 40 nM	10 µM Dopamin	1	60 fmol/mg
Sham 8-2		1 – 40 nM	10 µM Dopamin	1	60 fmol/mg
Sham 8-3	28.9.00	1 – 40 nM	10 µM Dopamin	1	40 fmol/mg
				10 mM DPAT	1

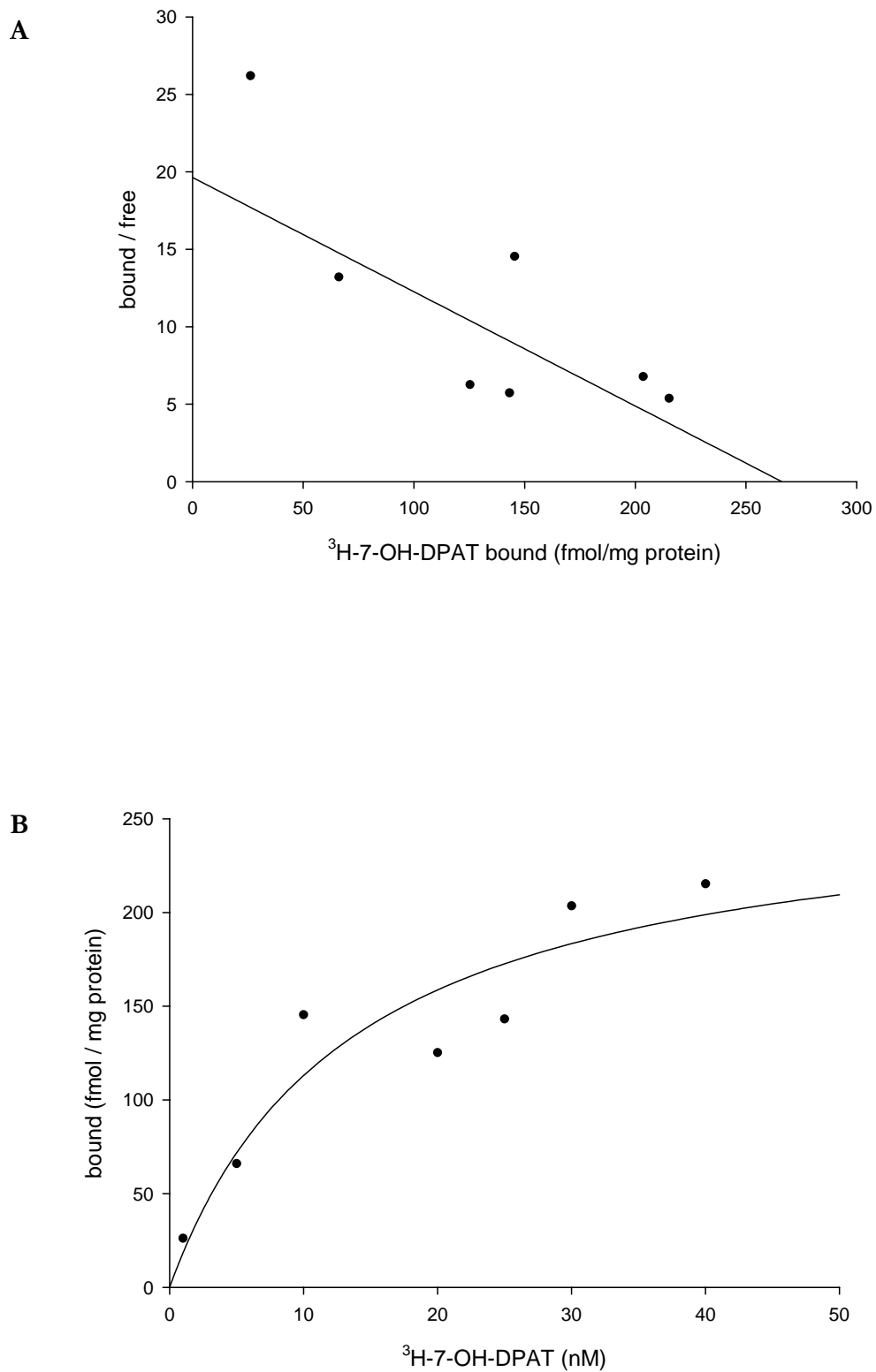


Abb 16. Zwei exemplarische Darstellungen (Versuch DNX V s. Tab. 1) des Bindungsverhaltens von ^3H -7-OH-DPAT an Membranpräparationen aus Nierenhomogenat. A.: Scatchard-Plot $B_{\text{max}} \sim 260$ fmol/mg protein B.: Michaelis-Menten Kinetik für denselben Versuch $B_{\text{max}} \sim 220$ fmol/mg protein, $K_D \sim 10$ nM.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Um die Spezifität des eingesetzten Antikörpers nachzuweisen, wurde zunächst eine Untersuchung der zerebralen Verteilung von D3-Rezeptoren unternommen, da diese am besten dokumentiert ist. Nach Identifikation der *Islands of Calleja* im Frontalhirn der Ratte mit Hilfe der Sytox[®] Kernfärbung gelang der Nachweis von D3-Rezeptor-Immunreaktivität in der hilären Region dieser Kerne. Eine Anfärbung fraglicher Spezifität wurde in Kernen des *Ncl. accumbens (shell region)* gefunden.

Die Verteilung der D3R-Fluoreszenz in den Nieren der Rattenstämme SD, DAHL-SR, DAHL-SS sowie WKY wurde im Folgenden unter weitgehender Beibehaltung des für den zerebralen Nachweis eingesetzten Versuchsprotokolls untersucht. Es fand sich bei allen vier Stämmen ein prominentes Fluoreszenzsignal in den S1 und S2 Segmenten des proximalen Tubulus. Dieses war vielfach bereits direkt am Harnpol des Glomerulums zu sehen, ließ sich jedoch nach distal hin nur unscharf abgrenzen, da eine klare morphologische Grenze zwischen S2 und S3 Segment kaum darstellbar ist. Es zeigte sich eine vesikulär anmutende Anfärbung unterhalb der apikalen Plasmazellmembran proximaler Tubuluszellen mit einer Vesikelgröße von ungefähr 0.5 bis maximal 2 µm. Bürstensäume blieben von der Fluoreszenz eindeutig ausgespart.

Die Untersuchung von Glomerula zeigte lediglich eine spärliche punktförmige Fluoreszenz im Bereich des glomerulären Mesangiums. Kein Signal fand sich hingegen an glomerulärem Gefäßpol und Zellen der Macula densa sowie in der gesamten inneren Medulla, dem DT und CCD.

Die IF-Untersuchung von chronisch denervierten Nieren aus SD-Ratten erbrachte keine stabil reproduzierbare Veränderung hinsichtlich der zuvor an unbehandelten Organen erhobenen Befunde.

Die Spezifität des Fluoreszenzsignals wurde durch dessen Ausbleiben nach Präabsorption des Primärantikörpers mit seinem korrespondierenden Peptid sichergestellt.

Interessanterweise wurde mit einem anderen D3R Antikörper (A1, s.o.) eine zarte D3R-Fluoreszenz detektiert, die ausschließlich auf eine perivaskuläre

Lokalisation in Glomerula beschränkt blieb. Mit diesem Antikörper konnten allerdings weder die zerebralen noch die genannten renalen Befunde nachvollzogen werden.

Zur genaueren morphologischen Zuordnung der erhobenen Befunde und eventuell funktionell interessanter Kolo-kalisationen wurde eine Reihe von Gegenfärbungen vorgenommen.

Eine Markierung des F-Actin-haltigen Bürstensaums proximaler Tubuli sowie der glomerulären mesangialen Matrix gelang mit Phalloidin.

Die Identifikation von CCD mit einem anti-Aquaporin-2 Antikörper diente der besseren Orientierung im Nierenkortex. Ein kräftiges, gleichmäßig an der luminalen Seite sowohl kortikaler als auch medullärer Sammelrohre verteiltes Signal konnte dabei dargestellt werden. Proximale und distale Tubuli blieben ungefärbt.

Um die gefundenen vesikulären Strukturen näher zu charakterisieren wurde eine Gegenfärbung gegen den AP-2 Adaptin-Komplex durchgeführt. Es gelang die Darstellung einer an der apikalen Zytoplasmamembran des PT gelegenen, Fluoreszenz knapp oberhalb des beschriebenen D3R-Signales. Keine freien Vesikel kamen dabei zur Darstellung, eine Ko-lokalisierung mit der D3R-Fluoreszenz ließ sich nicht nachweisen.

Weiterhin interessierte die räumliche Beziehung des D3R zum NHE-3 Transporter. Dieser konnte stark exprimiert im PT sowie in Henle'schen Schleifen dargestellt werden. Auch hier fand sich allerdings keine vesikuläre Lokalisation wie von Biemesderfer et al. (1997) vorbeschrieben.

Unter der Fragestellung einer Veränderung der D3-Rezeptordichte durch chronische renale Denervierung wurden Sättigungsexperimente mit dem Radioliganden [³H]- 7-OH-DPAT durchgeführt. Die dabei gefundenen Rezeptorkonzentrationen bei Verdrängung mit „kaltem“ 7-OH-DPAT lagen bei einseitig denervierten SD-Ratten sowohl für die denervierten als auch für die normal innervierten Nieren bei ähnlichen (hohen !) B_{max}-Werten.

Auch der Vergleich der Bindungsdaten von Membranpräparationen aus Nieren beidseitig denervierter SD und DAHL-Ratten mit denen „sham-operierter“ Kontrolltiere erbrachte keinen Anhalt für eine Veränderung in der Rezeptordichte durch Denervation.

4. Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Lokalisation eines Antigens mit polyklonalen Antikörpern

Zur Untersuchung der Bindungsqualitäten eines Antikörpers (Ak) stehen verschiedene biochemische Möglichkeiten zur Verfügung. Um einen ersten Anhalt zu gewinnen, ob der Ak Affinität für ein in dem zu untersuchenden Gewebe enthaltenes Protein besitzt, kann ein sogenannter „Dot-blot“ durchgeführt werden. Hierbei wird eine homogenisierte Gewebeprobe auf ein Filterpapier aufgetragen und mit dem Ak inkubiert. Nach Abwaschen der Inkubationslösung kann der gebundene Anteil mittels einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Ist bekannt, daß das gesuchte Antigen in einem Gewebe exprimiert wird, so kann mit Hilfe des Western-Blots die Bindung des Antikörpers an eine Proteinpräparation aus diesem Gewebe überprüft werden. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten Antikörpers, der uns freundlicherweise von P. Sokoloff zur Verfügung gestellt wurde, war der Nachweis der Affinität und Spezifität zum einen über eine vergleichende IF-Untersuchung an transfizierten CHO-Zellkulturen sowie mittels Western-blot geführt worden. Dabei zeigte sich eine kräftige Immunfluoreszenz in D3R-transfizierten Zellen, während D2R-transfizierte- und Wildtyp-CHO-Zellen keine Antikörperbindung erkennen ließen. Im Western-blot kamen zwei kräftige Banden bei ~45 und ~ 80 kDa zur Darstellung. Wie auch bei den IF-Experimenten dienten Präadsorptions- und Negativkontrollen (vgl. 4.1.3) zur Bestätigung der Spezifität der erhaltenen Befunde [Diaz et al., 2000].

4.1.2 Inkubationsbedingungen

Die gewählten Inkubationsbedingungen entsprechen in weiten Teilen dem von Diaz [Diaz et al., 2000] vorgeschlagenen Protokoll. Die bei der Untersuchung der D3R Lokalisation im Gehirn gewählte Inkubationszeit des Primärantikörpers

von bis zu 48h erscheint hierbei ungewöhnlich lang. Befürchtungen, daß es unter diesen Bedingungen zu einer Veränderung der Antigenität des Gewebes kommen könnte liegen nahe. Auch die eher moderat gewählte Konzentration des zur Fixation verwendeten Paraformaldehyds (2% im Gegensatz zu meist verwendeten 4%) könnte derartige Bedenken aufwerfen. Es zeigte sich jedoch an den hier untersuchten Gehirn- und Nierenschnitten im Rahmen der gewählten Inkubationszeiten (1h- 48h bei RT) ein mikroskopisch guter Strukturerehalt, was für eine ausreichende Fixierung spricht.

4.1.3 Kontrollen

Die Spezifität der Immunreaktion in den Nierenpräparaten wurde sowohl durch Präinkubation des primären Antikörpers mit seinem korrespondierenden Peptid (Präadsorption) als auch durch Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Abwesenheit des primären Ak (Negativkontrolle) getestet. Ein dabei erhaltenes Fluoreszenzsignal muß demnach entweder von Autofluoreszenz oder unspezifischer Anlagerung des sekundären Antikörpers herrühren. Der Anteil der Autofluoreszenz an dieser Hintergrundfärbung wurde in Abwesenheit beider Antikörper vom Inkubationsmedium ermittelt. Ein Fluoreszenzsignal wurde nur dann als „spezifisch“ für den D3R gewertet, wenn es in keiner dieser Negativkontrollen zu finden war [vgl. Pfaff et al. 1999].

Ein weiterer Anhalt für die Tatsache, daß den erhaltenen Signalen eine echte Bindung des primären Antikörpers und nicht etwa eine unspezifische Anlagerung der Sekundärantikörper oder ein Autofluoreszenzphänomen zugrunde liegt, ergibt sich aus ihrem Nachweis mittels zweier verschiedener Sekundärantikörper, deren Konjugatfarbstoffe unterschiedliche Anregungsmaxima aufweisen (Alexa[®]green, 488nm und Cy[®]5, 633nm).

Da prinzipiell jeder Antikörper mit verschiedenen Antigenen reagieren kann (Multispezifität), ist immer auch von Kreuzreaktionen eines Antikörpers mit diversen Epitopen auszugehen. In einem polyklonalen Antiserum findet sich

allerdings eine Vielzahl von Antikörpern unterschiedlicher Spezifitäten, die in der Lage sind, das zur Immunisierung eingesetzte Antigen über seine verschiedenen Epitope zu binden. Jeder dieser Antikörperklone besitzt seine ihm eigene „Multispezifität“, jedoch ist allen die Spezifität für das Immunisierungsantigen gemeinsam. Gegenüber dieser gemeinsamen Spezifität aller im polyklonalen Serum enthaltenen Antikörper treten deren individuelle Spezifitäten in den Hintergrund. Durch starke Verdünnung des Antiserums können die kreuzreaktiven Effekte zudem minimiert werden. Auch Bindung an Nicht-Peptid-Strukturen des Präparates sind denkbar. Zu diesen Bindungsstellen besitzen die Antikörper allerdings in der Regel geringere Affinität als zu ihrer homologen Peptidsequenz, so daß diese Effekte ebenfalls durch starke Verdünnung des Antikörpers minimiert werden können [Ambrosius und Lippa, 1987].

4.1.4 Autofluoreszenz

Bei geringer Abschwächung („attenuation“ = a_{t1}/a_{t3}) des vorwiegend verwendeten 488nm-Argon-Lasers zeigte sich vor allem im PT eine unterschiedlich stark ausgeprägte intrazytoplasmatische Fluoreszenz. Da diese allerdings in den zuvor erwähnten Kontrollen ebenfalls zu finden war, wurde sie als Autofluoreszenz bewertet. Unter diesem Begriff werden alle Fluoreszenzerscheinungen zusammengefaßt, die nicht durch die Behandlung mit Fluoreszenzfarbstoffen bzw. deren Konjugaten zustande gekommen sind. Das Auftreten von Autofluoreszenz hängt von der Art des eingesetzten Gewebes, seiner histologischen Präparation und von der Wellenlänge des anregenden Lichtes ab [Ambrosius und Lippa, 1987]. Die Zellen des PT sind für deren starke Autofluoreszenz bei Anregung mit dem 488nm Argon-Laser bekannt [Weinlich et al., 1993]. Hierbei handelt es sich um eine hellgrüne bis gelbe cytoplasmatische Fluoreszenz, die überwiegend am basalen Zellpol gelegen ist und Lysosomen zugeordnet werden kann, während DT, Glomerula oder CCD weitgehend frei von derartigen Fluoreszenzerscheinungen sind [Hagege und Richet, 1985].

Da diese Fluoreszenz den Bürstensaum ausspart kann sie zu dessen „Negativ“-Darstellung genutzt werden [Yip et al, 1998].

Im Rahmen von sogenannten "Histofluoreszenztechniken", die vor allem in den 70er Jahren zur Anwendung kamen, wurden derartige Fluoreszenzphänomene durch gezielte chemische Vorbehandlung des Gewebes (z.B. mit Paraformaldehyd !) induziert [Goldstein et al. 1972].

4.1.5 Effizienz der renalen Denervierung

Die Effizienz der chronischen renalen Denervierung wurde durch Bestimmung des NA-Gehaltes der kompletten Niere mit Hilfe der HPLC nachgewiesen. Von einer vollständigen Denervierung wurde ausgegangen, wenn sich dabei ein um mehr als 90% verminderter renaler NA-Gehalt fand, was durch die angewandte Methode mit großer Sicherheit geleistet wurde [Mühlbauer und Osswald, 1994]. An den zur Immunfluoreszenz verwendeten Nieren konnte der Erfolg der Denervierung nicht direkt überprüft werden, da die Organe zur Bestimmung des NA-Gehaltes nicht fixiert sein durften. Da jedoch identische und standardisierte Versuchsbedingungen vorlagen, konnte auch hier von einer vollständigen Denervierung ausgegangen werden. Der Beginn einer funktionellen Reinnervierung nach einer wie beschrieben durchgeführten Denervierung ist erst zwischen 14 und 24 Tagen zu erwarten und nach ungefähr 8 Wochen abgeschlossen [Kline und Mercer, 1980] .

4.1.6 Nachweis cerebraler Dopamin D3 Rezeptoren als Positivkontrolle

Für die vorliegende Arbeit war es von Interesse, die über den verwendeten D3R Antikörper berichtete Bindung an zerebrale Strukturen der Ratte [Diaz et al., 2000] zu reproduzieren, um auf diese Weise Sicherheit über die Eignung der hier gewählten Bedingungen bei der Gewebepräparation und der Technik der Immunfluoreszenz zu gewinnen. Hierzu wurden diejenigen Hirnstrukturen mit untersucht, in denen der D3R bekanntermaßen am stärksten exprimiert wird.

Die Untersuchung der Lokalisation cerebraler D3R bei der Ratte war bislang mit diversen Methoden erfolgt und hatte zu uneinheitlichen Ergebnissen geführt. Von den meisten Autoren wurde jedoch das im basalen Vorderhirn gelegene *Tuberculum olfactorium* als Ort hoher D3R Expression aufgeführt. [Ariano und Sibley, 1994; Diaz et al., 1995; Khan et al., 1998].

Durch In-situ-Hybridisierung von Hirnschnitten mit mRNA-Sonden konnte die AG um Sokoloff zeigen, daß die Verteilung von D3R-mRNA vor allem im basalen Vorderhirn und hier am stärksten in den *Islands of Calleja (Icj)* sowie in der Mantelzone des *Ncl. accumbens (NclAccSh)* ausgeprägt ist, wohingegen die ebenfalls untersuchte Lokalisation der D2R-mRNA sich vor allem im Striatum konzentrierte [Sokoloff et al., 1990]. Weitere Orte hoher D3R-mRNA-Expression waren *Corpora mamillaria*, *Ncl. subthalamicus* und kleinere mesencephale Kerne. Die autoradiographische Markierung von D2-like-Rezeptoren mit [¹²⁵I]iodosulprid [Bouthenet et al., 1991] und dem selektiven D3R-Agonisten [³H]-7-OH-DPAT [Diaz et al., 1995] erbrachte eine mit der mRNA Lokalisation übereinstimmend hohe Intensität in *Icj* und *Ncl.acc.*

Auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz [Ariano und Sibley, 1994] und der Immunhistochemie [Khan et al., 1998] wurde die zerebrale Verteilung des D3R untersucht. Den dabei gewonnenen Ergebnissen wurde allerdings entgegengehalten, sich nicht ausreichend mit den genannten mRNA-Befunden zu decken, was als Zeichen mangelnder Spezifität der verwendeten Antikörper gewertet wurde [Diaz et al., 2000].

Die *Islands of Calleja* sind aufgrund ihrer charakteristischen Neuronenstruktur und der prominenten Lokalisation im *Tuberculum olfactorium* eindeutig zu identifizieren und wurden in der vorliegenden Arbeit als Referenzstruktur für die Eignung der angewandten Methode gewählt. An aufeinanderfolgenden coronaren Schnitten wurden mit

Hilfe einer Kernfärbung (Sytox[®]) die dicht stehenden kleinen Granulaneurone der *Icj* identifiziert (Abb. 4) und die D3R-Färbung durchgeführt. Es ließ sich hierbei eine Markierung im Bereich der hilären Region der angeschnittenen *Icj* erreichen (Abb. 5 u. 6). Weiterhin gelang ein D3R Nachweis in der Mantelregion des *Ncl. accumbens*, wenngleich weniger deutlich.

4.1.7. Ligandenbindungsexperimente

Wie autoradiografische Untersuchungen mit D3R-cDNA gezeigt haben (Northern Blot), handelt es sich bei *Ncl. accumbens* und *Islands of calleja* um die den D3R am stärksten exprimierenden Gewebe, denen eine deutlich geringere Rezeptordichte in der Niere gegenüberstehen soll [Sokoloff et al., 1990]. Neueste Bindungsstudien mit dem Radioliganden [¹²⁵I]7-OH-PIPAT ergeben aber beispielsweise für den *Ncl. accumbens* eine Rezeptordichte von 90 fmol/mg [Stanwood et al., 2000], also weniger als die Hälfte dessen, was in der vorliegenden Arbeit für die Niere dargestellt wurde. Letzterer Ligand soll allerdings eine deutlich höhere D3R-Selektivität als das eng verwandte 7-OH-DPAT aufweisen, so daß ein beträchtliches D2R-Labeling für die hohen Bindungswerte in den Versuchen mit 7-OH-DPAT verantwortlich sein könnte [P. Sokoloff, pers. Mitteilung, 2001] und die hier vorgestellten Daten folglich vorsichtig interpretiert werden sollten.

4.2. Lokalisation renaler Dopamin D₃-Rezeptoren

4.2.1 Lokalisation durch direkte Nachweisverfahren

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Verteilung von D3R in der Rattenniere steht zum Teil im Widerspruch zu den Ergebnissen bislang veröffentlichter Lokalisationsstudien, die neben der Anwesenheit von D3R im BBM des proximalen Tubulus auch positive Befunde in arteriellen Gefäßen, Podozyten, juxtaglomerulären Zellen und den Epithelien von DT und CCD

gefunden hatten [z.B. O'Connell et al., 1998]. Im Folgenden werden diese Befunde detailliert besprochen.

Bereits in der Arbeit von Sokoloff [Sokoloff et al., 1990] wurde über einen Nachweis von D3R-mRNA in der Ratteniere berichtet, wenn auch in deutlich geringerer Kopienzahl als in verschiedenen Hirnregionen. Diese Aussage konnte in einer späteren RT-PCR-Untersuchung bestätigt und erweitert werden, bei der sowohl Medulla und Cortex voneinander gesondert, als auch eine glomeruläre, eine tubuläre sowie eine vaskuläre Proteinfraction untersucht wurden. In allen Fraktionen konnten hierbei D3R-Gentranskripte nachgewiesen werden und zwar für Ratten des Stammes WKY (Wistar-Kyoto) ebenso wie für SHR-Tiere (spontan hypertensive Ratten). Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Kontamination der einzelnen Fraktionen miteinander für den positiven Nachweis in allen Proben verantwortlich sein könnte wurde von den Autoren dabei, zumindest was die makroskopisch erfolgte Trennung von Medulla und Cortex angeht, für gering gehalten [Gao et al., 1994]. Allerdings stellen Kontaminationen der einzelnen mRNA-Fractionen miteinander nach Erfahrungen aus unserer Arbeitsgruppe tatsächlich ein großes Problem dar, sodaß dieser Ansatz zur Differenzierung der Lokalisation eines Proteins fragwürdig erscheint.

Auch an SD-Ratten konnte der Nachweis von D3R- mRNA in tubulären sowie glomerulären Fraktionen, die mittels standardisierter Siebtechnik gewonnen wurden, geführt werden [Luippold et al., 1998]. In einer Kultur von Zellen des JG-Apparates aus Tieren dieses Stammes wurde mit Hilfe der PCR ebenfalls die Anwesenheit von D3R-mRNA nachgewiesen und die funktionelle Bedeutung des Rezeptors im Sinne einer hemmenden Wirkung auf die Reninfreisetzung an dieser Stelle gezeigt [Sanada et al., 1997]. Da derselben Arbeitsgruppe ein immunhistochemischer Nachweis des D3R im juxtaglomerulären Apparat nicht gelang, wurden diese Ergebnisse mit dem Hinweis auf mögliche mRNA-Kontaminationen durch Zellen aus anderen Nephronbereichen allerdings schon bald darauf in Frage gestellt [O'Connell et al., 1998]. Eine gezielte Untersuchung des juxtaglomerulären Apparates im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Lokalisation ebenfalls nicht bestätigen.

Die erste ausführliche Publikation einer immunhistochemischen Lokalisation von D3R in der Niere [O'Connell et al., 1998] konnte eine glomeruläre und tubuläre Verteilung der Immunreaktivität für das gewählte D3R-Antigen darstellen. Die besonders deutlich ausgeprägte glomeruläre Markierung blieb dabei auf Podozyten beschränkt. Die tubuläre Lokalisation bezog sich sowohl auf die CCD, wo sie am deutlichsten ausgeprägt war, als auch auf PT und DT. Im PT fand sich Immunreaktivität in apikalen Zellabschnitten und dabei vor allem im BBM, jedoch auch intrazellulär lokalisiert. Ein deutlich schwächeres Signal wurde in der Arteria renalis, vornehmlich in der Media detektiert, während die in der zitierten Arbeit gezeigten glomerulären Widerstandsgefäße keine Anfärbung aufwiesen. Eine ausserdem dargestellte elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte Anlagerung von Immunogold an Podozytenmembranen und von diesen ausgehenden Vesikeln. Wie oben bereits erwähnt konnte kein Nachweis des D3R in renin-sezernierenden JG-Zellen erbracht werden, die Zellen der Macula densa zeigten sich schwach positiv.

Die vorliegende Arbeit kann die genannten Befunde in Bezug auf die Anfärbung des PT sowie das Fehlen einer Immunreaktivität in JG-Zellen bestätigen. Podozyten wiesen in unseren Experimenten nur eine geringe punktförmige und instabil reproduzierbare, kortikale Sammelrohre hingegen gar keine Immunfluoreszenz auf. Da sich die vorliegende Arbeit sowohl bei der Spezifität des verwendeten Antikörpers (extrazelluläres vs. intrazelluläres Epitop) als auch im Detektionsverfahren (Immunperoxidase vs. Immunfluoreszenz) von den zitierten Arbeiten unterscheidet, ist eine Vielzahl von Erklärungen für diese differierenden Befunde denkbar. Wie bereits erwähnt ist es aus methodischen Gründen nicht ohne Weiteres möglich, aufgrund eines Negativbefundes in einer bestimmten zellulären Lokalisation auf die definitive Abwesenheit des Antigenes dort zu schliessen, da dieses lokal unterschiedliche Konformationen oder Maskierungen aufweisen kann.

Die Lokalisation des D3-Rezeptors in Blutgefäßen der Niere wurde von Amenta et al. (2000) unter Anwendung eines anderen Antikörpers bestätigt, der vor allem in Adventitia und der Übergangszone zur Media markierte, wo eine

kräftige, das Gefäß in seinem Durchmesser gleichmäßig umgebende Immunfluoreszenz gezeigt wurde. Die in der genannten Arbeit dargestellten Gefäße besitzen einen Durchmesser von 200-300 µm und sind somit am ehesten als Aa. arcuatae zu klassifizieren [vgl. Kriz und Kaissling, 1992]. Über kleinere Gefäße wird unterdessen keine Aussage gemacht (der Durchmesser einer glomerulären Arteriole liegt bei ungefähr 20 µm).

Außer einer kräftigen Autofluoreszenz im Bereich der Intima arterieller Gefäße ließ sich in der hier vorliegenden Arbeit keine vaskuläre Fluoreszenz darstellen. Neben Gefäßen besagten Kalibers waren auch glomeruläre Widerstandsgefäße frei von nachweisbarer Immunreaktivität. Diese Befunde stehen in Kontrast zu den Erwartungen, die eingangs erwähnte funktionelle Daten unserer Arbeitsgruppe nahegelegt hatten [Luippold et al., 2000], wobei wegen der anzunehmenden geringen Dichte vaskulärer D3R und den im vorangegangenen Absatz genannten Gründen auch hier ein methodisches Versagen des Nachweises denkbar ist.

Der von Amenta und Mitarbeitern verwendete (polyklonale) Antikörper besitzt Spezifität für das am N-terminalen Ende des Rezeptors, also extrazellulär gelegene Epitop D3R- 2-11-Cys. Auch für die hier vorliegende Arbeit war zunächst ein kommerzieller (polyklonaler) Antikörper (A2, s.Material und Methoden) dieser Spezifität verwendet worden, mit dem jedoch in keiner Nierenregion spezifische Fluoreszenzmuster erzeugt werden konnten, was Zweifel an der Eignung des besagten Epitops für die Generierung von D3R-Antikörpern aufwarf. Diese wurden durch die ebenfalls negativen Ergebnisse einer neurobiologischen Forschungsgruppe an der Universität Freiburg, die seinerzeit denselben Antikörper auf ZNS Gewebe einsetzte, bestätigt [U. Egert, pers. Mitteilung, 8/2000]. Auch aus biochemischen Gründen wird die Eignung des N-terminalen Endes des D3R zur Generierung von Antikörpern bezweifelt, da zahlreiche potentielle Glykosylierungsstellen in diesem Abschnitt möglicherweise zu einer Maskierung der Proteinstruktur führen [Diaz et al. 2000].

Anhand autoradiographischer Untersuchungen mit dem D3-selektiven Liganden [³H]-7-OH-DPAT gelang der Arbeitsgruppe um Amenta desweiteren eine quantifizierende Darstellung der Verteilung des D3R in der Niere. Die größte Aktivität wurde dabei im Bereich des PT gefunden, gefolgt von DT und glomerulärem Mesangium [Amenta, 1997]. Eine mit demselben Liganden an Gefrierschnitten durchgeführte Bindungsstudie lieferte ebenfalls quantitative Information über das Vorhandensein renaler D3 Rezeptoren [Barili et al., 1997]. Wie einleitend erwähnt besteht beim Einsatz selektiver Radioliganden allerdings immer auch die Gefahr einer mangelnden Diskriminierung zwischen verschiedenen Rezeptorsubtypen, sodaß diese Befunde durchaus auch ein gewisses D2R-Labeling beinhalten könnten.

4.2.2 Funktionelle Hinweise auf die Lokalisation des D3R

Neben den in vitro geführten Nachweisen des D3R lassen sich aus funktionellen Experimenten mit selektiven D3R-Liganden Hinweise auf eine mögliche Lokalisation der Rezeptoren gewinnen, was aufgrund der zu erwartenden Komplexität der renalen Regulationsmechanismen allerdings mit gewisser Vorsicht geschehen muß. Im folgenden wird versucht, die funktionellen Befunde zu ordnen hinsichtlich einer ihnen zu Grunde liegenden präsynaptischen oder einer (postsynaptisch) vaskulären bzw. einer interstitiellen Lokalisation des D3-Rezeptors.

1.) Synaptische Lokalisation des D3R?

Die in der Einleitung beschriebenen Hinweise auf eine präsynaptische Lokalisation von D2-like Rezeptoren [Lokhandwala und Amenta 1991; Rump et al., 1993] und die Beobachtung daß auch 7-OH-DPAT in der Lage ist, die Freisetzung von NA aus renalen Nerven zu inhibieren [Lokhandwala pers. Mitteilung], konnten durch Experimente mit chronisch denervierten Versuchstieren gestützt werden, bei denen eine signifikante Abschwächung der

durch 7-OH-DPAT induzierten glomerulären und tubulären Effekte beobachtet wurde [Luippold et al., 1999b]. Für D3R im ZNS wurde ausserdem eine modulierende Rolle auf die synaptische DA-Freisetzung postuliert, wobei die dort zunächst angenommene Funktion als Autorezeptor [Sokoloff et al., 1990] mittlerweile bestritten wird [Koeltzow et al., 1998].

Die Hypothese einer neuronal-präsynaptischen Lokalisation von D3R in der Niere werden durch die Befunde der vorliegenden Arbeit allerdings nicht unterstützt, da sich in den **IF-Untersuchungen** an denervierten Nieren keine stabil reproduzierbare Verminderung des tubulär beobachteten Signals zeigen ließ. Ein Nachweis des Rezeptorproteins in (peri-)vaskulärer oder interstitiell-peritubulärer Lokalisation, wie sie für renales Nervengewebe zu erwarten wäre [Kriz und Kaissling, 1992], gelang ebenfalls nicht. Hierbei könnte es sich allerdings wie oben erwähnt um falsch-negative Befunde handeln, zumal neuronale Rezeptoren vermutlich in vergleichsweise geringerer Dichte vorliegen als für den PT gezeigt. Außerdem ist denkbar, daß das unterschiedliche Mikromilieu von Tubuluszelle und Extrazellulärraum die Affinität des Ak beeinflusst (s.o.). Bei der Beantwortung der Frage einer neuronalen Lokalisation des D3R könnte eine elektronenmikroskopische Untersuchung mit Immunogold-Markierung hilfreich sein.

Die Rezeptordichte in den durchgeführten **Radioliganden-Bindungsexperimenten** zeigt keine Veränderungen nach chronisch renaler Denervierung eine bzw. drei Wochen post Op., was ebenfalls gegen eine neuronale D3R Lokalisation spricht. Diese Daten müssen aber nicht zuletzt aufgrund der großen Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Versuchspaaren vorsichtig interpretiert werden.

Daß die Effekte einer chronischen Denervation allerdings auch durch Degeneration postsynaptisch gelegener Rezeptoren bedingt sein können, wie von manchen Autoren postuliert wird, deuten Befunde aus dem ZNS an. Dort wurde die ursprüngliche Annahme relativiert, daß die starke Verminderung der D3R-mRNA nach Läsion dopaminerger Neurone Zeichen für einen präsynaptischen Syntheseort des Rezeptors seien [Sokoloff et al., 1990].

Es konnte gezeigt werden, daß durch diese Denervation auch postsynaptische Rezeptoren „downreguliert“ werden [Levesque et al., 1995], wofür heute die Deprivation von einem anterograden Faktor dopaminergener Neurone (BDNF) [Guillin et al., 1999] verantwortlich gemacht wird. Eine direkte Übertragung dieser Befunde auf periphere DA-Rezeptoren ist aber sicherlich nicht zulässig.

2.) *Vaskuläre Lokalisation des D3R ?*

Neben einer möglichen neuronalen ist eine vaskuläre Lokalisation des D3R wahrscheinlich. Hierauf deutet vor allem die Tatsache hin, dass der Einsatz von selektiven D3R-Agonisten eine renale Gefäßreaktion auslösen kann.

In Untersuchungen des RBF bei der anästhesierten Ratte konnte unter Einsatz pharmakologischer Dosen von 7-OH-DPAT eine GFR-Steigerung beobachtet werden, die begleitet war von einem deutlichen Abfall des RBF. Eine Konstriktion des Vas efferens wurde für diesen Befund verantwortlich gemacht [Luippold et al., 2000]. Falls für diese Reaktion ein postsynaptisch-vaskulär gelegener D3R verantwortlich sein sollte, so konnte dessen Nachweis in der vorliegenden Arbeit zumindest nicht geführt werden. Die Untersuchung renaler Widerstandsgefäße ergab keine D3R-Immunreaktivität. Zwar könnten auch hierfür wieder falsch-negative Ergebnisse verantwortlich sein, allerdings geben auch die oben besprochenen Lokalisationsstudien [O'Connell et al., 1998; Amenta et al., 2000] keine Hinweise auf eine D3R-Lokalisation in glomerulären Widerstandsgefäßen. Die beobachtete Vasokonstriktion unter D3R-Stimulation müsste diesen Befunden zufolge entweder durch einen indirekten Mechanismus oder die Stimulation alpha-adrenerger Rezeptoren durch den DA-Agonisten erklärt werden [Luippold et al., 2000].

3.) *Extrasynaptisch interstitielle Lokalisation des D3R ?*

IF-Untersuchungen bestätigen die Vermutung einer extrasynaptischen Lokalisation des D3R im ZNS [Diaz et al., 1995], der damit vermutlich Zielstruktur einer parakrinen Dopaminfreisetzung ist [Diaz et al., 2000].

Die Existenz eines para- bzw. autokrinen DA-Systems wird auch für die Niere, insbesondere den Bereich proximaler Tubuli postuliert [Aperia, 2000; Zeng et al. 2003]. Eine mögliche Rolle des D3R wurde in diesem Zusammenhang allerdings bislang noch nicht geklärt.

4.3 D3R und seine möglichen funktionellen Beziehungen im PT

Neben einer geringen D3R-Fluoreszenz in glomerulären Strukturen konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich im PT ein stabiles D3R-Signal nachgewiesen werden, weshalb auf diese Struktur im folgenden besonderes Augenmerk gelegt werden wird.

Die in proximalen Tubuli beobachtete D3R-Fluoreszenz liegt unterhalb der apikalen Plasmamembran und besitzt einen „punktförmigen“ Charakter. Dieser Befund legt anatomisch-histologisch nahe, daß es sich um Anteile des vakuolären Apparates im PT handelt, die hier zur Darstellung kommen. Eine gut dokumentierte Leitstruktur in dieser Region sind Clathrin-coated pits (vgl. 1.2.8), die hier zur genaueren subzellulären Lokalisation des D3R-Fluoreszenzsignals herangezogen wurden.

Dabei wurde anstelle eines Antikörpers gegen Clathrin ein gegen das Protein β 2-Adaptin gerichtetes monoklonales IgG eingesetzt [Yip et al., 1998]. β 2-Adaptin ist Teil des heterotetrameren Adaptorkomplexes AP-2, der ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert ist, und ein Bindeglied zwischen Clathrin und endozytotisch aufzunehmenden Molekülen, wie verschiedenen Rezeptoren, darstellt [Kirchhausen, 2000]. Die Größe der mit anti-D3R-Ak markierten Strukturen ($>0.5\mu\text{m}$) legt nahe, daß es sich hier nicht um Clathrin-coated vesicles (CCV) handelt, da diese lediglich einen Durchmesser zwischen 100 und 200 nm aufweisen [Goldstein et al., 1979]. Ihre fehlende Immunreaktivität für den eingesetzten anti- β -Adaptin-Ak weist zudem darauf hin, daß sie kein Clathringerüst besitzen.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Beobachtungen von Yip et al. [1998] reproduziert werden, die unter Verwendung desselben anti- β -Adaptin-Ak ebenfalls ausschließlich eine lineare, jedoch keine vesikuläre Markierung im

Bereich der Coated-pit Region unterhalb des Bürstensaumes fanden. Eine fehlende Markierung von Endosomen entspricht hierbei den Erwartungen, da Clathrin und Adaptorkomplexe nach Auflösung der CCV durch Fusion mit dem frühen endosomalen Kompartiment zur Plasmamembran „recyclen“ [Kirchhausen, 2000].

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene D3R-Fluoreszenz zeigt keine Kolokalisation mit der erhaltenen Adaptin-Markierung und lässt sich streng unterhalb der apikalen Plasmamembran lokalisieren.

4.3.1 Endosomale Lokalisation im Rahmen von Regulationsprozessen ?

Die ligandenabhängige Endozytose von Signaling-Rezeptoren (i.Gs zu metabolischen Rezeptoren, z.B. LDL-, Mannose-6-P-Rezeptoren) stellt einen Regulationsmechanismus der Signaltransduktion im Sinne von De- und Resensitivierung des Rezeptors dar. Neben anderen GPCR konnte auch für D1R und D2R eine derartige Regulation nachgewiesen werden, die teilweise über den oben beschriebenen Clathrin-abhängigen Mechanismus vermutlich aber auch über alternative Endozytosemechanismen abläuft. In Experimenten mit HEK293-Fibroblasten sowie Neuroblastomzellen zeigten sich hierbei deutliche Unterschiede zwischen den beiden Rezeptor-Subtypen, was vermutlich Bedeutung für die differentielle Signalverarbeitung zwischen diesen hat. So konnte durch Stimulation mit DA in diesen Zellkulturen eine schnelle Internalisierung membranständiger D1R erzielt werden (die pharmakologisch antagonisiert werden konnte), während D2R bereits vor DA Stimulation zu einem grossen Anteil internalisiert in endozytotischen Vesikeln vorlagen [Vickery et Von Zastrow, 1999]. Neben der beschriebenen endozytotischen Vorgänge wurde für den D1R auch eine agonist-induzierte Rekrutierung, also ein exozytotischer Transportprozess zur Plasmamembran gezeigt. Die entsprechenden Experimente wurden dabei an LLPCK-Zellen durchgeführt, die sich aus Zellen des proximalen Tubulus ableiten, und in denen der D1R initial überwiegend intrazytoplasmatisch vorliegt [Brismar et al., 1998].

In Bezug auf den D3R liegen vergleichsweise wenige Befunde vor, die für eine Regulation des Rezeptors durch einen der oben beschriebenen Mechanismen sprechen. Eine elektronenoptisch an Podozytenmembranen gefundene vesikuläre D3R-Immunreaktivität wurde allerdings bereits von O'Connell et al. [1998] im Sinne von Internalisierungsprozessen interpretiert. Neuere Arbeiten mit HEK-Zellkulturen legen für den D3R ebenfalls die Existenz eines Clathrin-abhängigen Mechanismus der agonist-induzierten Internalisierung nahe, welche allerdings im Vergleich zu D2R nur gering ausgeprägt sein soll [Kim et al., 2001].

Die Tatsache, daß mit dem hier verwendeten Antikörper eine apikale Lokalisation des D3R im PT nicht bestätigt wurde, könnte, wie oben erwähnt, durch falsch negative Befunde bedingt sein. So ist denkbar, dass unterschiedliche Konformationszustände des D3R-Proteins in membranständiger und endosomaler Lokalisation eine unterschiedliche Affinität für den eingesetzten D3R-Ak mit sich bringen, so daß nur eine Teilpopulation der tatsächlich vorhandenen D3R zur Darstellung kommt. Auch eine pH-Abhängigkeit der Ag-Ak-Reaktion könnte hierbei eine Rolle spielen, da es sich bei den markierten endosomalen Vakuolen um ein saures Kompartiment handelt [Verlander et al., 1989]. Durch Variationen des Inkubationspuffers hinsichtlich seines pH-Wertes und den Einsatz von Antigen-Demaskierungsverfahren wäre diese Möglichkeit eventuell weiter zu untersuchen.

4.3.2 Subapikal tubuläre D3R als Teil eines autokrinen DA-Systems?

Die Möglichkeit eines funktionell in den Endosomen des PT aktiven Dopaminrezeptors erscheint unter anderem auch durch die erwähnten Befunde aus Experimenten mit DA-Histofluoreszenz interessant, in denen in eben jenem Kompartiment des PT grosse Ansammlungen von DA nachgewiesen wurden [Hagege und Richet, 1984]. Auch aufgrund der Lokalisation des Enzyms AADC im supapikalen Raum von Zellen des PT geht man von einer lokalen Synthese

von DA aus dessen Vorstufe L-DOPA aus [Bertorello et al., 1988; Aperia, 2000]. Dass es sich bei dem in dieser Arbeit intrazellulär nachgewiesenen D3R um einen Rezeptor für intrazellulär gebildetes DA handeln könnte, der somit Teil des postulierten autokrinen DA-Systems wäre, muss zunächst aber Spekulation bleiben.

4.3.3 Funktionelle Bedeutung des D3R für Formation und Funktion von Endosomen?

Neben der Aufnahme von membranständigen Rezeptoren stellt die Reabsorption glomerulär filtrierten Proteins eine Hauptaufgabe des endozytotischen Apparates im PT dar. Die renale Reabsorption von Albumin findet zum größten Teil durch rezeptorvermittelte Endozytose im PT statt. Kürzlich konnte an OK-Zellen gezeigt werden, dass diese Vorgänge von dem inhibitorischen $G_i \alpha_3$ -Protein abhängig sind, das, wie oben beschrieben, auch ein Element der D3R-Signaltransduktion darstellt [Brunskill et al., 1998].

An diabetischen Ratten in Stoffwechselläufigversuchen erhobene Befunde aus unserer Arbeitsgruppe zeigen eine signifikante Verminderung der pathologischen Albuminurie durch Verabreichung des D3-Antagonisten LU-135170 mit dem Trinkwasser [Beilharz, 2000]. Unter der im vorigen Abschnitt erwähnten Hypothese betrachtet legt dieser Befund nahe, dass eine D3R-Aktivierung an der Hemmung der Proteinreabsorption beteiligt ist. Diese Befunde sind allerdings aufgrund methodologischer Schwächen mit Vorsicht zu interpretieren, zumal Ergebnisse nachfolgender Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in gewissem Widerspruch hierzu stehen. In diesen Langzeitexperimenten war eine deutliche Reduktion der Hyperfiltration, weniger aber der Albuminurie durch die Behandlung diabetischer Ratten mit D3R-Antagonisten gezeigt worden [Schneider und Luippold, unveröffentlichte Befunde].

In Zusammenhang mit metabolischen Endozytosevorgängen könnte auch eine funktionelle Kopplung der D3R mit dem endosomal gelegenen $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher NHE3 von Bedeutung sein, wie sie für D1-Rezeptoren gezeigt wurde. Die Befunde von Gekle et al. [2001] (s.u.) erscheinen hier als sehr interessant.

4.4 NHE 3 im proximalen Tubulus

$\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher vermitteln in den meisten eukaryontischen Zellen den elektroneutralen, Amilorid-sensitiven Austausch von Na^+ - und H^+ -Ionen über Plasmamembranen. Bislang konnte die Existenz von sieben verschiedenen Isoformen dieses Transporters nachgewiesen werden. In der Niere sind vor allem die Isoformen NHE1 und NHE3 von Bedeutung. NHE1 findet sich an basolateralen Membranen von Zellen des PT, TAL, DT und CCT und besitzt eine ~40 fach höhere Sensitivität für Amilorid im Vergleich zu NHE3 [Yun et al., 1995]. Letzterer konnte immunhistochemisch im Bürstensaum der S1- und S2-Segmente des PT sowie im apikalen Bereich des TAL nachgewiesen werden [Amemiya et al., 1995]. Inhibitionsstudien weisen darauf hin, daß der überwiegende Anteil des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austausches im PT unter basalen Bedingungen sowie im Zustand metabolischer Azidose auf NHE3-Aktivität zurückzuführen ist [Wu et al., 1996].

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers konnte der NHE3 Transporter neben seiner Lokalisation im Bürstensaum auch in einem subapikalen endosomalen Kompartiment nachgewiesen werden. Weiterhin konnte durch Induktion einer akuten Hypertonie eine Verlagerung von membranständigen NHE3 nach intrazellulär ausgelöst werden, ein Befund, der nahe legt, dass es sich bei diesem endosomalen Anteil eventuell um ein „Reservekompartiment“ des Transporters handelt [Biemesderfer et al., 1997].

Auch in Untersuchungen an Zellkulturen konnten Hinweise darauf gewonnen werden, daß NHE3 zwischen apikaler Plasmamembran und dem frühen endosomalen Kompartiment des PT zirkuliert [Janecki et al., 1998; Kurashima et al., 1998]. Wie kürzlich von Hu und Mitarbeitern dargestellt wurde, erfolgt

diese Internalisierung in NHE3-transfizierten OK-Zellen ebenfalls über die Aufnahme des NHE3 Proteins in Clathrin coated pits [Hu et al., 2001].

4.4.1 Funktionelle Verknüpfung von NHE und Dopaminrezeptoren

Aus in vitro Untersuchungen mit Präparationen renaler Bürstensaumvesikel (BBMV) ist bereits seit längerem bekannt, dass **D1-Rezeptoragonisten** in der Lage sind, dort die basale Aktivität des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austausches zu hemmen. Für diese über die stimulierende G_{sq} -Untereinheit des G-Proteins vermittelte Wirkung wurde sowohl ein cAMP-abhängiger [Felder CC et al., 1990], als auch ein cAMP-unabhängiger Transduktionsweg beschrieben [Felder CC et al., 1993]. Bei SHR-Ratten wurde eine gestörte Interaktion zwischen D1R und G_{sq} gezeigt, die für das Ausbleiben der NHE3-Inhibition unter Gabe von DA-Agonisten verantwortlich sein könnte. Dieser Defekt, dem keine Anomalie des D1R bezüglich dessen Proteinsequenz zugrunde liegt, wird als eine Ursache für den genetisch veranlagten Hypertonus dieses Stammes vorgeschlagen [Xu et al., 2000].

Auch **D2-like-Rezeptoren** sind an der Regulation des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austausches beteiligt, wobei sich in der älteren Literatur widersprüchliche Befunde finden. So konnte in verschiedenen Zellsystemen und Membranpräparationen der Amilorid-sensitive $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austausch durch Stimulation von D2-like-Rezeptoren aktiviert werden [Chio et al., 1994; Neve et al., 1992; Felder et al., 1993] während andererseits auch eine cAMP-unabhängige Inhibition des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austausches durch D2-Agonisten beschrieben wurde [Ganz et al., 1990]. Als subtypen-unspezifisches Maß der Aktivität des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschs unter Stimulations- oder Inhibitionsbedingungen wurden in diesen Studien meist Veränderungen des extra- oder intrazellulären pH-Wertes gemessen. Da dabei verschiedene Zellsysteme verwendet wurden, könnten Unterschiede in der Dichte der einzelnen NHE-Subtypen derartig kontroverse Befunde erklären. Neueste Befunde legen eine synergistische Wirkung von D1-like und D2-like Rezeptoren bei der Regulation der Aktivität des NHE3 nahe.

Wie sich an Zellkulturexperimenten (OK-Zellen) zeigen ließ, bewirken sowohl der D1-like Agonist SKF38393 als auch der D2-like Agonist Quinpirol in dosisabhängiger Weise die Internalisierung des NHE3 Proteins. Quinpirol alleine besitzt dabei eine im Vergleich zu SKF38393 deutlich weniger ausgeprägte Wirkung, zeigt jedoch einen Synergismus mit dem D1-like Agonisten [Hu et al., 2001].

4.4.2 Bedeutung von NHE3 bei der Endozytose

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen NHE3-Aktivität und endozytotischen Prozessen im PT konnte kürzlich dargestellt werden. Demnach soll der Transporter eine wesentliche Rolle bei der Initiation der Endozytose von Proteinen im PT spielen, um schließlich selbst in einem Recycling-Kompartiment des vakuolären Apparates zu akkumulieren. Es wird angenommen, daß dies durch eine Steigerung der Fusionsrate von Vesikeln und der Ansäuerung des frühen endozytotischen Kompartimentes erfolgt [Gekle et al., 2001]. Falls der D3R positiv mit der NHE3-Aktivität gekoppelt sein sollte, ließe sich hiermit das „primäre“ Vorliegen des Rezeptors in Vakuolen sinnvoll erklären.

Mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten anti-NHE3-Ak gelang ein Nachweis des Transporters in PT und TAL, allerdings war das dabei erhaltene Signal im PT streng auf die BBM beschränkt und zeigte keinen vesikulären Anteil, so daß auch keine Kollokalisierung mit der beobachteten D3R-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Für die subapikale Lokalisation des NHE3, wie sie in den oben erwähnten Arbeiten [Biemesderfer et al., 1997; Janecki et al., 1998; Kurashima et al., 1998] gezeigt wurde, könnten eine höhere Internalisierungsrate des Transporters unter den jeweils gewählten Versuchsbedingungen, aber auch methodische Unterschiede bei den IF-Untersuchungen verantwortlich sein. Aufgrund der genannten Befunde von Biemesderfer et al. liegt eine Kollokalisierung von NHE3 und D3R-Protein dennoch nahe. Diese könnte allerdings auch zeitlich und funktionell dissoziiert sein.

4.5 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie Hinweise auf die Lokalisation des D3R-Proteins in der Niere verschiedener Rattenstämme erbracht werden. Dabei stach eine bislang nicht publizierte subapikal in den S1-Abschnitten proximaler Tubuli gelegene Lokalisation besonders hervor, wohingegen in glomerulär-mesangialen Strukturen die Markierung unerwartet schwach ausfiel und in glomerulären Widerstandsgefäßen gänzlich fehlte. Die Differenzen zu bereits existierenden Publikationen liegen dabei eventuell in der Verwendung unterschiedlicher Antikörper und Präparationstechniken begründet, die in dieser Arbeit zu negativen Ergebnissen des Antigennachweises in den genannten Lokalisationen geführt haben mögen, dies umsomehr, da funktionelle Daten ein glomerulo-vaskuläres Vorkommen des D3R sehr stark nahelegen. Aufgrund durchgeführter Spezifitätskontrollen an Hirngewebe, sorgfältigen Negativkontrollen und der stabilen Reproduzierbarkeit der erhaltenen Befunde besteht allerdings wenig Zweifel an der beschriebenen tubulären Lokalisation. Allenfalls präparative Besonderheiten, wie zum Beispiel die Bedingungen der Organfixierung, -gewinnung und -bearbeitung kommen als Ursachen für diskordante Resultate in Frage. Zur genaueren Charakterisierung des Fluoreszenzsignals wurde die Kolo­kalisierung anderer tubulärer Proteine, namentlich NHE3, Aquaporin2 und β -Adaptin untersucht. Hierdurch konnte die streng intrazelluläre Lokalisation des Fluoreszenzsignals in Zellen des Proximalen Tubulus bestätigt werden.

Der sowohl qualitativ mit Immunfluoreszenz als auch semiquantitativ mit einem Radioliganden-Bindungsassay durchgeführte Vergleich der renalen Rezeptordichte an innervierten gegenüber chronisch denervierten Nieren erbrachte keine signifikanten Unterschiede und damit keinen Hinweis auf eine neuronale Lokalisation des D3R.

Die beschriebene intrazellulär tubuläre Lokalisation des D3R bietet aufgrund der besonderen Stellung des PT bei der Regulation des Na^+ -Haushaltes und der Proteinreabsorption, der besonderen Rolle bei der renalen Dopamin-

synthese sowie der Nachbarschaft zu anderen Arten von DA-Rezeptoren einen sehr interessanten Ausgangspunkt für Hypothesen über die Rolle dieses Rezeptors im renalen DA-System. Insbesondere wäre dabei die Frage zu klären, ob sein subapikales Vorkommen eine funktionelle Lokalisation des Rezeptors im Sinne eines Reservekompartimentes darstellt. Hier könnte beispielsweise eine vergleichende IF-Untersuchung DA-agonistisch vorbehandelter Nieren weitere Klarheit bringen. Weiterhin wäre eine genauere Charakterisierung der dargestellten endosomalen Strukturen nötig, unter anderem zur Klärung der Frage, ob die markierten Vesikel an der Proteinabsorption beteiligt sind. Schliesslich ist an eine weitere Modifikation des methodischen Procedere, insbesondere den Einsatz diverser Verfahren zur Antigen-Demaskierung zu denken, um eventuell einen bislang nicht geglückten D3R-Nachweis in anderen Strukturen des Nephrons zu führen und somit bestehende Widersprüche zu bestehenden morphologischen und funktionellen Vorbefunden zu beseitigen.

5. Zusammenfassung

Die Bedeutung des Transmitters Dopamin für die Regulation der Nierenfunktion wird seit vielen Jahren teilweise kontrovers diskutiert. Durch die Fortschritte der Molekularbiologie in den letzten beiden Dekaden konnte eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptormoleküle für Dopamin charakterisiert und deren Existenz in der Niere nachgewiesen werden, hierunter auch der Dopamin D3-Rezeptor (D3R), der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Dessen renale Verteilung war durch die bislang vorliegenden morphologischen Arbeiten nur unbefriedigend charakterisiert worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation des D3R in Nierengewebe verschiedener Rattenstämme mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz untersucht, dabei wurden zur genaueren morphologischen Zuordnung verschiedene Gegenfärbungen eingesetzt. Die Methode wurde zunächst an Hirngewebe etabliert, da für dieses bereits gut gesicherte Lokalisationsstudien existieren.

Bei den Ergebnissen dieser Untersuchungen stach eine bislang nicht publizierte subapikal in den S1 Abschnitten proximaler Tubuli gelegene Lokalisation des D3R besonders hervor, wohingegen in glomerulär-mesangialen Strukturen die Markierung unerwartet schwach ausfiel und in glomerulären Widerstandsgefäßen gänzlich fehlte. Durch die eingesetzten Gegenfärbungen konnte eine streng intrazelluläre Lokalisation des Fluoreszenzsignals in Zellen des proximalen Tubulus bestätigt werden.

Zur Untersuchung der Hypothese einer neuronalen Lokalisation des D3R in der Niere wurde außerdem die Auswirkung chronischer renaler Denervierung auf die Nachweisbarkeit des Rezeptorproteins untersucht, wobei neben der Immunfluoreszenz-Methode als quantifizierendes Verfahren ein Bindungsassay mit dem D3R-selektiven Radioliganden [³H]-7-OH-DPAT zur Anwendung kam. Diese Denervierungsexperimente erbrachten keinen Hinweis auf eine neuronale Lokalisation des D3R.

6. Literaturverzeichnis

Akunne HC, Towers P, Ellis GJ, Dijkstra D, Wikstrom H, Heffner TG, Wise LD, Pugsley TA. Characterization of binding of [3H]PD 128907, a selective dopamine D3 receptor agonist ligand to CHO-K1 cells. *Life Sci* 57(15):1401-10, 1995

Alexander RW, Gill JR, Yamabe W, Lovenberg W, and Keiser HR. 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, 1974.

Ambrosius H und Lupp H. Immunhistochemie. Grundlagen und Techniken. Akademie-Verlag, Berlin, 1987.

Amemiya M, Loffing J, Lotscher M, Kaissling B, Alpern RJ, and Moe OW. Expression of NHE3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int* 48: 1206-1215, 1995.

Amenta F, Collier WL, Ricci A. Autoradiographic localization of vascular dopamine receptors. *Am J Hypertens* 3: 345-365, 1990.

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

Amenta F, Barili P, Bronzetti E, Felici L, Mignini F, and Ricci A. Localization of dopamine receptor subtypes in systemic arteries. *Clin Exper Hypertens* 22(3): 277-288, 2000.

ANZICS (Australian and New Zealand Intensive Care Society) Clinical trials group. Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomised trial. *Lancet* 356: 2139-2143, 2000.

Aperia A. Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. *Annu Rev Physiol* 63: 621-647, 2000.

Aperia A, Bertorello A, and Seri I. Dopamine causes inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity in rat proximal convoluted tubule segments. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 252: F 39-45, 1987

Asico LD, Ladines C, Fuchs S, Accili D, Carey RM, Semeraro C, Pocchiari F, Felder RA, Eisner GM, and Jose PA. Disruption of the dopamine D3 receptor gene produces renin-dependent hypertension. *J Clin Invest* 102: 493-498, 1998.

Baines AD. Effects of salt intake and renal denervation on catecholamine catabolism and excretion. *Kidney Int* 21: 316-322, 1982.

Baines AD and Chan W. Production of urine free dopamine from dopa: a micropuncture study. *Life Sci* 26: 253-259, 1980.

Baines AD and Draganova R. Does dopamine use several pathways to inhibit Na-P_i transport in OK cells? *J Am Soc Nephrol* 9: 1604-1612, 1998.

Ball SG, Gunn IG, and Douglas IH. Renal handling of DOPA, dopamine, norepinephrine, and epinephrine in the dog. *Am J Physiol Renal Physiol* 242: F56-F62, 1982.

Ball SG, Oates NS, and Lee MR. Urinary dopamine in man and rat: effects of inorganic salts on dopamine excretion. *Clin Sci Mol Med* 55:167-173, 1978.

Baldessarini RJ, Kula NS, McGrath CR, Bakthavachalam V, Keabian JW, and Neumeyer JL. Isomeric selectivity at dopamine D₃ receptors. *Eur J Pharmacol* 239: 269–270, 1993.

Barendregt JNM, Muizert Y, Van Nispen Tot Pannerden LLAM, and Chang PC. Intrarenal production of dopamine and natriuresis following DOPA and saline infusions in healthy human volunteers. *J Hum Hypertens* 9:187-194, 1995.

Barili P, Ricci A, Baldoni E, Mignini F, and Amenta F. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of a putative dopamine D₃ receptor in the rat kidney. *Eur J Pharmacol* 338: 89-95, 1997.

Bertorello A, Hökfelt T, Goldstein M, and Aperia A. Proximal tubule Na⁺-K⁺-ATPase activity is inhibited during high-salt diet: evidence for DA-mediated effect. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 254: F795-F801, 1988.

Bertorello A, and Aperia A. Inhibition of proximal tubule Na⁺,K⁺-ATPase activity requires simultaneous activation of DA₁ and DA₂ receptors *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 259: F924-928, 1990.

Biemersderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, Aronson PS. Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 273: F289-F299, 1997.

Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, and Schwartz JC. Localisation of dopamine D₃ receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D₂ receptor mRNA. *Brain Res* 564: 203-219, 1991.

Bradford MM. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.

Brismar H, Asghar M, Carey RM, Greengard P, and Aperia A. Dopamine-induced recruitment of dopamine D₁ receptors to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5573-5578, 1998.

Brown D. Targeting of membrane transporters in renal epithelia: when cell biology meets physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F192-201, 2000.

Bryson SE, Drew GM, Hall AS, Ball SG, and Balmforth AJ. Characterization of the dopamine receptor expressed by rat glomerular mesangial cells in culture. *Eur J Pharmacol.*225: 1-5, 1992.

Bunzow JR, Van Tol HHM, Grandy DK, Albert P, Salon A, Christie MD, Machida CA, Neve KA, and Civelli O. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336: 783-787, 1988.

Clague M. Molecular aspects of the endocytotic pathway. *Biochem J* 336: 271-282, 1998.

Cui S and Christensen EI. Three-dimensional organisation of the vacuolar apparatus involved in endocytosis and membrane recycling of rat kidney proximal tubule cells: An electron-microscopic study of serial sections. *Exp Nephrol* 1: 175-184, 1993.

Dahl LK. Effects of chronic excess salt feeding. Induction of self-sustaining hypertension in rats. *J Exp Med* 115: 1173, 1961.

Dal Toso R, Sommer B, Ewart M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, and Seeburg PH. The dopamine receptor : two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8:4025-4035, 1989.

Da Prada M and Zürcher G. Simultaneous radioenzymatic determination of plasma and tissue adrenaline, noradrenaline and dopamine within the femtomol range. *Life Sci* 19: 1161-1174, 1976.

Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Bates MD, and Caron MG. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347: 72-76, 1990.

Denton MD, Chertow GM, and Brady HR. „Renal-dose“ dopamine for the treatment of acute renal failure: Scientific rationale, experimental studies and clinical trials. *Kidney Int* 49: 4-14, 1996.

Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz J-C, Sokoloff P. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 20(23): 8677-8684, 2000.

DiBona GF. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1517-R1524, 2000.

DiBona GF and Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev* 77: 76-155, 1997.

Dinerstein RJ, Vannice J, Henderson RC, Roth LJ, Goldberg LI, and Hoffmann PC. Histofluorescence techniques provide evidence for dopamine containing neuronal elements in canine kidney. *Science* 205: 497-499, 1979.

Eisenhofer G, Ånemann A, Friberg P, Hooper D, Fandriks L, Lonroth H, Hunyady B, and Mezey E. Substantial production of dopamine in the human gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3864–3871, 1997.

Feenstra MGP, Sumners C, Goedemoed JH, De Vries JB, Rollema H, and Horn AS. A comparison of the potencies of various dopamine receptor agonists in models for pre- and postsynaptic receptor activity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 324: 108-115, 1983.

Felder CC, Mc Kelvey AM, Gitler MS, Eisner GM, and Jose PA. Dopamine receptor subtypes in renal brush border and basolateral membranes. *Kidney Int* 36: 183-193, 1989.

Felder CC, Campbell T, Albrecht FE, and Jose PA. Dopamine inhibits Na⁺/H⁺ exchanger activity in renal BBMVs by stimulation of adenylate cyclase. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 259: F297-F303, 1990.

Felder CC, Albrecht FE, Campbell T, Eisner GM, and Jose PA. cAMP independent, G protein-linked inhibition of Na⁺/H⁺ exchange in renal brush border by D1 dopamine agonists. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 264: F1032-F1037, 1993.

Felder RA, Felder CC, Eisner GM, Jose PA. The dopamine receptor in adult and maturing kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 257: F315–F328, 1989.

Ferguson SSG. Evolving concepts in G-Protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53: 1-24, 2001.

Ganz MB, Pachter JA, and Barber DL. Multiple receptors coupled to adenylyl cyclase regulate Na-H exchange independent of cAMP. *J Biol Chem* 265(16): 8989-8992, 1990.

Gao D-Q, Canessa LM, Mouradian MM, and Jose PA. Expression of the D2 subfamily of dopamine receptor genes in kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 266: F646–F650, 1994.

Giros B, Martres MP, Sokoloff P, Schwartz JC. Gene cloning of human dopaminergic D3 receptor and identification of its chromosome. *C R Acad Sci III* 311: 501-506, 1990.

Goldberg LI. Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications. *Pharmacol Rev* 24: 1–29, 1972.

Goldberg LI, Volkmann PH, and Kohli A. A comparison of the vascular dopamine receptors with other dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 18: 57-79, 1978.

Goldstein JL, Anderson RGW, and Brown MS. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279: 679-685, 1979.

Goldstein M, Fuxe K, and Hökfelt T. Characterization and tissue localization of catecholamine synthesizing enzymes. *Pharmacol Rev* 24: 293-308, 1972.

Guillin O, Damier L, Griffon N, Diaz J, Carroll P, Schwartz J-C, and Sokoloff P. Role of brain-derived neurotrophic factor in the control of D₃ receptor expression. *Eur J Neuropsychopharmacol* 9: S184-S185, 1999.

Hagege J and Richet G. Proximal tubule dopamine histofluorescence in renal slices incubated with L-DOPA. *Kidney Int* 27: 3-8, 1985.

Hansell P and Fasching A. The effect of dopamine receptor blockade on natriuresis is dependent on the degree of hypervolemia. *Kidney Int* 39: 253-258, 1991.

Hayashi M, Yamaji Y, Kitajima W, and Saruta T. Aromatic L-Amino acid decarboxylase along the rat nephron. *Am J Physiol Renal Fluid Physiol* 258: F28-F33, 1990.

Hedge SS, Jadhav AL, and Lokhandwala MF. Role of kidney dopamine in the natriuretic response to volume expansion in rats. *Hypertension* 13: 828-834, 1989.

Hillefors-Berglund M and Von Euler G, Pharmacology of dopamine D₃ receptors in the islands of Calleja of the rat using quantitative receptor autoradiography. *Eur J Pharmacol* 261: 179-183, 1994.

Jose PA, Raymond JR, Bates MD, Aperia A, Felder RA, and Carey RM. The renal dopamine receptors. *J Am Soc Nephrol* 2: 1265-1278, 1992.

Kaufman LN, Young JB, and Landsberg L. Differential catecholamine responses to dietary intake: effects of macronutrients on dopamine and epinephrine excretion in the rat. *Metabolism* 38: 91-99, 1989.

Kebabian JW and Calne DB. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96, 1979.

Kim K-M, Valenzano KJ, Robinson SR, Yao WD, Barak LS, and Caron MG. Differential regulation of the dopamine D₂ and D₃ receptors by G protein coupled receptor kinases and β -arrestins. *J Biol Chem* 276: 37409-37414, 2001.

Kirchhausen T. Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69: 699-727, 2000.

Koeltzow TE, Xu M, Cooper DC, Hu X-T, Tonegawa S, Wolf ME, and White FJ. Alterations in dopamine release but not dopamine autoreceptor function in dopamine D₃ receptor mutant mice. *J Neurosci* 18: 2231-2238, 1998.

Kopin IJ. Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev* 37: 333–364, 1985.

Kriz W und Kaissling B. Structural organisation of the mammalian kidney; in: the kidney: physiology and pathophysiology, second ed., Raven Press Ltd., New York: 707-780,1992.

Kurtz A, Della Bruna R, Pratz J, and Cavero I. Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamine receptors mediating renin release. *J Cardiovasc Pharmacol* 12: 658-633, 1988.

Large CH and Stubbs CM, The dopamine D₃ receptor: Chinese hamsters or Chinese Whispers? *Trends Pharmacol Sci* 15: 46-47, 1994.

Lee MR, Dopamine and the kidney: ten years on. *Clin Sci (Lond.)*84: 357-375, 1993.

Levesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, and Sokoloff P. Identification, characterisation, and localisation of the dopamine D₃ receptor in rat brain using 7-[³H]hydroxy-N,N,-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8155-8159,1992.

Levesque D, Martres MP, Diaz J, Griffon N, Lammers CH, Sokoloff P, and Schwartz JC. A paradoxical regulation of the dopamine D₃ receptor expression suggests the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1719-1723, 1995.

Levesque D. Aminotetralin drugs and D₃ receptor functions. What may partially selective D₃ receptor ligands tell us about dopamine D₃ receptor functions? *Biochem Pharmacol* 52: 511-518,1996.

Liddell E and Weeks L. Immunlokalisation, in: Antikörpertechniken. *Spektrum-Verlag*: 109-128, 1996.

Lokhandwala MF and Amenta F. Anatomical distribution and function of dopamine receptors in the kidney. *FASEB J* 5: 3023-3030, 1991.

Luippold G, Küster E, Joos TO, and Mühlbauer B. Dopamine D₃ receptor activation modulates renal function in anesthetized rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358: 690–693, 1998a.

Luippold G, Makri S, Osswald H, and Mühlbauer B. Role of renal nerves in the dopamine D₃ receptor-induced renal changes in anesthetized rats (Abstract). *Pfluegers Arch Eur J Physiol* 437: R187, 1999b.

Luippold G and Mühlbauer B. Dopamine D2-receptors mediate glomerular hyperfiltration due to amino acids. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1248–1252, 1998b.

Luippold G, Schneider S, Vallon V, Osswald H, and Mühlbauer B. Postglomerular vaso-constriction by dopamine D3 receptors in anesthetized rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 278: F570-F575, 2000.

Luippold G, Benöhr P, Piesch C, Heyne N, and Mühlbauer B. Urinary dopamine excretion in healthy volunteers: effect of sodium diet and acute water load. *Pfluegers Arch Eur J Physiol* 440:28-33: 2000b.

Luippold G, Zimmermann C, Mai M, Kloor D, Starck D, Gross G, and Mühlbauer B. Dopamine D₃ Receptors and salt-dependent hypertension. *J Am Soc Nephrol* 12: 2272-2279, 2001.

Matsumoto M, Hidaka K, Tada S, Tasaki Y, and Yamaguchi T. Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Mol Brain Res* 29: 157–162, 1995.

Maunsbach AB and Christensen EI. Functional ultrastructure of the proximal tubule; in: Windhager EE (ed.): Handbook of Physiology; Oxford University press, Washington DC: 41-107, 1992.

McDonald RH, Goldberg LI, McNay JL, and Tuttle EP. Effect of dopamine in man: augmentation of sodium excretion, glomerular filtration rate and renal plasma flow. *J Clin Invest* 43: 1116-1124, 1964.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, and Caron MG. Dopamine Receptors: From Structure to function. *Phys Rev* 78: 189-225, 1998.

Mühlbauer B, Gleiter CH, Gies C, Luippold G, Löschmann P-A. Renal response to infusion of dopamine precursors in anaesthetized rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356: 838-845, 1997a.

Mühlbauer B, Mickeler C, and Schenk F. Protein-induced increase in urinary dopamine in normal and diabetic rats: role of catecholamine precursors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R80-R85, 1997b.

Mühlbauer B and Osswald H. Feeding but not salt-loading is the dominant factor controlling urinary dopamine excretion in conscious rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346: 469-471, 1992.

Mühlbauer B and Osswald H. Feeding-induced increase in urinary dopamine excretion is independent of renal innervation and sodium intake. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 266: F563-F567, 1994.

Mühlbauer B, Spöhr F, Schmidt R, and Osswald H. Role of renal nerves and endogenous dopamine in amino acid-induced glomerular hyperfiltration. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 273: F144-F149, 1997c.

Nash SR, Godinot N, and Caron MG. Cloning and characterization of the opossum kidney cell D1 dopamine receptor: expression of identical D1A and D1B dopamine receptor mRNAs in opossum kidney and brain. *Mol Pharmacol* 44: 918–925, 1993.

O'Connell DP, Botkin SJ, Ramos SI, Sibley DR, Ariano MA, Felder RA, and Carey RM. Localization of dopamine D1A receptor protein in rat kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 268: F1185–F1197, 1995.

O'Connell DP, Vaughan CJ, Aherne AM, Botkin SJ, Wang ZQ, Felder RA, and Carey RM. Expression of the dopamine D3 receptor protein in the rat kidney. *Hypertension* 32: 886–895, 1998.

Paxinos G and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Compact third edition. Academic press, 1997.

Pelayo JC, Fildes RD, Eisner GM, and Jose PA. Effects of dopamine blockade on renal sodium excretion. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 245:F247-F253, 1983.

Perrichot R, Garcia-Ocana A, Couette S, Como E, Amiel C, and Friedlander G. Locally formed dopamine modulates renal Na-Pi co-transport through DA1 and DA2 receptors. *Biochem J* 312: 433-437, 1995.

Pfaff IL, Wagner H-J, and Vallon V. Immunolocalization of Protein Kinase C Isoenzymes α , β I and β II in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 10: 1861-1873, 1999.

Rodman JS, Kerjaschki D, Merisko E, and Farquhar MG. Presence of an extensive clathrin coat on the apical plasmalemma of the rat kidney proximal tubule cell. *J Cell Biol* 98: 1630-1636, 1984.

Rump LC, Schwertfeger E, Schuster MJ, Schaible A, Frankenschmidt A, and Schollmeyer PJ. Dopamine DA₂-receptor activation inhibits noradrenaline release in human kidney slices. *Kidney Int* 43: 197-204, 1993.

Sanada H, Yao L, Jose PA, Carey RM, and Felder RA. Dopamine D3 receptors in rat juxtaglomerular cells. *Clin Exp Hypertens* 19: 93–105, 1997.

Schnerman J, Briggs JP, and Weber PC. Tubuloglomerular feed back,, prostaglandins and angiotensin in the autoregulation of glomerular filtration rate. *Kidney Int* 25: 53-64, 1984.

Schwartz LB and Gewertz BL. The renal response to low dose dopamine. *J Surg Res* 45: 574–588, 1988.

Seabrook GR, Kemp JA, Freedman SB, Patel S, Sinclair HA, and McAllister G. Functional expression of human D₃ dopamine receptors in differentiated neuroblastoma x glioma NG108-15 cells. *Br J Pharmacol*. 111: 391-393, 1994.

Seri I, Kone BC, Gullans SR, Aperia A, Brenner BM, and Ballermann B. influence of Na⁺ intake on dopamine-induced inhibition of renal cortical Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 258: F52–F60, 1990.

Seri I and Aperia A. Contribution of dopamine₂ receptors to dopamine-induced increase in glomerular filtration rate. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 254: F196–F201, 1988.

Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. Basic Neurochemistry, 6th edition. CD-ROM ed., Lippincott Williams & Wilkins, 1998.

Siragy HM, Felder RA, Howell NL, Chevalier RL, Peach MJ, and Carey RM. Evidence that dopamine-2 mechanisms control renal function. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 259: F793–F800, 1990.

Siragy HM, Felder RA, Peach MJ, and Carey RM. Intrarenal DA₂ dopamine receptor stimulation in the conscious dog. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 262: F932–F938, 1992.

Soares-da-Silva P. A study of the neuronal and non-neuronal stores of dopamine in rat and rabbit kidney. *Pharmacol Res* 26(2): 161-171, 1992.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Barthenet ML and Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D-3) as target for neuroleptics. *Nature* 347: 146-151, 1990.

Sokoloff P, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Martres MP, Giros B, and Schwartz JC. Pharmacology of human dopamine D₃ receptor expressed in a mammalian cell line: comparison with D₂ receptor. *Eur J Pharmacol* 225: 331–337, 1992.

Stephenson RK, Sole MJ, and Baines AD. Neural and extraneural catecholamine production by rat kidneys. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 242: F261-F-266, 1982.

Stier CT Jr, Cowden EA, and Allison ME. Effects of bromocriptine on single nephron and whole-kidney function in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 220: 366–370, 1982.

Sunahara RK, Guan HC, O`Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HHM and Niznik HB. Cloning of the gene for a human dopamine D₅ receptor with higher affinity for dopamine than D₁. *Nature* 350: 614-619, 1991.

Tang L, Todd RD, Heller A, and O'Malley KL. Pharmacological and functional characterization of D2, D3 and D4 dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 495–502, 1994.

Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT, and Caron MG. Cloning, molecular characterisation and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1a receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7491-7495, 1991.

Vanhauwe JFM, Josson K, Luyten WHM, Driessen AJ, and Leysen JE. G-Protein sensitivity of ligand binding to human dopamine D₂ and D₃ receptors expressed in Escherichia coli: clues for a constrained D3 receptor structure. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 274-283,2000.

Van Tol HHM, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, and Civelli O. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350: 610-614, 1991.

Verlander JW, Madsen KM, Larsson L, Cannon JK, and Tisher CC. Immunocytochemical localization of intracellular acidic compartments: rat proximal nephron. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 257: F454-562, 1989.

Vickery RG and Von Zastrow M. Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J Cell Biol* 144: 31-43, 1999.

Vieira-Coelho MA, Serrao P, Guimares JT, Pestana M, and Soares-Da-Silva P. Concerted action of dopaminne on renal and intestinal Na⁺-K⁺-ATPase in the rat remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F1033-1044, 2000.

Waters N, Svensson K, Haadsma-Svensson SR, Smith MW, and Carlsson A. The dopamine D3-receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *J Neural Transm Gen Sect* 94: 11–19, 1993.

Weinlich M, Capasso G, and Kinne RKH. Intracellular pH in renal tubules in situ: single-cell measurements by confocal laserscan microscopy. *Pflügers Arch* 422: 523-529, 1993.

Williams M, Young JB, Rosa RM, Gunn S, Epstein FH, and Landsberg L. Effect of protein ingestion on urinary dopamine excretion: evidence for the functional importance of renal decarboxylation of circulating 3,4-dihydroxyphenylalanine in man. *J Clin Invest* 78: 1687-1693, 1986.

Wolfovitz E, Grossman E, Folio CJ, Keiser HR, Kopin IJ, Goldstein DS. Derivation of urinary dopamine from plasma dihydroxyphenylalanine in humans. *Clin Sci* 84: 549 –557, 1993.

Wu M-S, Biemesderfer D, Geibisch G, and Aronson PS. Role of NHE3 in mediating renal brush border $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange: adaptation in metabolic acidosis. *J Biol Chem* 271: 32749-32752, 1996.

Yip K-P, Tse C-M, McDonough AA, and Marsh DJ. Redistribution of $\text{Na}^+\text{/H}^+$ exchanger isoform NHE3 in proximal tubules induced by acute and chronic hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: F565-F575, 1998.

Yun CHC, Tse C-M, Nath SK, Levine SA, Brant SR, and Donowitz M. Mammalian $\text{Na}^+\text{/H}^+$ exchanger gene family: structure and function studies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 269: G1-G11.

Zeng C, Asico LD, Wang X, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, and Jose PA. Angiotensin II regulation of AT1 and D3 dopamine receptors in renal proximal tubule cells of SHR. *Hypertension* 41: 724-729, 2003.

Zimlichman R, Levinson PP, Kelly G, Stull R, Keiser HR, and Goldstein DS. Derivation of urinary dopamine from plasma dopa. *Clin Sci* 75: 515-520, 1988.

Herzlichen Dank an **Imke Pfaff**, die sich sehr bei der Etablierung der Methode engagierte, **Andreas Mack** (Anatomisches Institut) für viel Geduld und große Hilfe in dunklen Stunden im LSM-Kabuff, **Asja Nürnberger** für viele hilfreiche Kommentare zum Manuskript. An Herrn **Professor Osswald** und meine Betreuer **Gerd Luippold** und **Doris Kloor** für Anregung und kritische Diskussion. Großen Dank an meinen Doktorvater **Bernd Mühlbauer** für hoffnungsspendende Gespräche zu jeder Zeit. Dank auch an die anderen Mitarbeiter des Pharmakologischen Institutes für die (meistens) gute Stimmung!

Dank auch all meinen **Freunden** und vor allem **Katrin Martin** für Ihre Geduld .

Marcus Rübiger

Lebenslauf

Marcus Rübiger

geboren am 12. Januar 1974 in Rottweil

Schulische und universitäre Ausbildung:

- 1984 – 5/1993 Gottlieb-Daimler-Gymnasium in Stuttgart
- 9/1993 – 11/1994 Zivildienst am Katharinenhospital Stuttgart
- 4/1995 – 3/1996 Beginn eines Lehramtsstudiums der Fächer Deutsch und
Geschichte in Tübingen
- 1996-2003 Studium der Humanmedizin in Tübingen
- Drittes Staatsexamen am 9.5.2003
- 8/2003 –5/2004 Tätigkeit als Arzt im Praktikum: Klinikum Stuttgart, Bürgerhospital,
Medizinische Klinik 1. Schwerpunkt Hämato-Onkologie,
CA Prof. Dr. Mergenthaler.
- 10/2004 Approbation als Arzt