

**Zeitlich-räumliche
Entwicklung der Reninexpression
in der Mausniere**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Katharina Machura aus Regensburg
Oktober 2007

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Juli 2003 bis Oktober 2007 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 11.10.2007

Colloquium: 30.11.2007

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. Armin Kurtz

Prüfungskommission: Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Richard Warth

1. Prüfer: Herr Prof. Dr. Armin Kurtz

2. Prüfer: Herr Prof. Dr. Will Minuth

3. Prüfer: Herr Prof. Dr. Bernhard Krämer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 6 -
1.1 Die Nierenentwicklung	- 7 -
1.1.1 Frühembryonale Nephrogenese	- 7 -
1.1.2 Nephronbildung	- 9 -
1.2 Das Blutgefäßsystem der Niere	- 10 -
1.2.1 Vaskuläre Entwicklung	- 10 -
1.2.2 Das Blutgefäßsystem in der adulten Niere	- 12 -
1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	- 13 -
1.3.1 Das RAAS in der adulten Niere	- 13 -
1.3.1.1 Renin	- 14 -
1.3.1.2 Regulation der Reninsynthese und -sekretion	- 16 -
1.3.2 Das RAAS während der Nephrogenese	- 17 -
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	- 20 -
2. Material und Methoden	- 21 -
2.1 Material	- 22 -
2.1.1 Geräte	- 22 -
2.1.2 Verbrauchsmaterial	- 23 -
2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits	- 24 -
2.1.4 Oligonukleotide	- 26 -
2.1.5 Antikörper	- 26 -
2.1.6 Puffer und Lösungen	- 26 -
2.1.7 Software und Internetdienste	- 26 -
2.2 Methoden	- 28 -
2.2.1 Histologische Methoden	- 28 -
2.2.1.1 Versuchstiere	- 28 -
2.2.1.2 Fixierung des Nierengewebes	- 28 -
2.2.1.3 Einbettung in Paraffin	- 29 -
2.2.1.4 Anfertigung von Paraffinschnitten	- 30 -
2.2.1.5 Immunhistochemische Färbung	- 30 -
2.2.2 Dreidimensionale Rekonstruktion	- 31 -
2.2.2.1 Akquisition und Digitalisierung	- 31 -
2.2.2.2 Datenaufbereitung mittels <i>ImageJ</i>	- 31 -
2.2.2.3 Rekonstruktion mittels <i>Amira</i>	- 33 -

2.2.3 Molekularbiologische Methoden	- 36 -
2.2.3.1 Isolierung von Total-RNA aus Nieren	- 36 -
2.2.3.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	- 36 -
2.2.3.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)	- 37 -
3. Ergebnisse	- 38 -
3.1 Entwicklung des präglomerulären arteriellen Gefäßbaumes	- 39 -
3.2 Änderungen der Reninexpression in der Nierenentwicklung	- 52 -
3.3 Zelluläre Analyse der Reninexpression	- 67 -
3.4 Quantifizierung der Reninexpression in der Nierenentwicklung	- 69 -
4. Diskussion	- 72 -
4.1 Renale Gefäßbaumentwicklung	- 73 -
4.2 Lokalisation der Reninexpression während der Nephrogenese	- 75 -
4.3 Quantifizierung der Reninexpression	- 78 -
4.4 Mögliche Funktion des Renins während der Entwicklung	- 79 -
4.5 Ausblick	- 82 -
5. Zusammenfassung	- 83 -
6. Literaturverzeichnis	- 85 -
7. Anhang	- 100 -

1. Einleitung

1.1 Die Nierenentwicklung

1.1.1 Frühembryonale Nephrogenese

In der frühen Embryonalentwicklung werden bei Reptilien, Vögeln und Säugern räumlich und zeitlich nacheinander drei verschiedene Nierengenerationen angelegt, die Vorniere (Pronephros), die Urniere (Mesonephros) und die Nachniere (Metanephros) (Langman, 1985). Dabei bilden sich zunächst von kranial nach kaudal im späteren Hals- und Brustbereich die renalen Übergangsorgane (Pronephros und Mesonephros) und in der Beckenregion die bleibende Niere (Metanephros). Während der Pronephros funktionsunfähig und der Mesonephros nur kurze Zeit exkretorisch aktiv ist, erfüllt der Metanephros dauerhaft die Nierenfunktion (Saxén, 1987).

Entwicklungsphysiologisch entsteht der Metanephros erst nach Rückbildung von Pro- und Mesonephros am distalen Ende des Wolff'schen Ganges, kurz vor dessen Einmündung in die Kloake. Hier bildet sich eine nach dorsal wachsende Ausstülpung, die Ureterknospe (Abb.1.1). Der Ursprung der Nachniere geht von zwei verschiedenen Gewebstypen aus, die beide mesodermaler Herkunft sind, den Epithelzellen der Ureterknospe und dem unmittelbar benachbart liegenden metanephrogenen Blastem, das aus einem locker organisierten Zellverband besteht (Rüsse and Sinowatz, 1998; Herzlinger, 1994).

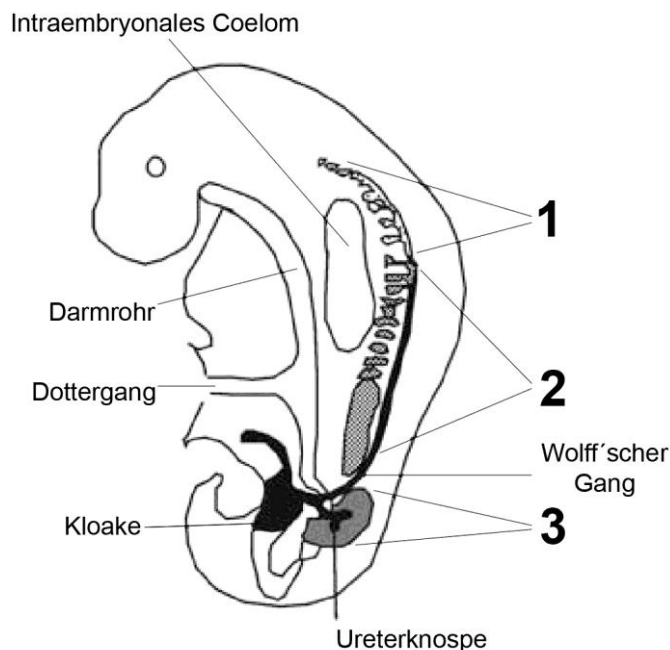


Abb.1.1 – Die drei Nierenanlagen im Überblick. Gezeigt sind von kranial nach kaudal die Anlagen des Pronephros (1) (zu diesem Zeitpunkt schon in Rückbildung), des Mesonephros (2) und des Metanephros (3). Das organbildende intermediäre Mesoderm, bzw. die daraus hervorgegangenen Epithelien sind grau gerastert dargestellt. Der Wolff'sche Gang (schwarz dargestellt) bildet sich dorsal aus dem Urnierengang und ist mit der Kloake verbunden (Abbildung nach Langman, 1989).

Der Kontakt der Ureterknospe mit dem nephrogenen Blastem induziert mehrere dichotome Teilungen, deren Lumina das spätere Sammelrohrsystem und Nierenbecken bilden (Abb.1.2).

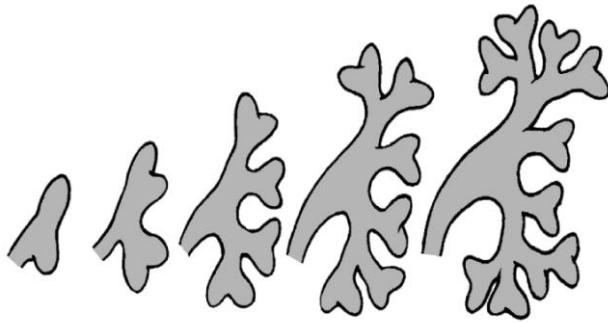


Abb.1.2 – Schematische Darstellung der Bildung der Nephronanlage durch dichotome Aufteilung der Ureterknospe im anliegenden metanephrogenen Blastem (Abbildung nach Saxén, 1987).

Die Aufzweigungen der Ureterknospe wachsen als blind endende kolbig erweiterte Sammelrohranlagen, die so genannten Ampullen, in die unter der Capsula fibrosa liegende nephrogene Zone ein. An deren Spitze wird durch reziproke Interaktion mit dem metanephrogenen Blastem die Nephronbildung induziert (Grobstein, 1955; Horster et al., 1997; Abb.1.3).

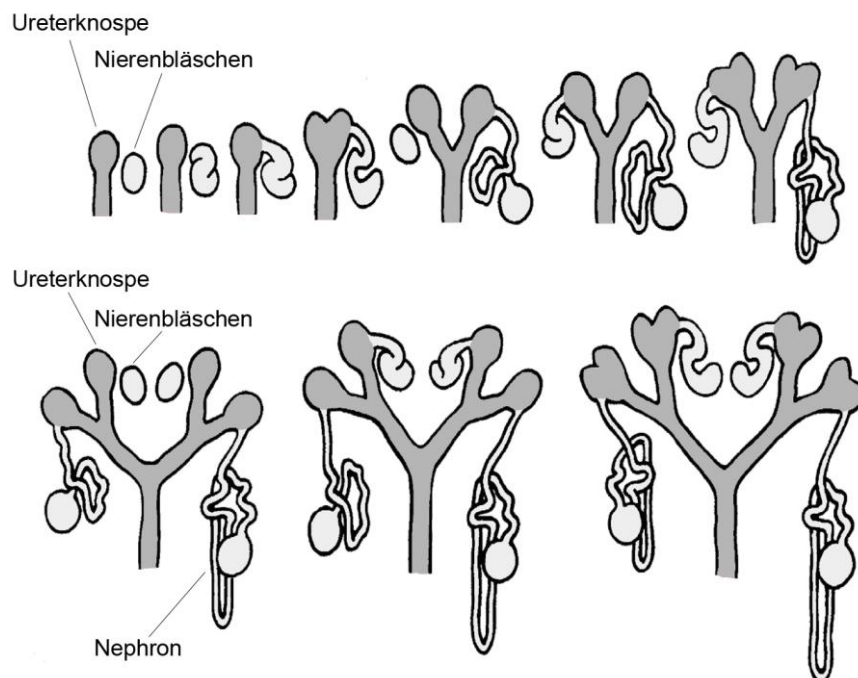


Abb.1.3 – Schematische Darstellung der Entwicklung eines unreifen Nephrons (Abbildung nach Saxén, 1987).

Die Sammelrohrampulle durchläuft nach erfolgter Nephroninduktion jeweils eine weitere dichotome Teilung. Gleichzeitig kommt es durch zahlreiche Zellteilungen im Ampullenhalsbereich zu einer Verlängerung des Sammelrohrtubulus (Neiss, 1982). Dies bewirkt ein Verschieben der Sammelrohrampullenspitzen in das nephrogene Mesenchym unterhalb der Kapsel. Dadurch wird die Bildung einer neuen Generation von Nephronen induziert. Nachdem sich dieser Vorgang vielfach wiederholt, kommt es

während der Nierenentwicklung zu einem konsekutiven Wachstum, wobei die medullär gelegenen Nephrone weiter entwickelt sind, als diejenigen im äußeren Kortex der Niere (Osathanondh et al., 1966).

1.1.2 Nephronbildung

Durch den induktiven Reiz der Ureterknospe verdichtet sich das metanephrogene Blastem kappenartig über der Ureterknospe (Abb.1.4a, b). Dabei erfolgt eine Umwandlung der Mesenchymzellen in Epithelzellen. Dies wird morphologisch durch den Nachweis von Adhäsionsmolekülen, der Bildung einer Basalmembran sowie der Polarisation der Zellen fassbar. Durch Proliferation und Abschnürung entsteht ein epitheliales Nierenbläschen, das sich in die Länge streckt und zunächst eine kommaförmige Gestalt annimmt (Abb.1.4c).

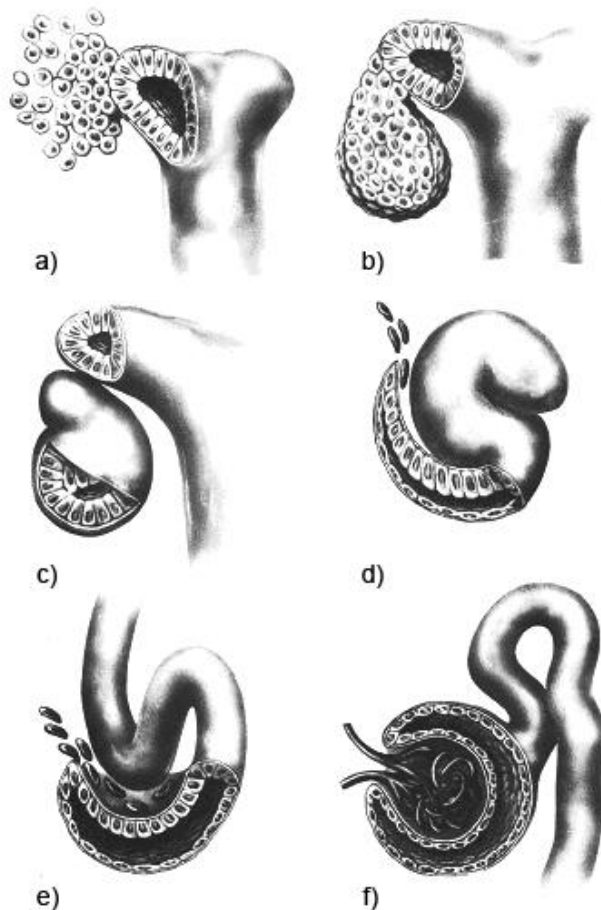


Abb.1.4 – Nephrogenese: Reziproke Interaktion zwischen der embryonalen Sammelrohrampulle und dem umliegenden Mesenchym. Das Epithel der Ampullenspitze induziert das umgebende kompetente Mesenchym. Dadurch kommt es zur Kondensation des Mesenchyms (a); Bildung eines Nierenbläschens (b); Umwandlung des Nierenbläschens zu einem kommaförmigen Körperchen (c) und in Folge zu einem S-förmigen Körperchen (d); Weiterentwicklung des S-förmigen Körperchens zum Nephron (e, f) (Abbildung nach Saxén, 1987).

Durch Bildung zweier Spalten, zuerst am proximalen, dann am distalen Pol, entwickelt es sich zu einem S-förmigen Körperchen (Abb.1.4d).

Dieses entwickelt sich zu Beginn isoliert und nimmt dann Kontakt zum Sammelrohr auf. Bei seiner weiteren Reifung bildet sich an der unteren peripheren Seite eine löffelartige Vertiefung. Dieser Abschnitt differenziert zur Bowman'schen Kapsel. In die Vertiefung

zieht ein Blutgefäß ein, das sich kapillarisiert und zum Glomerulus mit Vas afferens und Vas efferens entwickelt (Abb.1.4e, f). Das Nierenkanälchen verlängert sich stark und bildet den proximalen und distalen Tubulus sowie die Henle'sche Schleife des Nephrons (Kazimierczak, 1971; Ekblom et al., 1981; Saxén, 1987; Taugner and Hackenthal, 1989).

Während der Prozess der Nephronbildung beim Mensch mit der Geburt bereits abgeschlossen ist, geht er bei Mäusen und Ratten noch postnatal weiter, was sie zu einem geeigneten Studienobjekt für extrauterine Untersuchungen in der Nierenentwicklung macht. So findet sich in einer neugeborenen Maus- oder Rattenniere ein konzentrisches Muster für die verschiedenen Reifegrade der Nephrone. Unterhalb der Capsula fibrosa liegen im embryonalen Gewebe des äußeren Kortex die renalen Vesikel und kommaförmigen Körperchen und weiter medullär die S-förmigen Körperchen. Im mittleren Kortexbereich findet man reifende und im inneren Kortex und in der Medulla ausdifferenzierte Nephrone (Fischer et al., 1995).

Bei der Maus beginnt die Metanephrosentwicklung am 10. bis 11. Embryontag und schließt mit dem 7. bis 10. nach der Geburt ab. Die Tragedauer beträgt 19 Tage (Gomez et al., 1997).

1.2 Das Blutgefäßsystem der Niere

1.2.1 Vaskuläre Entwicklung

Die Gefäßbildung und Nephrogenese sind parallel verlaufende und aufeinander abgestimmte Prozesse (Sariola, 1991). Der Ursprung und Mechanismus, dem die Blutgefäßbildung in der Niere unterliegt, sind noch nicht völlig verstanden.

Zwei Prozesse wurden für die Gefäßbildung beschrieben, Angiogenese und Vaskulogenese. Unter Angiogenese versteht man die Aussprossung von neuen Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Risau and Ekblom, 1986; Risau et al., 1988). Sie beinhaltet das Ablösen der Basalmembran und der Extrazellulärmatrix, die Migration der Endothelzellen, Proliferation und Röhrenbildung (Folkman and Shing, 1992). Währenddessen ist die Vaskulogenese als die Neusynthese von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen, wie Angioblasten, definiert (Abrahamson et al., 1998; Risau and Ekblom 1986; Risau et al., 1988). Diese Angioblasten differenzieren in situ zu endothelialen Clustern und Vesikeln und bilden somit vaskuläre Kanäle (Noden, 1989).

Die Modelle, Vaskulogenese und Angiogenese müssen sich nicht gegenseitig ausschließen. Beide sind bislang für die Niere beschrieben worden. So postulierte

Saxén (1987), dass die Gefäßbildung in der Niere durch Angiogenese von der embryonalen Aorta ausgeht. Des Weiteren gibt es Befunde, dass glomeruläres Epithel, nicht aber Blutgefäße aus unvaskularisiertem metanephritischem Blastem in vitro entstehen kann (Bernstein et al., 1981). Außerdem resultierte die Transplantation von unvaskularisiertem Blastem in einen Wirt mit bereits bestehenden Gefäßen im Wachstum von Blutgefäßen und glomerulären Kapillaren (Abrahamson et al., 1991; Sariola et al., 1983).

Andererseits wurden Vorläufer von Endothel- oder Glattmuskelzellen in der sich entwickelnden Niere gefunden, bevor die Gefäßbildung detektiert werden konnte (Gomez et al., 1997; Tufro-McReddie et al., 1995; Kloth et al., 1994; Carey et al., 1992; Robert et al., 1996).

Ein essentielles Schlüsselereignis in diesem Zusammenhang ist vermutlich die metanephritische Induktion des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und dessen Rezeptoren Flt-1 und Flk-1, welche die Aktivierung und Bildung von Endothelzellen bewirken (Tufro-McReddie et al., 1995 und 1997; Kitamoto et al., 1997; Robert et al. 1998; Tufro et al., 1999; Mattot et al., 2002). Die Wichtigkeit von VEGF für die Gefäßbildung beziehungsweise dessen Regulation wurde anhand Flt-1-defizienter Mäuse, die aufgrund des Fehlens des vaskulären Systems im frühen embryonalen Stadium sterben, belegt (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996; Shalaby et al., 1995; Fong et al., 1995). Des Weiteren zeigten Kitamoto et al. (1997) morphologische Abnormitäten des Blutgefäßnetzes und der Glomeruli nach einer in vivo Depletion der endogenen VEGF Aktivität durch Antikörper in neugeborenen Mäusen. Außerdem wurde ein kompensatorischer Anstieg der VEGF Expression in der Bowman'schen Kapsel beobachtet. Demnach spielt VEGF bei der Kommunikation zwischen der Bowman'schen Kapsel und den Endothelzellen der Kapillaren während der Nephrogenese eine wichtige Rolle (Kitamoto et al., 1997).

Ein weiterer essentieller Schritt scheint die endotheliale Produktion des *platelet derived growth factor-beta* (PDGF- β) zu sein, der das Heranziehen von Pericyten und Glattmuskelzellen verursacht, um die neu gebildeten Gefäße zu stabilisieren (Lindahl et al., 1998; Hellstrom et al., 1999; Eng et al., 2005). Dieser Prozess benötigt auch die Funktion von Ephrin-2 (Takahashi et al., 2002; Foo et al., 2006). Ferner gibt es Befunde, die darauf hinweisen, dass neurotrophe Faktoren (Kloth et al., 2000) und die Notch-Signalkaskade (McCright et al., 2001), zusätzlich zu VEGF und PDGF, beteiligt sind. Das komplexe Verzweigungsmuster des intrarenalen Gefäßbaumes scheint durch Sprossung und Intussuskeption zu entstehen (Makanya et al., 2005).

1.2.2 Das Blutgefäßsystem in der adulten Niere

In der adulten Niere bildet sich ein mikrovaskuläres Gefäßsystem aus zwei hintereinander geschalteten Kapillarnetzen. Das erste liegt in den Glomeruluskapillaren und dient der Primärharnbildung, während sich das zweite, das peritubuläre Kapillarnetz, in der Medulla befindet. Dieses steht im Dienst der Harnkonzentration und ist für den Abtransport in der Medulla resorbierter Stoffe verantwortlich (Leonhardt et al., 1987).

In der Literatur wird beschrieben, dass die arterielle Blutversorgung der Niere durch die Arteria renalis, die am Hilus der Niere eintritt, erfolgt und sich im Bereich des Sinus renalis in die Arteriae interlobares, die in das Nierenparenchym eindringen, aufteilt. Von diesen A. interlobares entspringen die A. arcuatae, die bogenförmig an der Mark-Rinden-Grenze verlaufen und sowohl den Kortex als auch die Medulla versorgen (Abb.1.5). In der Rinde zweigen von den A. arcuatae die A. interlobulares ab, aus denen in fast regelmäßigen Abständen die afferenten Arteriolen hervorgehen. Diese teilen sich in den Glomeruli in die glomerulären Kapillaren auf, in dessen Bereich die Ultrafiltration des Blutes abläuft.

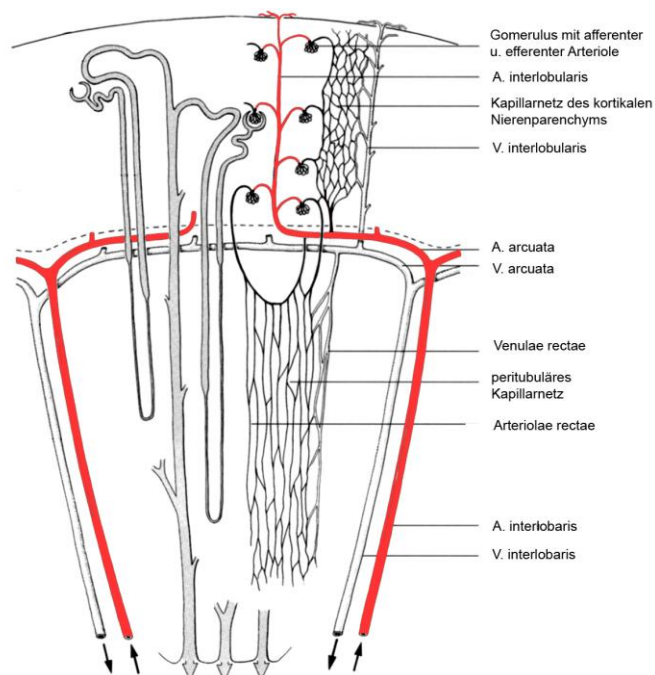


Abb.1.5 – Schematische Darstellung des Blutgefäßsystems

Die Kapillarschlingen münden in die efferenten Arteriolen, die sich dann erneut aufzweigen. Der Durchmesser der zuführenden Arteriolen ist deutlich größer als derjenige der abführenden Arteriolen. Dies trägt zur Aufrechterhaltung des Filtrationsdrucks innerhalb der Glomeruli bei. Aufgrund der unterschiedlichen Lage der Glomeruli in der Niere müssen auch verschiedene Typen von efferenten Arteriolen voneinander

abgegrenzt werden. So geben die efferenten Arteriolen oberflächlich gelegener Glomeruli die peritubulären Kapillaren ab, die ein Gefäßnetz um die Tubuli in der Nierenrinde bilden. An die efferenten Arteriolen aus tiefer gelegenen Glomeruli (sog. juxtamedulläre Glomeruli) setzen die Vasa recta an, die in langen Kapillarschleifen in das Nierenmark eintauchen. Vasa recta und peritubuläre Kapillaren münden schließlich in die Venae interlobulares, die das Blut über die Venae arcuatae und Venae interlobares zur Vena renalis leiten (Junqueira et al., 2002; Klinke und Silbernagel, 1996; Anderhuber and Weiglein 1992; Abrahamson et al., 1991). Die Durchblutung der adulten Niere innerhalb des Parenchyms ist nicht homogen. So entfallen rund 80% der gesamten renalen Durchblutung auf den Kortex, während 15% juxtamedullär und nur 5% in der inneren Medulla gemessen werden (Aukland, 1975; Fourman and Moffat, 1971).

Der Mechanismus, der die renale arterielle Gefäßbaumbildung kontrolliert ist bislang nicht ausreichend verstanden. An der korrekten Ausbildung der Niere und deren Blutgefäßsystem sind womöglich Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) beteiligt (Tufro-McReddie et al., 1995; Hilgers et al., 1997; Yosipiv et al., 1996; Gomez, 1998).

1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

1.3.1 Das RAAS in der adulten Niere

Das RAAS spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Blutdrucks und der Aufrechterhaltung des Salz- und Wasserhaushaltes im Körper (Wagner and Kurtz, 1998; Davis and Freeman, 1976). Dabei löst die Protease Renin, die in der Niere gebildet wird, die Enzymkaskade des RAAS aus. Im ersten Schritt der Kaskade katalysiert Renin die Abspaltung des Dekapeptids *Angiotensin I* (ANGI) aus dem in der Leber gebildeten und in das Blutplasma abgegebene Glykoprotein *Angiotensinogen* (Abb.1.6). ANG I selbst ist biologisch inaktiv und wird durch das im Lungenepithel produzierte *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) um zwei Aminosäuren verkürzt, wobei das Oktapeptid *Angiotensin II* (ANGII) gebildet wird. ANGI stellt dabei den eigentlichen physiologischen Effektor des Systems dar. Seine Wirkungen werden durch Angiotensinrezeptoren vermittelt, von denen bislang zwei Typen bekannt sind, ANGII-Typ 1 und Typ 2 (AT1 und AT2). ANGI wirkt stark vasokonstriktorisch was unmittelbar zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes und infolgedessen zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt.

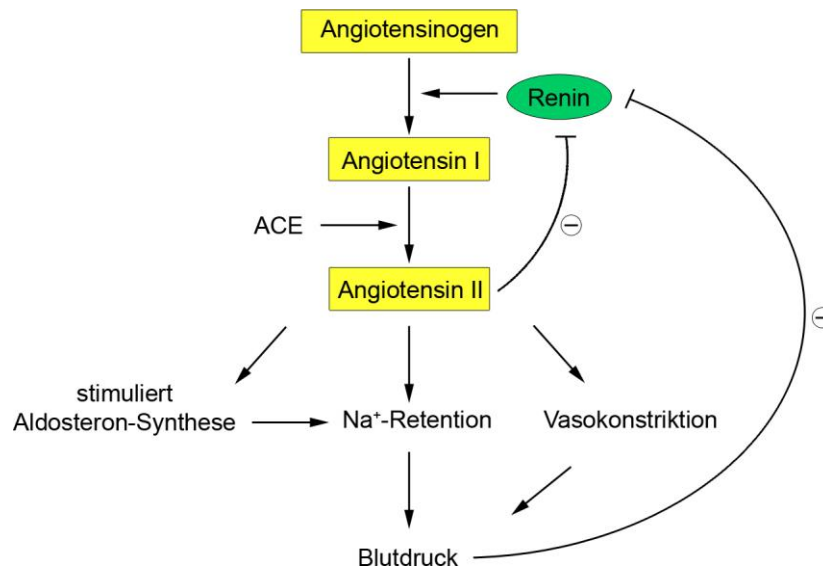


Abb.1.6 – Schematische Darstellung der Signalkaskade des RAAS

Außerdem stimuliert ANGII das Durstgefühl sowie die Synthese und Sekretion des Steroidhormons Aldosteron in der Nebenniere. Aldosteron wiederum bewirkt in der Niere eine verstärkte Rückresorption von Wasser und Kochsalz und führt dadurch zu einer Erhöhung des Blutvolumens und des Blutdrucks (Hackenthal et al., 1990).

Da weder die Konzentration von Angiotensinogen, noch von ACE limitierend für die Bildung von ANGII ist, hängt die Aktivität des RAAS unter physiologischen Bedingungen vor allem von der Reninkonzentration im Blut und somit von der Reninsynthese und -sekretion ab (Kurtz, 1989; Peters and Clausmeyer, 2002; Mercure et al., 1998).

1.3.1.1 Renin

Im adulten Säugetier wird das im Blut zirkulierende Renin zwar auch im Herz, Gehirn und Nebenniere gebildet, wo es das RAAS lokal aktiviert. Hauptsächlich wird Renin in der Niere in Zellen der Media der afferenten Arteriolen am terminalen Pol, der in das glomeruläre Kapillarnetzwerk führt, synthetisiert und gespeichert (Abb.1.7) (Latta et al., 1987; Barajas et al., 1986; Deschepper et al., 1986; McGowan et al., 1980; Taugner et al., 1979).

Renin wird als Präprorenin transkribiert und translatiert. Nach Abspaltung der Präsequenz, die das Signalpeptid für die Translokation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums darstellt, entsteht das enzymatisch inaktive Prorenin, das im Golgi-Apparat in sekretorische Vesikel verpackt wird. In diesen Vesikeln erfolgt die Aktivierung des Renins durch Verkürzung seines N-Terminus um 46 Aminosäuren

und dessen Speicherung bis zur Freisetzung in die Zirkulation durch Exozytose (Taugner et al., 1987).

Aufgrund der zahlreichen Reninspeichergranulen entwickeln die reninbildenden Zellen eine epitheloide Form. Diese juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JGE-Zellen) ersetzen üblicherweise die typische Glattmuskelzelle der Arteriolen und formen die Gefäßwand des Vas afferens. Ferner stehen sie in Verbindung mit den Macula densa (MD)-Zellen des distalen Tubulus. Zusammen mit MD-Zellen, den extraglomerulären Mesangialzellen und endothelialen Glattmuskelzellen bilden sie den juxtaglomerulären Apparat (JGA) (Taugner et al., 1984).

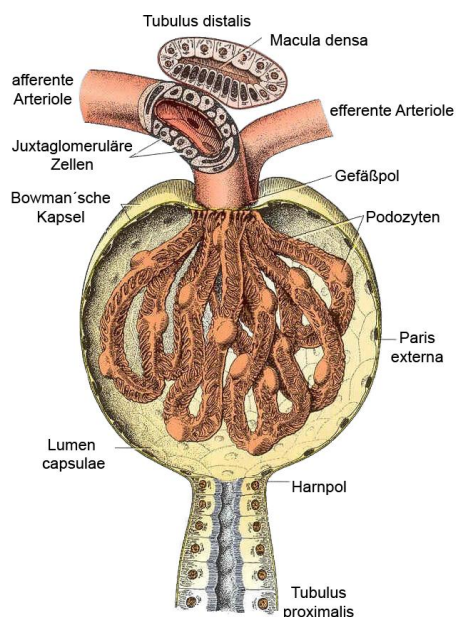


Abb.1.7 – Schematische Darstellung eines Glomerulus. Oben befindet sich der Gefäßpol mit der afferenten und efferenten Arteriole. Diese bilden zusammen mit der Macula densa den juxtaglomerulären Apparat der Niere. In der Tunica media der afferenten Arteriole liegen die juxtaglomerulären Zellen (Abbildung nach Junqueira, 2002).

Die Media-Zellen der efferenten Arteriolen oder extraglomeruläre Mesangialzellen exprimieren speziesabhängig nur selten Renin (Kon, 1999).

Die Zahl der reninbildenden Zellen in der adulten Niere ist nicht konstant, sondern ändert sich parallel zum Stimulationszustand des Reninsystems, wobei eine retrograde Rekrutierung von Zellen in den afferenten Arteriolen, den Arteriae interlobulares bis hin zu größeren Arterien auftreten kann (Fuchs et al., 2002). Die Rekrutierung scheint dabei nach einem noch nicht verstandenen diskontinuierlichen Muster zu erfolgen, welches sich z.B. in einer „streifenförmigen“ Expression von Renin in der Media der A. afferentes und A. interlobulares äußern kann (Fuchs et al., 2002; Reddi et al., 1998, Casellas et al., 1994). Auch während des Alterns und bei Diabetes wurde ein Rückgang von JGE-Zellen beobachtet (Sequeira Lopez et al., 2001). Die zellulären Mechanismen, die diese Rekrutierung vermitteln, sind nicht verstanden.

1.3.1.2 Regulation der Reninsynthese und -sekretion

Die Synthese und Sekretion von Renin unterliegt einer komplexen Regulation durch eine im Folgenden angeführte Vielzahl systemischer und lokaler Faktoren.

So führt ein Abfall des *Blutdrucks* und somit auch des renalen Perfusionsdrucks zu einem Anstieg der Reninsekretion und -synthese. Umgekehrt führt ein Anstieg des Blutdrucks zu deren Abnahme (Taugner et al., 1984; Moffet et al., 1986; Nafz et al., 1997). Dabei ist der renale Barorezeptor für die Vermittlung des Signals verantwortlich. Durch den intraluminalen Druck wird die Wandspannung der Gefäße verändert, was eine Dehnung der JGE-Zellwand verursacht und vermutlich zu einer Änderung des Membranpotentials der JGE-Zellen führt und so die Reninsekretion vermindert (Fray and Lush, 1976 und 1984, Carey et al., 1997; Bader and Ganten, 2000).

Neben dem Blutdruck spielt auch der *Salzhaushalt* eine wichtige Rolle bei der Regulation des RAAS. So führt eine vermehrte Kochsalzaufnahme zur Hemmung der Reninsynthese und -sekretion, während eine verminderte Aufnahme mit einer Stimulation einhergeht. Dabei ist die Macula densa als Chloridsensor an der Messung der Salzkonzentration beteiligt (Goormaghtigh et al., 1937; Vander., 1967; Schnermann, 1998).

Das *Sympathische Nervensystem* ist ein weiterer Regulator des Reninsystems. Die Aktivitätssteigerung der sympathischen Nervenfasern führt zu einer Stimulation des Reninsystems. Die Wirkung beruht hauptsächlich auf der Stimulation β 1-adrenerger Rezeptoren über die Aktivierung des cAMP-Signalweges durch lokal sezernierte oder zirkulierende Katecholamine wie Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin. Voraussetzung für diese stimulatorische Wirkung ist die direkte Nachbarschaft der Katecholamin sezernierenden Zellen zum JGA, da nur diese Zellen β 1-adrenerge Rezeptoren exprimieren (Wagner et al., 1999; Holmer et al., 1997).

Neben diesen als „klassisch“ zu bezeichnenden Regulationsfaktoren des renalen Reninsystems beeinflussen auch *lokale Faktoren*, wie Prostaglandine, Stickstoffmonoxid (NO), Endotheline und Zytokine, welche in unmittelbarer Nähe der JGE-Zellen gebildet werden, die Synthese und Sekretion von Renin (Wagner et al., 1998).

Betrachtet man die Reninexpression auf zellulärer Ebene, so gelten hier klassische second messenger, wie das zytosolische Ca^{2+} , cGMP und cAMP als die wesentlichen Regulatoren bei der Synthese und Sekretion von Renin (Kurtz, 1989; Hackenthal et al., 1990).

Während in anderen sekretorischen Geweben eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen die Sekretion initiieren, wirkt Ca^{2+} in JGE-Zellen inhibitorisch auf die Reninfreisetzung, was als Ca^{2+} -Paradoxon bezeichnet wird (Schweda and Kurtz, 2003;

Persson, 2003; Grünberger et al., 2006). ANG II bindet an den AT1-Rezeptor, wodurch die Phospholipase C (PLC) aktiviert wird. PLC katalysiert die Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ bewirkt einen Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration, das wiederum zusammen mit DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Gleichzeitig hemmt der erhöhte Ca²⁺-Spiegel die Reninsekretion.

Eine Beteiligung von cGMP an der Regulation der Reninsekretion wurde mehrfach beschrieben (Kurtz, 1989; Romero, 1992). Die genaue Rolle des cGMP in diesem Zusammenhang wird jedoch noch kontrovers diskutiert, da bei einer erhöhten cGMP Konzentration sowohl inhibitorische (Wagner et al., 1998), als auch stimulatorische (Reid and Chiu, 1996; Friis et al., 2002) Wirkungen auf die Reninsekretion beobachtet wurden.

Hinsichtlich der zellulären Signalwege, welche die Reninexpression regulieren, ist gegenwärtig der cAMP Weg am besten untersucht. Eine Stimulation dieses Weges kann z.B. durch Katecholamine, die an β -adrenerge-Rezeptoren binden, oder Prostaglandine erfolgen (Kurtz et al., 1989). Dabei wird die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Aktivierung des Gs alpha Proteins und der Adenylatzyklase bewirkt (Kurtz et al., 1989; Jensen, 1996). cAMP wiederum stimuliert sowohl die Expression über CREB/CRE als auch die Sekretion über die Proteinkinase A, durch welche Protonenpumpen in den Reninvesikeln aktiviert werden, was einen Anstieg des Protonengradienten und somit einen K⁺-Einstrom über den K⁺/H⁺-Austauscher zur Folge hat (Ying et al., 1997; Pan et al., 2001; King and Fray, 1994).

1.3.2 Das RAAS während der Nephrogenese

Während der frühen Embryonalentwicklung ist das RAAS hoch aktiv (Gomez and Norwood, 1995), wobei die Komponenten des RAAS in der sich entwickelnden Niere vermehrt exprimiert werden (Hilgers et al., 1997). Vor allem findet man deutlich erhöhte Werte für Renin (Schutz et al., 1996; Hilgers, Norwood et al., 1997; Gomez, 1998, Gomez et al., 1999; Guron and Friberg, 2000). So ist bei Ratten der renale Renin-mRNA Spiegel am 20. Embryonaltag 20-mal höher als bei adulten Tieren. Bei neugeborenen Ratten wird, verglichen mit adulten Tieren ein 10-mal höherer Renin mRNA Spiegel detektiert (Gomez et al., 1989; Yosipiv et al., 1996; Guron and Friberg, 2000). Die Reninexpression nimmt während der Nierenentwicklung stetig zu und fällt postpartal wieder ab (Minuth et al., 1981). Ähnliche Befunde ergaben auch die Untersuchungen an anderen Spezies, wie Kaninchen (Drukker et al., 1983) oder Schaf (Carbone et al., 1993).

Die klassische juxtaglomeruläre Lokalisation von reninbildenden Zellen ist nur für die ausgereifte Niere typisch (Barajas et al., 1986; Taugner et al., 1979). Während der Nierenentwicklung findet man Reninexpression auch in der Media größerer präglomerulärer Gefäße bis hin zur A. renalis, wobei mit fortschreitender Reifung der Niere die großen Gefäße die Reninsynthese einstellen. Im Adultzustand bleibt die Reninexpression nur in den juxtaglomerulären Zellen erhalten. Allerdings ergibt sich aus der Literatur kein einheitliches Bild für die Lokalisation und den Zeitpunkt der ersten Reninexpression. Unstrittig ist, dass eine Änderung des Reninexpressionsmusters während der Nierenentwicklung zu verzeichnen ist. Dieses phänomenologische Muster des Auftauchens und Verschwindens von reninbildenden Zellen ist in allen Säugerspezies, z.B. Hamster (Dodge, 1993), Kaninchen (Drukker et al., 1983), Schaf (Kon 1994, Carbone et al., 1993), Schwein (Kon et al., 1989; Egerer et al., 1984), einschließlich des Menschen (Graham 1992; Celio et al., 1985; Phat et al., 1981) gefunden worden. Besonders detailliert wurde die Maus- (Minuth et al., 1981; Kon, 1989) und Rattenniere (Gomez, 1986, 1988 und 1989; Jones et al., 1990) untersucht. Der Mechanismus, der das An- und Abschalten der Reninexpression in den verschiedenen Segmenten der Entwicklung intrarenaler arterieller Gefäße steuert, ist unbekannt. Das gleiche gilt auch für den Faktor, der die juxtaglomeruläre Position der Reninexpression in der adulten Niere bedingt.

Die funktionelle Bedeutung dieses charakterisierten Shifts der Reninexpression in der sich entwickelnden Säugerniere ist wenig verstanden. Diskutiert wird, dass die Reninexpression als angiogener Faktor für die Verzweigung des intrarenalen Gefäßbaumes verantwortlich sei, weil in der sich entwickelnden Rattenniere Renin nicht hauptsächlich an juxtaglomerulärer Position, sondern an Verzweigungspunkten des Gefäßbaumes gefunden wurde (Reddi et al., 1998).

Bislang ist ungeklärt, wie während der Nierenentwicklung die reninbildenden Zellen entstehen und welchen Ursprung sie haben. Da reninexprimierende Zellen Myofibrille besitzen, nahm man lange an, dass sie mit vaskulären glatten Muskelzellen nahe verwandt sind bzw. sich aus glatten Gefäßmuskelzellen der afferenten Arteriolen transformieren, wozu auch ihre Lokalisation passt (Barajas, 1979; Taugner and Hackenthal, 1989; Keeton and Campbell, 1981). Eine Hypothese besagt, dass die Zellen als eigene Entität erstmals im undifferenzierten metanephrogenen Mesenchym auftreten (Sequeira Lopez et al., 2001; Reddi et al., 1998), sekundär mit dem sich entwickelnden arteriellen Gefäßbaum assemblieren und sich dann mit dem Gefäßbaum geordnet weiterverbreiten (Reddi et al., 1998). Nach einer anderen Hypothese entwickeln sich die reninbildenden Zellen in der Gefäßwand ohne absolut

nierenspezifischen Induktor, weil sich vor allem während der Entwicklung, aber etwas reduziert auch noch im adulten Organismus, reninbildende Zellen in der Mediaschicht extrarenaler Arterien finden lassen (Fuchs et al., 2002; Richoux et al., 1987).

Eine aktuellere Studie beschreibt die reninbildenden Zellen als Vorläufer für eine Reihe nicht reninexprimierender Zellen, wie glatte Muskelzellen, Epithelzellen, Mesangialzellen und extrarenale Zellen, die in Abhängigkeit vom Stimulationszustand des Renin-systems die Fähigkeit zur Reninsynthese an- bzw. abschalten (Sequeira Lopez et al., 2004). Welche Vorgänge die Transformation von diesen Zellen zu reninbildenden Zellen und umgekehrt auslösen und regulieren ist nicht bekannt (Abb.1.8).

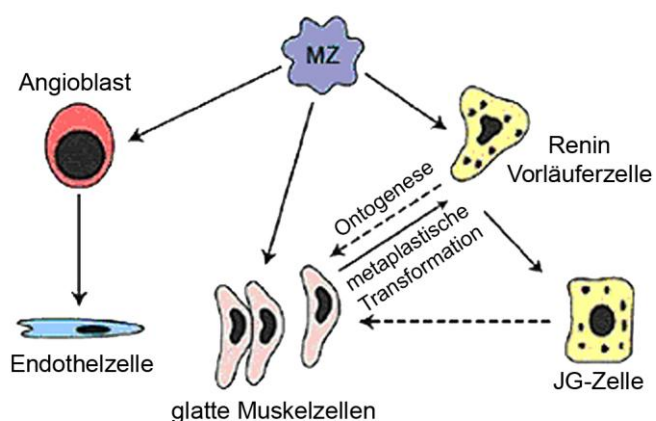


Abb.1.8 – Die Abstammung der JG-Zellen: Aus Mesenchymzellen (MZ) des Metanephros gehen Angioblasten hervor. Von diesen stammen die Endothelzellen ab. Außerdem entstehen aus den MZ glatte Gefäßmuskelzellen und Renin-Vorläuferzellen. Während der Ontogenese entstehen aus den Renin-Vorläufern entweder JG-Zellen oder arterielle glatte Gefäßmuskelzellen (Abbildung nach Sequeira Lopez et al., 2001).

Abhängig von der Spezies, beschrieben einige Arbeitsgruppen während der Nierenentwicklung eine extrarenale Reninexpression, z.B. im Mesonephros von Schwein (Egerer et al., 1984), Maus (Kon, 1989), Ratte (Richoux et al., 1987) und Mensch (Celio et al., 1985). Ebenso wurden reninbildende Zellen in der Aorta des Schweines (Egerer et al., 1984) und der Maus (Kon et al., 1989) gefunden. Kon et al. (1989) beobachteten Renin in der Maus außerdem in der Nebenniere und im Hoden. Ferner beschrieben Egerer et al. (1984) Renin im proximalen Tubulus und in efferenten Arteriolen im Schweineembryo. Gomez et al. (1989) fanden Reninexpression in der Ratte im unteren Segment der S-förmigen Körperchen, also der späteren Bowman'schen Kapsel.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Generell zeigt die Reninexpression bei allen Spezies während der Nephrogenese einen schrittweisen Shift von den großen Gefäßen, den A. renales, A. interlobares und den A. arcuatae über die A. interlobulares zu den kleinen afferenten Arteriolen bis hin zur klassischen juxtaglomerulären Position im Adultzustand. Die bisherigen Befunde beruhen auf idealisierten Extrapolationen ausgewählter histologischer Schnitte. Nach welchem räumlichen Muster die reninbildenden Zellen entlang des sich entwickelnden Gefäßbaumes auftauchen und dann wieder verschwinden ist bislang aber nicht untersucht worden. Welche Faktoren für dieses typische An- und Abschalten der Reninexpression und für das Verschwinden der reninproduzierenden Zellen während der Nierenreifung verantwortlich sind, ist ebenfalls noch unbekannt.

Bislang sind die Methoden, mit denen man den genauen Verlauf der intrarenalen Gefäßbaumentwicklung und den Mechanismus, der die Reninexpression an- und abschaltet, untersuchen kann, limitierend. Histologische Gewebeschnitte erlauben nämlich nur eine zweidimensionale Betrachtung, die Gefäße und die Reninexpression aber entwickeln sich in drei Dimensionen. Durch die Erfassung der dritten Dimension wollen wir die tatsächliche Raumstruktur der Reninexpression in der gesamten sich entwickelnden Mausniere bestimmen. In Serienfolgeschnitten von Mausnieren der Embryonalstage E13 bis zum postpartalen Tag 10 sowie im adulten Tier, soll die Reninexpression und der intrarenale arterielle Gefäßbaum durch Glattmuskelaktin als Marker für das Gefäßsystem mittels Immunfluoreszenz in Paraffinschnitten dargestellt werden. Aus diesen Folgeschnitten soll mit Hilfe der 3D-Rekonstruktionssoftware *Amira* die Entwicklung und der strukturelle Aufbau des arteriellen Blutgefäßsystems sowie die räumlich-zeitliche Verteilung der reninbildenden Zellen rekonstruiert und virtuell räumlich dargestellt werden. Eine solche dreidimensionale Rekonstruktion der Reninexpression wurde bisher noch nicht beschrieben.

Diese Methode bietet einen Ansatz, einige Basisfragen zu beantworten. Wann und wo erscheint Renin erstmalig während der Nierenentwicklung? Ist Renin zuerst an Verzweigungspunkten während der Gefäßbildung zu finden? Wie konstant ist das Expressionsmuster von Renin in vergleichbaren Gefäßsegmenten? Gibt es einen kontinuierlichen Shift der Reninexpression von großen zu kleineren Gefäßen?

Angetrieben durch diese definierten Fragen versuchen wir die Reninexpression in der sich entwickelnden normalen Mausniere zu charakterisieren, um ein Referenzsystem für weitere Untersuchungen in genetisch veränderten Tieren zu erhalten und dadurch die relevanten Genprodukte, die an der Regulation der Reninexpression beteiligt sind, zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Filtersets	
TRITC-Filter:	Filter set 43, Zeiss, Jena Anregung 533-558nm Emission 570-640nm
Cy2-Filter:	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena Anregung 450-490nm Emission 500-550nm
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Kanada
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach MR 3001 K, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena AxioStar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
PCR-Geräte	Thermocycler, OmniGene, MWG, Ebersberg Primus 96, Peqlab, Erlangen Lightcycler, Roche, Mannheim
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA

Gerät	Hersteller
	Transferpette P10, P100, P250, P1000, Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Scantisch	motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller), Ludl Electronic Products, München
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen Multidrive XL, Pharmacia, Ratingen
UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
UV-Spektrometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H UniEquip, Martinsried
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen
Wärmeblöcke	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/l
Wasserbäder	Modell W13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Labofuge 400, Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach

Produkt	Hersteller
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Lightcycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellsklingen	Feather, Köln

2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100 bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Frankfurt am Main
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First-Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/µl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x bzw. Colorless, 5x	Promega, Mannheim

Produkt	Hersteller
H ₂ O ₂ 30%	Merck, Darmstadt
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin [®] 25000 5ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
nuclease free water	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0,5μg/μl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylhydrazin Hydrochlorid, C ₆ H ₈ N ₂ x HCl	Sigma, Deisenhofen
QuantiTect [™] SYBR [®] Green PCR Kit	Qiagen, Düsseldorf
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNasin Ribonuclease Inhibitor, 40 U/μl	Promega, Mannheim
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Sevofluran SEVOrane [®]	Abbott, Wiesbaden
TRIZOL	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100pmol/µl eingestellt.

GAPDH	5'-ATG CCA TCA CTG CCA CCC AGA AG-3'
	5'-ACT TGG CAG GTT TCT CCA GGC GG-3'
Renin	5'-ATG AAG GGG GTG TCT GTG GGG TC-3'
	5'-ATG CGG GGA GGG TGG GCA CCT G-3'

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Art	Hersteller
Chicken-Anti-Renin-IgG	Primärantikörper	Davids Biotech., Regensburg
Mouse-Anti-Glattmuskel- aktin-IgG	Primärantikörper	Beckman Coulter Immuno- tech., Marseille, Frankreich
Donkey-Anti-Chicken-IgY	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg
Donkey-Anti-Mouse-IgG	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg

2.1.6 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Chemikalien für sämtliche Puffer und Lösungen in H₂O bidest. gelöst.

Immunhistochemie

Fixierlösung (Methyl-Carnoy-Lösung)

Methanol	60%
Chloroform	30%
Eisessig	10%

Fixierlösung für Perfusion

PBS	
Paraformaldehyd	4%

PBS-(Phosphate Buffered Saline) Puffer, pH 7,4

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

PBS-Otto-Puffer, pH 7.4

K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
NaCl	140 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM

Waschpuffer

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1%

Blockierlösung

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1%
HS	10%

Phenylhydrazinlösung

PBS-Otto-Puffer	
Phenylhydrazin-Hydrochlorid	0,14 mM
nach 10min Inkubation, Zugabe von H ₂ O ₂	0,0006%

Molekularbiologie6x Loading Dye

Bromphenolblau	0,09%
Xylencyanol	0,09%
Glycerol	60%
EDTA	60 mM
	add 10ml

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid	50 mg/ml
----------------	----------

10x TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer

Tris Base	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	20 mM

DEPC-H₂O

1/1000 V DEPC in H₂O bidest., schütteln, ün geöffnet
unterm Abzug stehen lassen, dann autoklavieren

2.1.7 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office 2003* geschrieben. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit *Adobe Photoshop 9.0* und *ImageJ* (Wayne Rasband, NIH, USA). Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 3* erstellt. Bei der Literaturrecherche half *PubMed* von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Des Weiteren wurde für die Mikroskopie *AxioVision Rel.4.5* von Zeiss und für die 3D-Rekonstruktion *Amira 4.1* visualization software (Mercury Computer Systems, Inc., USA) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Histologische Methoden

2.2.1.1 Versuchstiere

Für die durchgeführten Versuche wurden unbehandelte terminlich verpaarte C57/Bl6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Alle Tiere wurden bei 12h Tag-Nacht-Zyklus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Um das entsprechende Entwicklungsstadium genau festlegen zu können, wurden die Mäuse exakt für 24h zusammengesetzt und das Auseinandersetzen des Zuchtpärchens als Embryonaltag 1 gewertet.

Nach Betäubung mit Sevofluran und Genickbruch wurden die Nieren von Föten am 13., 14., 15., 16., 17. und 18. Embryonaltag, von Neugeborenen am 1., 3., 5., 7., und 10. Tag nach der Geburt und von Adulten am 90. Tag entnommen. Jeweils eine Niere pro Tier wurde für die histologische Bearbeitung sofort nach der Präparation in Fixierlösung überführt, bzw. die adulten Nieren perfundiert, während die andere, nach Schockfrost in N₂, bis zur RNA-Isolierung bei -80°C aufbewahrt wurde.

2.2.1.2 Fixierung des Nierengewebes

Durch Fixierung des Gewebes sollen autokatalytische Vorgänge verhindert und die Zellstruktur in einem möglichst natürlichen Zustand erhalten werden. Darüber hinaus wird eine Härtung des Materials und damit eine bessere Schneidbarkeit bewirkt. Die Fixierung umfasst Reaktionen zur Stabilisierung der Proteine unter Ausbildung von Querverbindungen zwischen den Eiweißmolekülen (Hess und Sinowatz, 2000).

Fixierung mit Methyl-Carnoy-Lösung

Die Nieren von embryonalen und postpartalen Mäusen wurden sofort nach der Entnahme in Methyl-Carnoy-Lösung (60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) überführt und mindestens 24h bei 4°C fixiert.

Retrograde arterielle Perfusion

Die Fixierung der Nieren der adulten Mäuse erfolgte durch eine retrograde arterielle Perfusion mit 4% Paraformaldehyd in PBS. Dazu wurden die Mäuse zunächst mit einer Kombination aus Ketamin und Xylazin (80mg/kg KG i.p.) anästhesiert. Nach Öffnen des Abdomens und Freilegen der Bauchorta wurde die Aorta unterhalb des Abganges der Arteria renalis abgeklemmt, so dass die Durchblutung der Nieren nicht beeinträchtigt wurde. Distal zur Klemme wurde der Perfusionskatheter eingeführt und festgeklammert. Zum Druckausgleich erfolgte das Öffnen der unteren Vena cava. Nach Entfernen der oberen Klemme wurden über diesen Katheter 10ml isotone NaCl-Lösung und 10 I.E. Heparin retrograd perfundiert, wobei es bei erfolgreicher Perfusion zu einer raschen Entfärbung der Abdominalorgane kam. Danach erfolgte die Fixierung mit frisch angesetztem 4% Paraformaldehyd in PBS mit konstantem Druck von 16ml/min. Die herausgenommenen perfundierten Nieren wurden bis zur Paraffineinbettung in 70% Methanol aufbewahrt werden.

2.2.1.3 Einbettung in Paraffin

Zur Vorbereitung für die Einbettung in Paraffin wurde das Nierengewebe nach vorangegangener Fixierung in Gewebe-Einbettkassetten durch eine Methanolreihe zunehmender Konzentration (2x70%, 2x80%, 2x90%, 2x100%; jeweils mindestens 30min) geführt und dabei schrittweise dehydriert. Anschließend wurde 3 x 30min in 100% Isopropanol gespült, wobei das letzte Isopropanolbad 45°C hatte. Danach wurden die Präparate in ein auf 55°C erwärmtes Isopropanol/Paraffin-Gemisch (1:1) überführt. Nach weiteren 30min wurde das Gewebe 2x mindestens 24h in 60°C warmem Paraffin inkubiert. Nachdem das Präparat völlig mit flüssigem Paraffin durchtränkt war, wurde es schließlich in Silikon-Kautschuk-Einbettformen in 60°C warmes, geschmolzenes Paraffin eingebettet. Die Abkühlung und Härtung erfolgte über Nacht bei 4°C.

2.2.1.4 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die eingebetteten Präparate auf einen Holzblock aufgeklebt. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 5µm dicke Serienschnitte angefertigt, die in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt wurden. Nach dem Aufziehen auf superfrost plus Objektträger wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 40°C mindestens 12h getrocknet. Für die anschließenden Färbungen wurden die Schnitte durch 2x15min Einbringen in 100% Xylol, 3x5min in 100% Isopropanol und 2x5min in 100% Methanol entparaffiniert.

2.2.1.5 Immunhistochemische Färbung

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis und die Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind (Romeis, 1989).

Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zunächst der primäre, unkonjugierte Antikörper an das Antigen im Gewebeschnitt. Anschließend werden die Schnitte mit einem zweiten, fluoreszierenden Antikörper, der gegen den F_c-Teil des 1. unmarkierten Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Dadurch wird der Antigen-Antikörper-Komplex detektiert. Sichtbar wird dieser Komplex durch die Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge.

Die Schnitte wurden nach Entparaffinierung zunächst 3x5min in PBS-Puffer auf dem Schüttler geschwenkt. Zur Abschwächung unspezifischer Bindungen wurden die Präparate 20min mit 3% H₂O₂ in Methanol und anschließend 30min mit 10% Horse Serum und 1% BSA in PBS bei RT blockiert. Nach Absaugen der Blockierlösungen wurden die Schnitte mit Chicken-Anti-Renin-IgG (Verdünnung 1:200) und Mouse-Anti-Glattmuskelaktin-IgG (Verdünnung 1:10; beide in Blockierlösung) beschichtet. Die Inkubation erfolgte in einer geschlossenen, feuchten Kammer üN bei 4°C.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst 3x5min mit in PBS mit 1% BSA gewaschen. Danach wurde ein sekundärer Cy2-konjugierter Donkey-Anti-Chicken-IgY (Verdünnung 1:300) und ein sekundärer Rhodamin-(TRITC)-konjugierter Donkey-Anti-Mouse-IgG (Verdünnung 1:400; beide in PBS/1%BSA) aufgetragen und in der Feuchtkammer 2h bei RT und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte ebenfalls unter Lichtausschluss 10min in PBS gespült. Zur weiteren Blockierung wurden die Präparate 10min bei 37°C in PBS mit Phenylhydrazin im Wasserbad inkubiert. Nach 10min wurde der Lösung 6% H₂O₂ bis zu einer Endkonzentration von 0,0006% zugegeben und weitere 20min inkubiert. Schließlich wurde 3x5min in PBS im Dunkeln gespült und mit Glycergel eingedeckelt.

2.2.2 Dreidimensionale Rekonstruktion

2.2.2.1 Akquisition und Digitalisierung

Die histologischen Serienschnitte von embryonalen, postpartalen und adulten Nieren wurden, wie oben beschrieben, angefertigt und gegen Renin und Glattmuskelaktin doppelimmunfluoreszent gefärbt. Die Digitalisierung der Serienschnitte erfolgte mittels eines Axiovert 200M Mikroskops mit motorisierter Objektaufgabe, einer Schwarzweiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) und der Software *AxioVision Rel.4.5* von Zeiss.

Die Objektträger mit den aufgebrauchten Schnitten wurden mit 50facher Vergrößerung schrittweise aufgenommen. Da die Nierenschnitte, gerade bei fortgeschrittenen Entwicklungsstadien, oftmals nicht vollständig abgebildet werden konnten, mussten größere Schnitte quadrantenweise akquiriert und die Teilbilder mittels *AxioVision* wieder zusammengefügt werden. Dabei ist eine Überlappung der Einzelbilder von mindestens 5% nötig.

Unter Verwendung des Fluoreszenzfilters für Cy2 wurde die Fluoreszenz für Glattmuskelaktin mit einer Wellenlänge von 450-490nm angeregt und damit die glatte Gefäßmuskulatur bei einer Emission von 500-550nm in grün sichtbar. Wechselt man auf den TRITC-Filter mit einer Anregungswellenlänge von 533-558nm sieht man das Fluoreszenzsignal von Renin mit einer Emission von 570-640nm in rot. Wichtige Parameter wie Belichtungszeit, Kontrast und Gammakorrektur wurden zunächst manuell für die beiden Kanäle anhand mehrerer Schnitte aus verschiedenen Bereichen der Niere festgelegt, gespeichert und für die Akquisition der gesamten Schnittserie angewandt. Um für die beiden Kanäle eine einzige Bilddatei pro Nierenschnitt zu erzeugen, wurde dem Glattmuskelaktin-Bild ein grüner Farbanteil zugewiesen, dem Renin-Bild ein roter. Das so entstehende Overlay-Bild wurde im Rot-Grün-Blau (RGB)-Farbraum gespeichert. Für die weitere Bearbeitung der Daten eine Konvertierung auf 8 Bit notwendig. Um einen Qualitätsverlust zu vermeiden, wurde das Grafikformat TIFF verwendet.

2.2.2.2 Datenaufbereitung mittels *ImageJ*

Bildstapelgenerierung

Da die Anzahl der Pixel der einzelnen RGB-Bilder in Länge und Breite nicht konstant war, aber gleiche Abmessungen eine wichtige Voraussetzung war, um die Daten in die Rekonstruktionssoftware portieren zu können, wurden die RGB-Bilder zunächst mittels der Graphiksoftware *ImageJ* zu einem Bildstapel (Stack) zusammengefasst.

Dabei erhielt man durch Anfügen schwarzer Ränder an die kleineren Bilder einen Stack aller Nierenschnitte mit gleich großen Bildern (Abb.2.1).

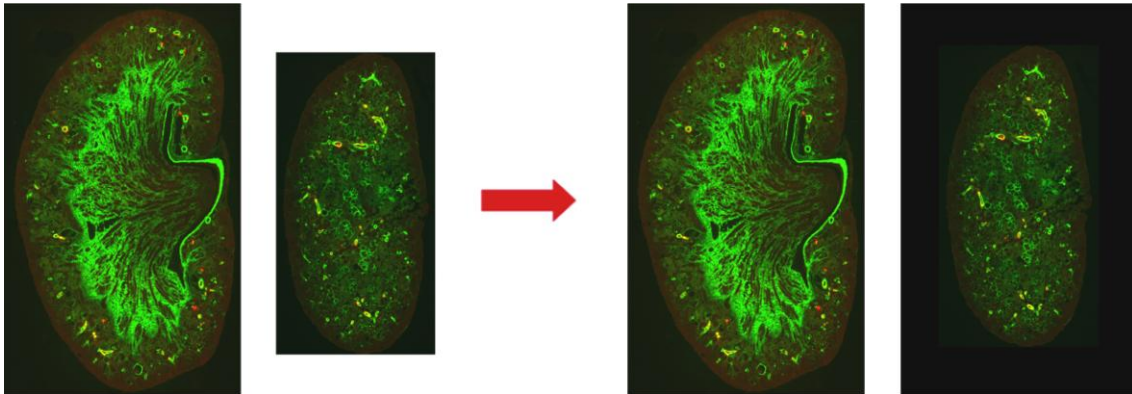


Abb. 2.1 – Bildstapelgenerierung

Farbkanaltrennung

Um es der Rekonstruktionssoftware zu ermöglichen die Fluoreszenzmarkierungen anhand der Grauwerte der Pixel von jedem aufgenommenen Bild zu erkennen, wurde der nun gleichgroße RGB-Bildstapel mittels *ImageJ* wieder in seine einzelnen Kanäle aufgetrennt, um später eine separate Datensegmentierung durchführen zu können. Da für den blauen Farbkanal keine Daten definiert waren, konnte man diesen gleich verwerfen, so dass man nur die roten und grünen Anteile erhielt. Für die Glattmuskelaktin-Bilder und Renin-Bilder wurde jeweils ein separater Stapel, der nun wieder monochrom dargestellt werden konnte, angelegt (Abb.2.2).

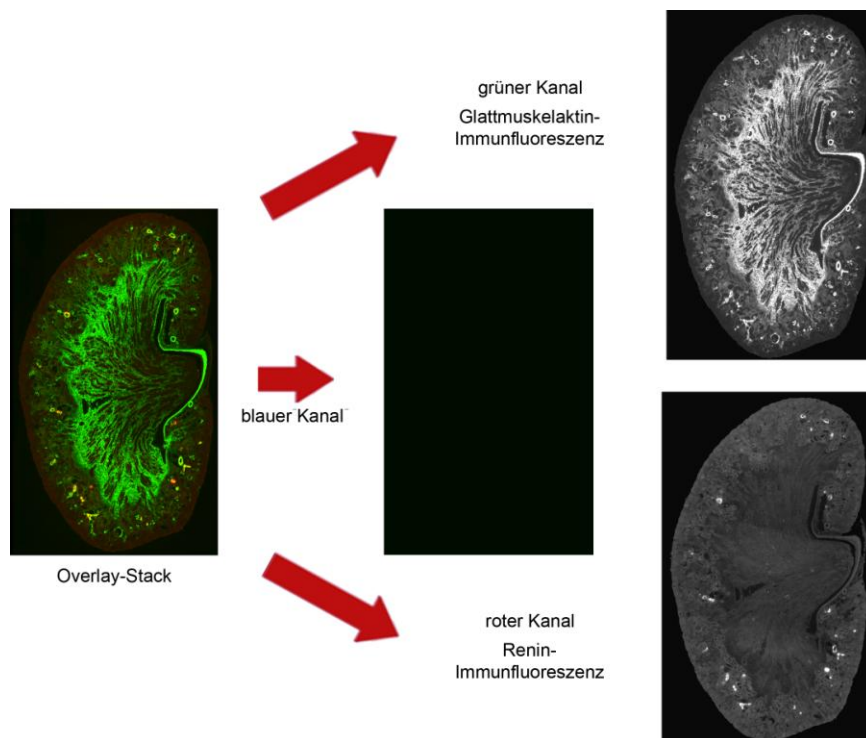


Abb. 2.2 – Farbkanalauftrennung

2.2.2.3 Rekonstruktion mittels *Amira*

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Daten nun in die *Amira 4.1* Visualization Software auf einer Grafik-Workstation importiert. Um eine korrekte Skalierung der Daten zu gewährleisten, muss zunächst das Verhältnis von Pixel zu μm berücksichtigt werden. Dies ist eine Objektiv und Kamera abhängige Größe (bei einer Verwendung des 5x Objektivs: $1\text{Pixel}=2\times 2\mu\text{m}$). Bezogen auf die maximalen Abmessungen des Bildstapels (Länge x und Breite y) und die Gesamtzahl der Schnitte und der Schnittdicke (z) wird die *boundingbox* definiert, die die maximalen Abmessungen des Datensatzes in jeder Ebene beschreibt. Da fortan mit dreidimensionalen Daten gearbeitet wurde, wird der Begriff Pixel durch den Begriff Voxel ersetzt, der der Geometrie des Raumes entsprechend eine quaderförmige Zelle darstellt. Ein Voxel hat somit $2\times 2\times 5\mu\text{m}$.

Alignierung

Da die histologischen Serienschritte variabel auf den Objektträgern angeordnet waren, müssen die Renin- und Glattmuskelaktin-Kanäle aligniert werden, d.h. über Rotations- und Verschiebungsbewegungen werden jeweils zwei aufeinander folgende Schnitte zur Deckung gebracht (Abb.2.3). Angewendet auf alle Schnitte entsteht eine vollständig ausgerichtete Niere. Zuerst werden die Glattmuskelaktin-Daten aligniert, da aufgrund zahlreicherer Immunreaktionen eine bessere Alignierung möglich ist. Die Renin-Daten können dann unter Verwendung des Glattmuskelaktin-Stapels als Referenz auf dieselben Positionen gedreht werden, um Deckungsgleichheit zu erreichen. Theoretisch wäre eine automatische Alignierung möglich. Da aber durch die beim Schneiden entstehenden Scherkräfte, die Objekte verzerrt werden, führt eine automatische Alignierung zu Fehlern bei der Überlagerung. Eine manuelle Überprüfung ist daher nötig.

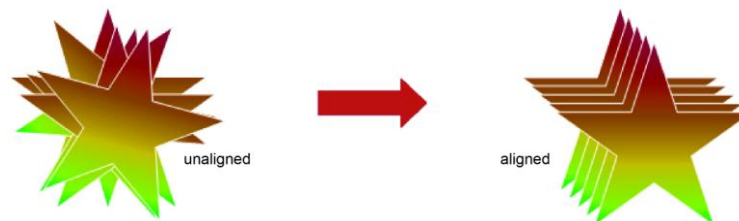


Abb. 2.3 – Alignierung

Datensegmentierung

Bei der Datensegmentierung werden Strukturen von Interesse durch verschiedene Verfahren markiert. Dieser Schritt entspricht dem zeitintensivsten Teil der Rekonstruktion. Dabei müssen die Markierungen einem definierten Material zugeordnet werden, um später daraus die Oberfläche für dieses Objekt berechnen zu können (Abb.2.4). Für das Labeln der Immunreaktionen stehen verschiedene Tools zur Auswahl. Um nur die wichtigsten Segmentierungsfunktionen zu nennen, können zum Beispiel mit dem BRUSH- oder dem LASSO-Werkzeug Fluoreszenzsignale im Freihandmodus umfahren werden. Eher von Vorteil ist die MAGIC WAND. Dabei kann man sich die unterschiedliche Verteilung der Grauwerte (0=schwarz bis 255=weiß) zunutze machen. So können Immunfluoreszenzsignale durch Festlegen einer Grauwert-Schwelle markiert werden. Da die Fluoreszenzfärbung nicht vollkommen konstant sein kann und mit Artefakten zu rechnen ist, ist eine manuelle Korrektur aber nicht ersetzbar. Weitere wichtige Werkzeuge sind FILL HOLES, REMOVE ISLANDS sowie SMOOTH LABELS. FILL HOLES entfernt Löcher in Materialien. Möchte man kleine Material-Inseln (Artefakte) automatisch entfernen lassen, steht REMOVE ISLANDS zur Verfügung. Erscheinen die Ränder der Materialien zu kantig und ist eine Glättung erwünscht, wird SMOOTH LABELS eingesetzt. Das Tool THRESHOLD ermöglicht ähnlich der MAGIC WAND eine Selektion aller Voxel in einem definierten Grauwertbereich. Der Unterschied liegt darin, dass THRESHOLD sich auf den ganzen Schnitt auswirkt, während MAGIC WAND nur den mit dem ausgewählten Voxel verbundenen Bereich markiert. Sämtliche Segmentierungsfunktionen lassen sich dabei sowohl auf alle Schnitte als auch nur auf den aktuellen Schnitt anwenden. Hin und wieder kommt es vor, dass Strukturen auf einem Schnitt schlecht von der Immunfluoreszenz erfasst werden oder, dass ein ganzer Nierenschnitt beim Schneiden verloren geht. Selektiert man die fehlende Struktur auf dem Schnitt vor und nach dem Fehler, lässt sich durch INTERPOLATE eine Interpolation für die fehlenden Strukturen oder Schnitte berechnen.

Ziel der Segmentierung war es aus den Glattnuskelaktin-Daten anhand der Fluoreszenzsignale die Gefäße und den Ureter zu erzeugen. Aus den Renin-Daten wurden die renin-positiven Zellen markiert. Die Strukturen der Kapsel, des Nierenbeckens sowie der Glomeruli konnten aufgrund der Eigenfluoreszenz der Präparate erkannt und gelabelt werden.

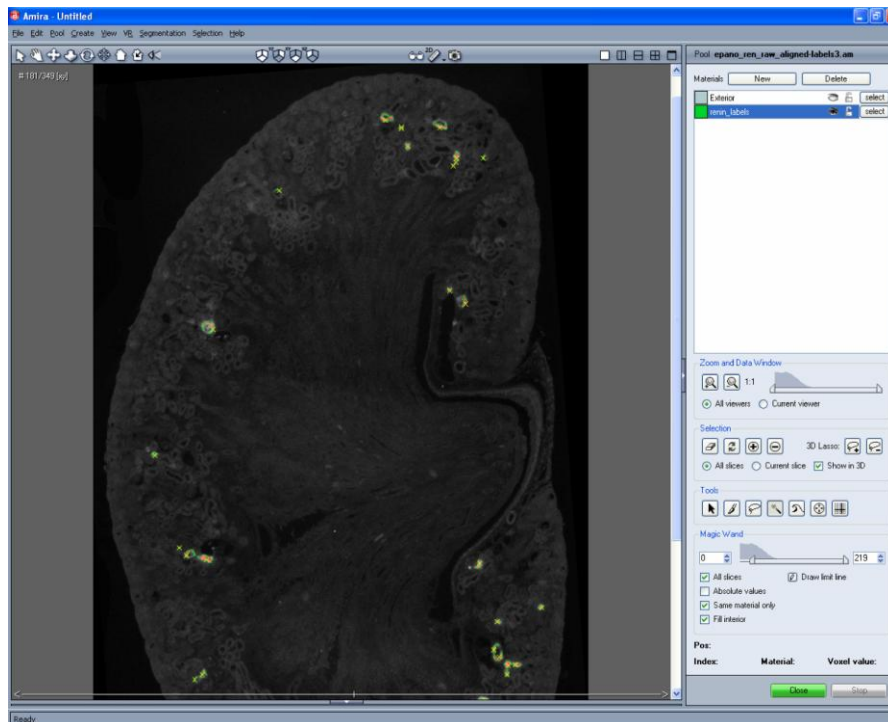


Abb. 2.4 – Datensegmentierung

Oberflächengenerierung

Die erstellten Label-Dateien dienen als Grundlage für die Berechnung der 3D-Modelle. Aus jedem Material wird eine separate Oberfläche generiert und räumlich dargestellt. Je komplexer die Modelle, das heißt je mehr Polygone für die Oberfläche berechnet werden, desto stärker wird die Leistungsfähigkeit des Rechners (RAM-Kapazität) beansprucht. Aus diesem Grund müssen die Parameter so gewählt werden, dass ein Kompromiss zwischen dem Verlust an Detailinformationen und der Darstellungsgeschwindigkeit gefunden wird. Beispielsweise kann durch Simplifizieren die Anzahl der Dreiecke und somit die Datenmenge reduziert werden. Außerdem kann die Oberfläche geglättet werden.

Es besteht nun die Möglichkeit das Objekt zu rotieren und räumlich zu analysieren. Dazu kann man alle generierten Materialien für die Kapsel, das Nierenbecken, den Ureter, den Gefäßbaum, der Glomeruli sowie das Renin einzeln oder zusammen darstellen. Darüber hinaus können die Schnittbilder durch den Datensatz angezeigt werden.

Neben der reinen Betrachtung der 3D-Modelle können Strecken und Winkel gemessen werden. Außerdem kann man die Volumina und Flächen der einzelnen Modelle bestimmen.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung von Total-RNA aus Nieren

Die RNA-Isolierung erfolgte mit TRIZOL (GibcoBRL) nach den dazugehörigen Protokollen des Herstellers. Die Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Bei sämtlichen Vorgängen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet. Glaswaren wurden durch dreistündiges Erhitzen auf 180°C RNase-frei gemacht, Benötigte Puffer und Lösungen wurden mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Alle Vorgänge wurden auf Eis durchgeführt.

Zunächst wurden die nach der Präparation eingefrorenen Organe mit einem Ultra-Turrax Mixer in 1ml TRIZOL homogenisiert und 5min bei RT inkubiert. Zum Homogenat wurden 200µl Chloroform je ml TRIZOL hinzugefügt und das Gemisch 15s stark geschüttelt. Nach 3 minütiger Inkubation bei RT und folgender Zentrifugation (4°C, 12000g 15min) der Proben konnten drei Phasen separiert werden. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde dasselbe Volumen 100% Isopropanol zugegeben, die Ansätze 10x geschwenkt und 10min bei RT inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation für 10min bei 4°C und 12000g wurde die RNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit 75%igen Ethanollösung (v/v) gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 4°C und 7500g wurde der Überstand abgesaugt, die Pellets in der Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Zur vollständigen Lösung der RNA wurden die Pellets 1-3 min bei 55°C inkubiert.

Die isolierte RNA wurde 1:50 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und photometrisch vermessen, um deren Konzentration und Qualität zu bestimmen. Eine A260/A280 - Ratio von 1,6-2,0 wurde als qualitativ gut beurteilt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.3.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die isolierte RNA wurde zunächst mittels Reverser Transkription in cDNA (komplementäre DNA) übersetzt. Um selektiv die mRNA-Moleküle (ca. 2-4% der Gesamt-RNA) umzuschreiben, wurden Oligo(dT)₁₅ Primer verwendet, die mit dem 3'-Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNA hybridisieren. Die erhaltene cDNA diente als Template für die spätere quantitative PCR.

Ausgegangen wurde von 1µg Gesamt-RNA, die mit 0,5µg/µl Oligo-(dT)₁₅ Primer gemischt und für 5min auf 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt wurde. Zu dem Reaktionsgemisch (20µl) wurden zusätzlich 100U M-MLV Reverse Transkriptase, 4µl 2,5mM je dNTP und 4µl 5x First Strand Buffer zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte 1h bei 37°C. Um das Enzym zu inaktivieren wurde der Reaktionsansatz anschließend 2min auf 94°C erhitzt. Für die quantitative PCR wurde die erhaltene cDNA mit nukleasefreiem Wasser 1:3 verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)

Bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch bestimmt. Dies ermöglicht den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, der mit hoher Affinität in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet, wobei gebundenes SYBR Green 1000-fach stärker fluoresziert als freies und eine Signalintensität aufweist, die proportional zur entstehenden DNA-Menge ist.

Die PCR wurde mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit an einem Light-Cycler durchgeführt. Der 20µl-Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 10µl QuantiTect™ SYBR® Green PCR Mastermix, je 1µl sense und antisense Primer (10pmol/µl), 6µl RNase-freies H₂O und 2µl cDNA. Das Amplifikationsprotokoll bestand, nach der Aktivierung der HotStarTaq™ DNA-Polymerase von 15min bei 95°C, aus 40 Zyklen mit 15s Denaturierungsphase bei 95°C, 20s Annealingphase bei 58°C und 20s Elongationsphase bei 72°C. Nach jedem Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Housekeeper diente GAPDH.

Der Renin-mRNA Gehalt pro Niere wurde berechnet aus der Gesamtausbeute an extrahierter RNA und des Renin-mRNA Levels. So konnten alle Renin mRNA Levels in der sich entwickelnden Niere relativ zu den Levels in der adulten Niere verglichen werden.

3. Ergebnisse

In Anbetracht der Tatsache, dass aus zweidimensionalen Schnitten nur sehr schwer Rückschlüsse auf die tatsächliche räumliche Verteilung der Reninexpression gezogen werden können, wurden in der vorliegenden Arbeit 3D-Rekonstruktionen von C57/Bl6 Mausnieren verschiedener Entwicklungsstadien erstellt. Diese räumlichen Modelle erlauben es, das Verteilungsmuster der Reninexpression während der Entwicklung konkret zu bestimmen. Da in der Literatur große Differenzen, sowohl in der nomenklatorischen Interpretation als auch in der Lagebeschreibung der einzelnen Arterien bestehen, sollte in dieser Studie zunächst die Raumstruktur des präglomerulären arteriellen Gefäßbaumes untersucht werden.

3.1 Entwicklung des präglomerulären arteriellen Gefäßbaumes

Mit Hilfe der erstellten 3D-Modelle konnte ein Eindruck über den Entwicklungszustand der Nieren im Hinblick auf den strukturellen Aufbau des komplexen arteriellen Gefäßsystems gewonnen werden. In der nachfolgenden Abbildung sind zur Übersicht und um den Größenzuwachs verfolgen zu können, die Nieren der Embryonalstadien E14, E15, E16, E17 und E18 gezeigt. Von den postpartalen Stadien pp1, pp3, pp5, pp7, pp10 wurde jeweils die halbe Niere rekonstruiert. Zum Größenvergleich ist von einer adulten Niere (90d) ein Ausschnitt aus der Mitte quer dargestellt.

Als Marker für das Nierenarteriensystem wurde Glattmuskelaktin verwendet (Carey et al., 1992). Die Darstellungen beruhen auf der Rekonstruktion der Immunfluoreszenz für Glattmuskelaktin aus jedem histologischen Serienbild eines Stadiums in den zwei Dimensionen x und y und aus der Gesamtzahl der Schnitte (z-Achse) mit Hilfe des Visualisierungsprogrammes *Amira*. Zur besseren Orientierung wurde aus der Eigenfluoreszenz des sekundären Antikörpers die Nierenkapsel rekonstruiert (Abb.3.1).

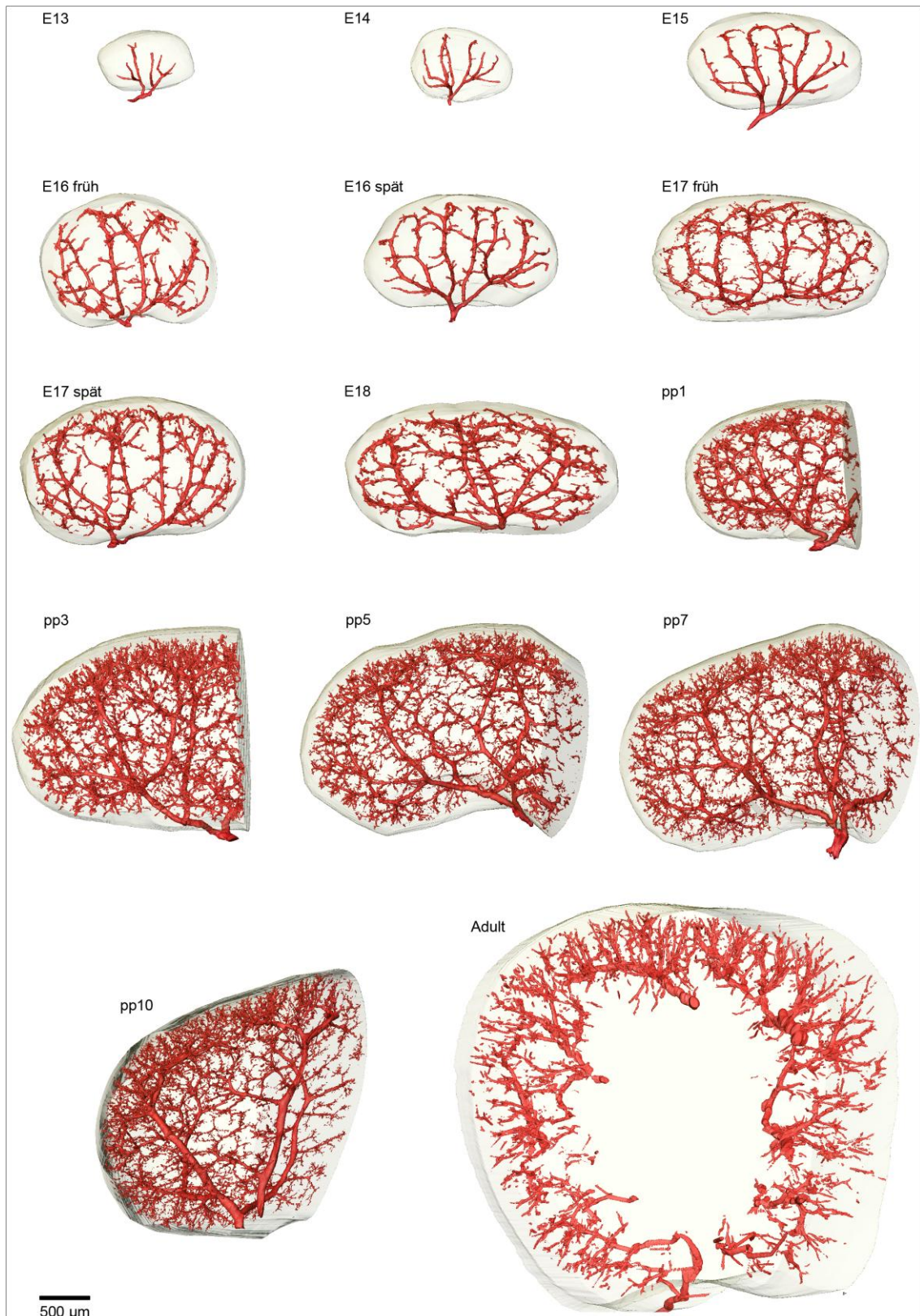


Abb.3.1 – Überblick: 3D-Rekonstruktionen ganzer Nieren der Embryonalstadien E13 bis E18, halber Nieren der postpartalen Stadien pp1 bis pp10 und eines Ausschnittes aus der Mitte einer adulten Niere in quer. Dargestellt sind das arterielle Blutgefäßsystem (rot) und die Nierenkapsel (transparent).

Zur Beschreibung des Entwicklungszustandes anhand des Aufbaus und des Verzweigungsgrades des Gefäßsystems wurden für die Entwicklungsstadien E13 bis pp3 die Komplettrekonstruktionen der Nieren herangezogen.

Embryonaltag 12:

Die Entwicklung des renalen Blutgefäßsystems startet am E12 damit, dass die knospenartige A. renalis in das undifferenzierte metanephritische Mesenchym einwächst (nicht gezeigt).

Embryonaltag 13:

Am E13 ist die A. renalis klar erkennbar. Diese zweigt sich in der Hilusregion der Niere in zwei Äste auf, bei denen es sich um die A. interlobares handelt (Abb.3.2).

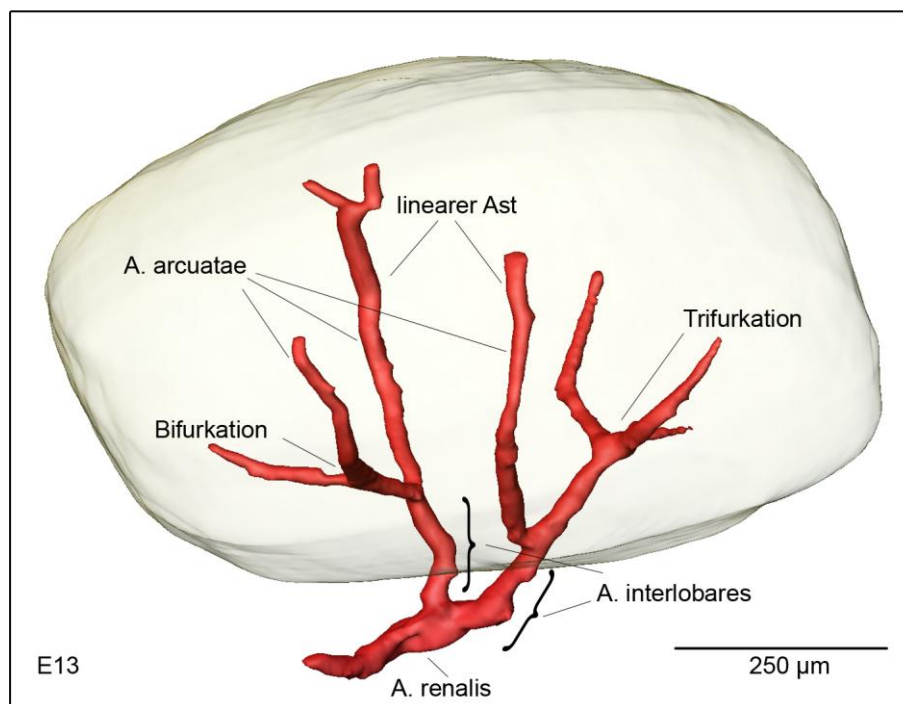


Abb.3.2 – 3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent) am E13.

Jede A. interlobaris teilt sich im unteren Drittel der Niere erneut in Äste gleicher Ordnung auf, aus denen die späteren A. arcuatae hervorgehen. Das Verzweigungsmuster der A. interlobares ist nahezu konstant und kann auch in folgenden Entwicklungsstadien verfolgt werden. Dabei sind zwei Varianten beobachtet worden. Eine Seite des Gefäßbaumes bleibt immer gleich, mit einem längeren „linearen“ Ast und einer nachfolgenden Trifurkation (Abb.3.2; rechte Seite der Niere). Die andere A. interlobaris gabelt sich entweder in gleicher Weise (Abb.3.3) oder sie entwickelt zwei spätere Bifurkationen (Abb.3.2), woraus aber stets vier Gefäßenden pro A. interlobaris

resultieren. Der linear verlaufende Ast ist immer mediär zu finden (Abb.3.2 und Abb.3.3).

Embryonaltag 14:

Am 14. Tag der Entwicklung verlängern sich die A. arcuatae, die im Folgenden als arcuate Hauptstämme bezeichnet werden (Abb.3.3). Außerdem werden erste Zeichen von Bogenbildung in diesen Ästen sichtbar (gekennzeichnet durch Sterne).

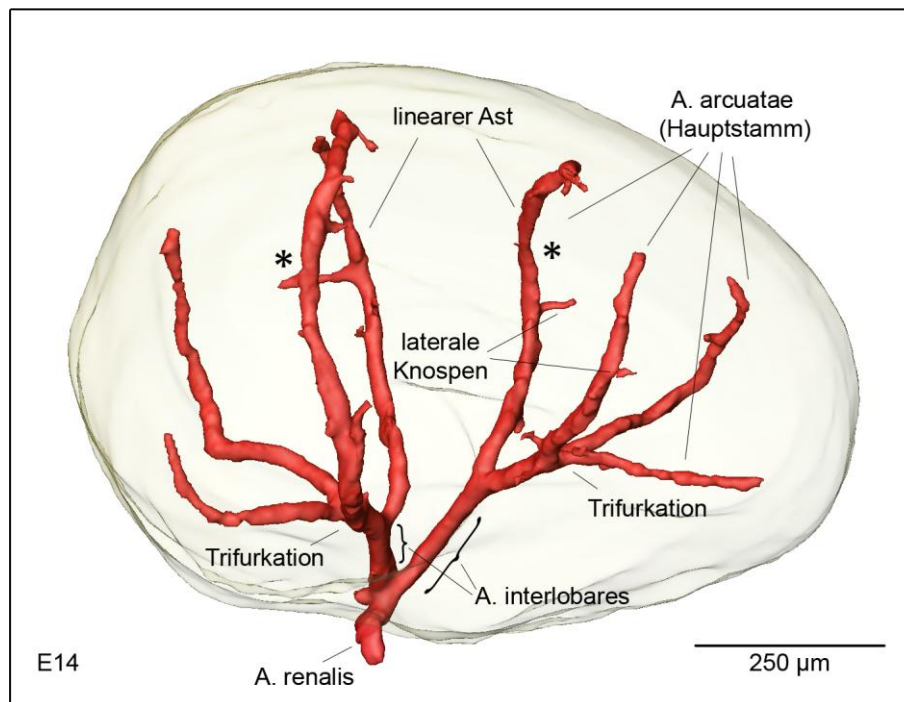


Abb.3.3 – 3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent) am E14. Die Sterne kennzeichnen die beginnende Bogenbildung.

Die mediären, linear verlaufenden arcuaten Äste wachsen jeweils auf einen Ast der Trifurkation zu, wobei sich beide Arterien nach innen krümmen, aber gewöhnlich keine Anastomosen bilden. Daneben wurde auch ein Aufeinanderzuwachsen von zwei Ästen einer Trifurkation beobachtet (Abb.3.3). Des Weiteren werden erste laterale Knospen entlang der arcuaten Hauptstämme sichtbar.

Embryonaltag 15:

Am E15 verlängern sich die A. arcuatae, und deren Bogenbildung geht voran. Auch die bestehenden lateralen Knospen nehmen an Länge zu und weitere werden sichtbar. An den distalen Enden der arcuaten Arterien gehen T-förmige Kappen hervor, die auch aufeinander zuwachsen, aber normalerweise nicht fusionieren (Abb.3.4).

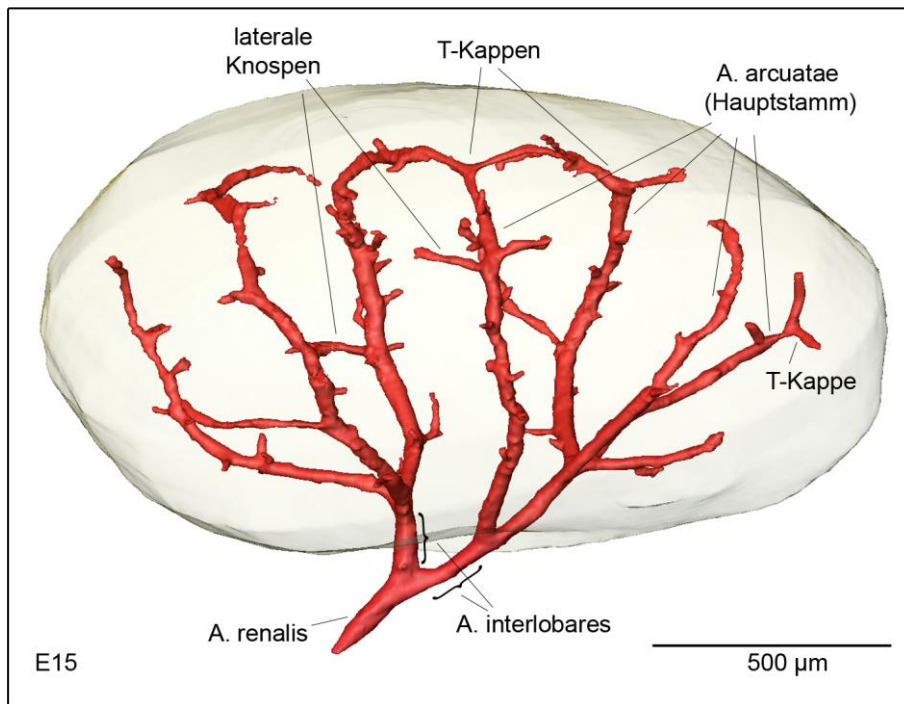


Abb.3.4 – 3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent) am E15.

Embryonaltag 16:

Am E16 nehmen die Äste, die aus den arcuaten Hauptstämmen entspringen weiter an Länge zu (Abb.3.5).

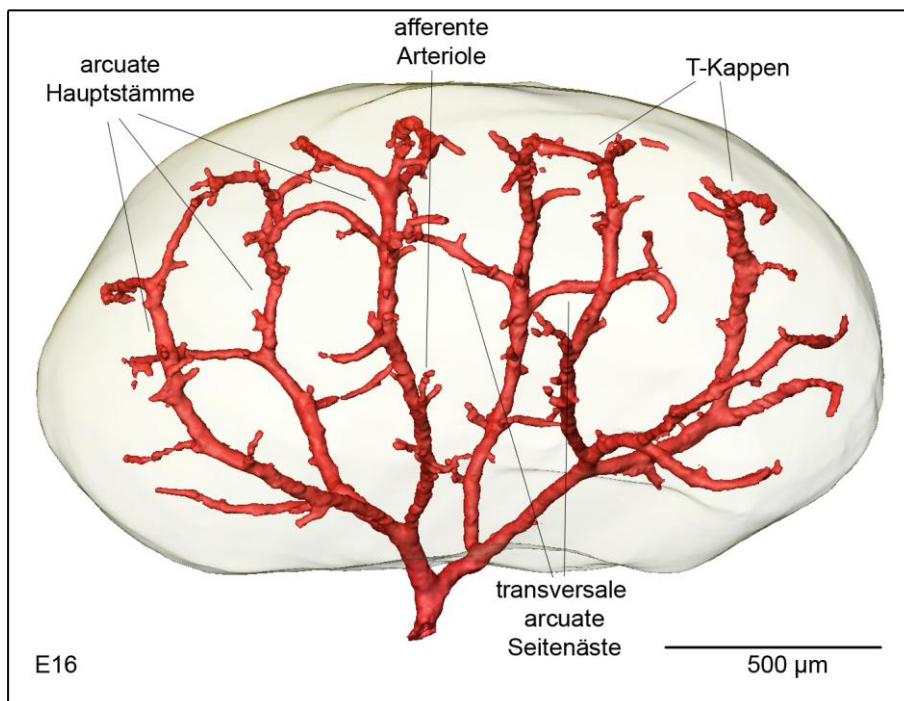


Abb.3.5 – 3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent) am E16.

Diese Seitenäste können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen in afferente Arteriolen, die von der konkaven Seite des arcuaten Stammes in Richtung Nierenbecken abzweigen und sich entwickelnde juxtamedulläre Glomeruli versorgen (Abb.3.6). Zum anderen in Seitenäste, die annähernd rechtwinklig aus dem arcuaten Hauptast abgehen und parallel zur Kapsel verlaufen. Diese formen die weiter wachsenden transversalen arcuaten Seitenarterien (Abb.3.6). Dabei bilden die Seitenäste keine Anastomosen mit arcuaten Seitenästen der gegenüber stehenden arcuaten Hauptäste. Beide Typen der Verzweigung sind auf die arcuaten Arterien beschränkt und werden nie in A. interlobares oder A. renales beobachtet.

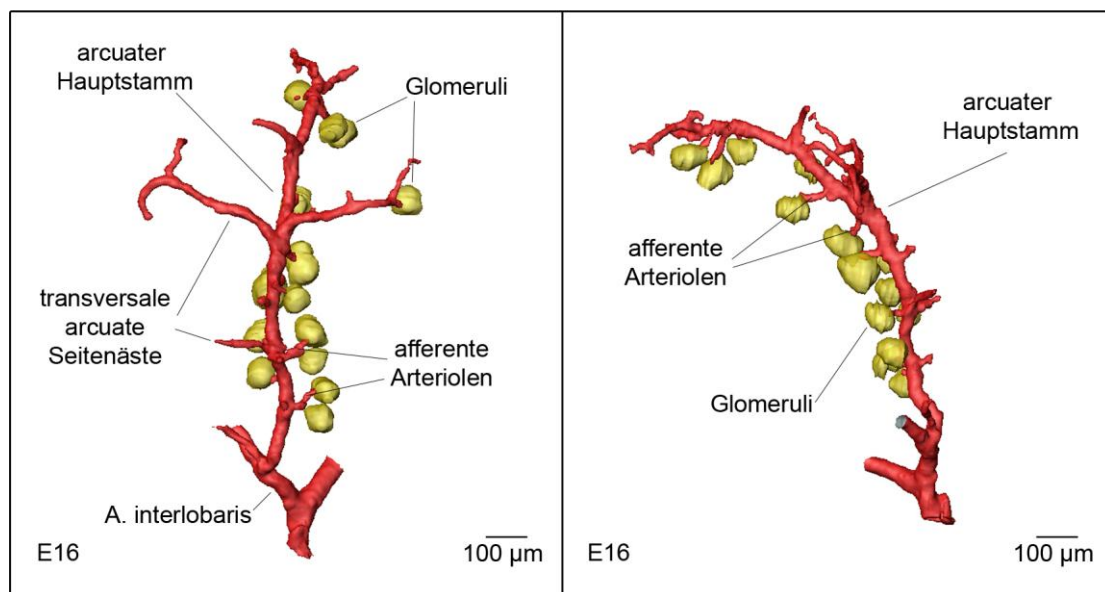


Abb.3.6 – 3D-Rekonstruktion einer isolierten A. arcuata (rot). Abgebildet ist jeweils dieselbe Arterie in zwei Orientierungen, um die Position der Seitenäste darzustellen. Die Glomeruli sind in gelb gezeigt.

Embryonaltag 17:

Am 17. Embryonaltag stechen Wachstum und Verzweigung der T-Stücke und der Seitenarterien hervor, deren Anzahl zunimmt und hohe Verzweigungsaktivität aufweist. Erste Aussprossungen aus den arcuaten transversalen Seitenarterien werden sichtbar. Hierbei handelt es sich zum einen um A. interlobulares und zum anderen um afferente Arteriolen (Abb.3.7).

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass die Glattmuskelaktin-Reaktionen nicht immer kontinuierlich entlang des Gefäßes ansteigen. Die Rekonstruktionen weisen an den Gefäßenden zahlreiche unterbrochene Strukturen auf. Diese ergeben sich aus Inseln von Glattmuskelaktin-Reaktionen, was möglicherweise den Wachstumsprozess widerspiegelt (siehe Kreis, Abb.3.7).

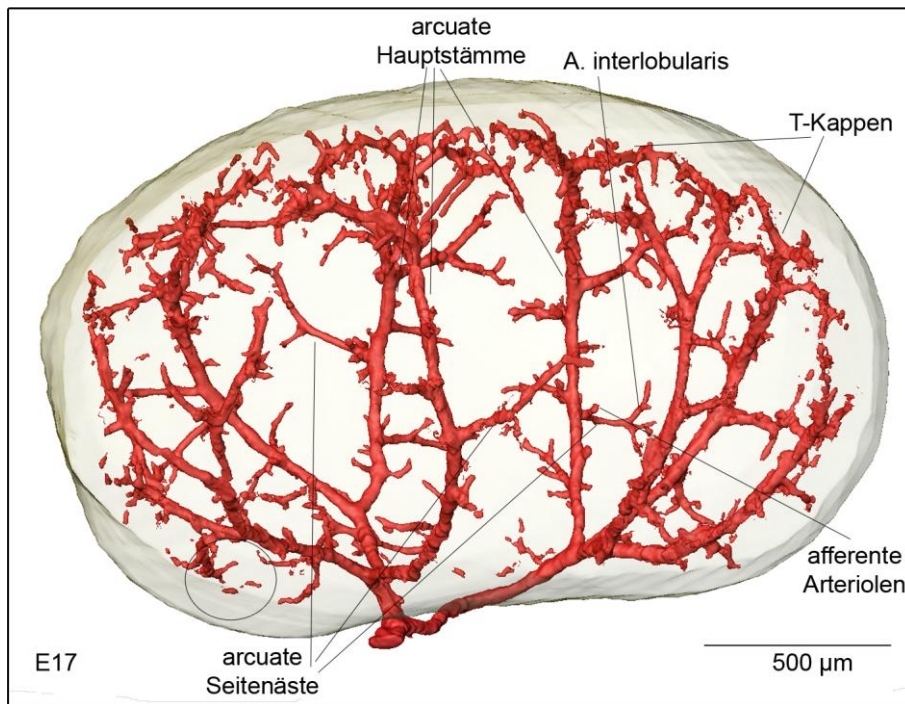


Abb.3.7 – 3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent) am E17.

Aufgrund der Verdichtung und der steigenden Komplexität des Gefäßsystems ist im Folgenden zusätzlich zur Komplettrekonstruktion jeweils ein isolierter Seitenast einer A. arcuata dargestellt.

Embryonaltag 18:

Am 18. Embryonaltag verlängern sich die arcuaten transversalen Seitenarterien und die Anzahl der Sprossungen, die aus diesen hervorgehen steigt weiter an. Aus den A. interlobulares entspringen mehrere afferente Arteriolen (Abb.3.8b). In diesem Stadium ist der renale Gefäßbaum in seiner Grundform vollständig entwickelt. Jeder arcuate Hauptstamm weist zwischen neun und elf transversale Seitenäste auf, deren Gesamtzahl nicht weiter ansteigt.

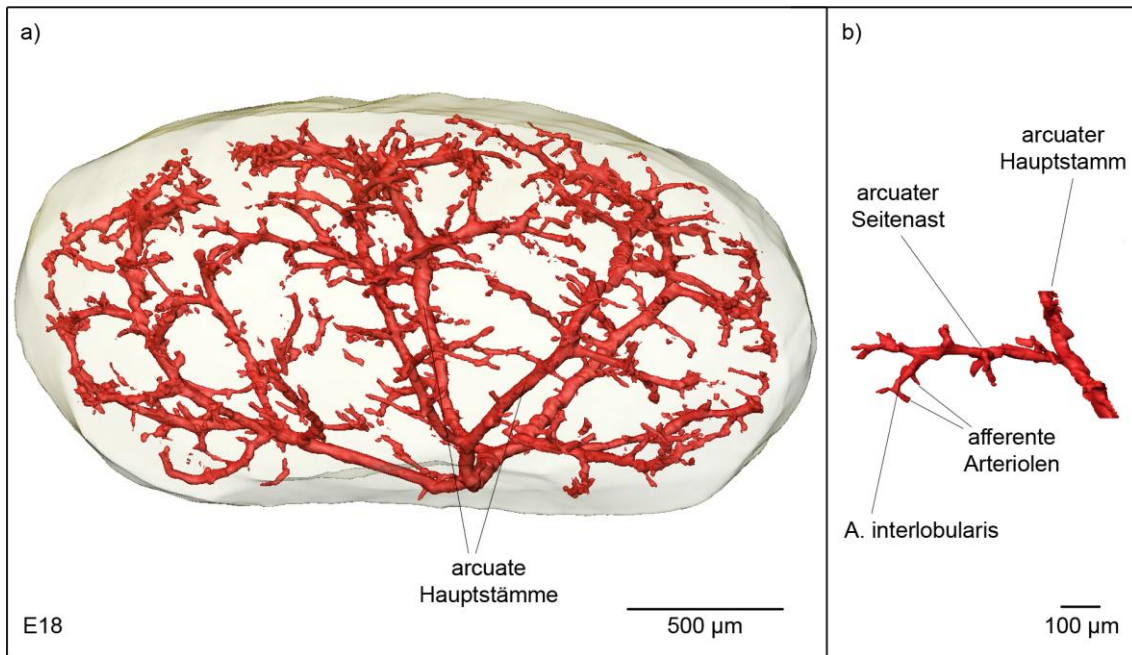


Abb.3.8 – 3D-Rekonstruktion a) der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent); b) Ausschnitt eines transversalen arcuaten Seitenastes am E18.

Postpartaler Tag 1:

Am pp1 entwickeln sich die T-förmigen Verzweigungen und die arcuaten Seitenäste weiter. Sie generieren eine ansteigende Zahl an A. interlobulares und afferenten Arteriolen, die gekrümmt in die Medulla einwachsen (Abb.3.9).

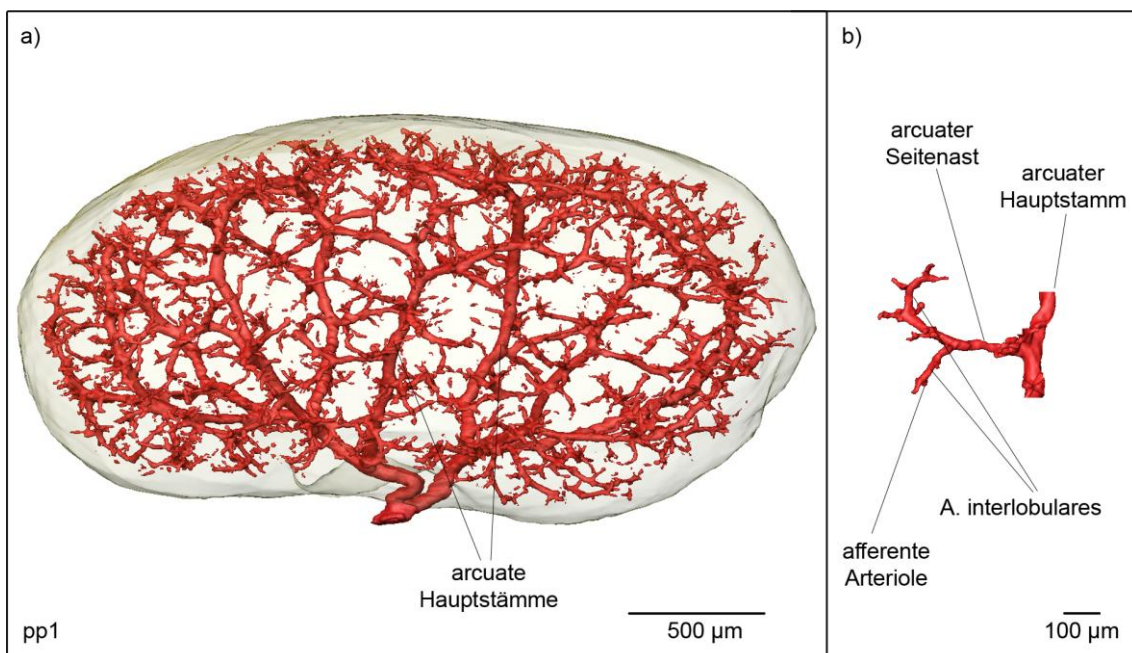


Abb.3.9 – 3D-Rekonstruktion a) der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent); b) Ausschnitt eines transversalen arcuaten Seitenastes am pp1.

Postpartaler Tag 3:

Am pp3 setzt sich die Verzweigung der T-Stücke und der transversalen Seitenäste fort. Bestehende A. interlobulares verlängern sich, neue kommen hinzu und zahlreiche neue afferente Arteriolen entspringen aus diesen. Auffällig ist, dass die A. interlobulares stets kortikoradiär angeordnet sind, die arcuaten Seitenäste dagegen parallel zur Nierenkapsel stehen (Abb.3.10).

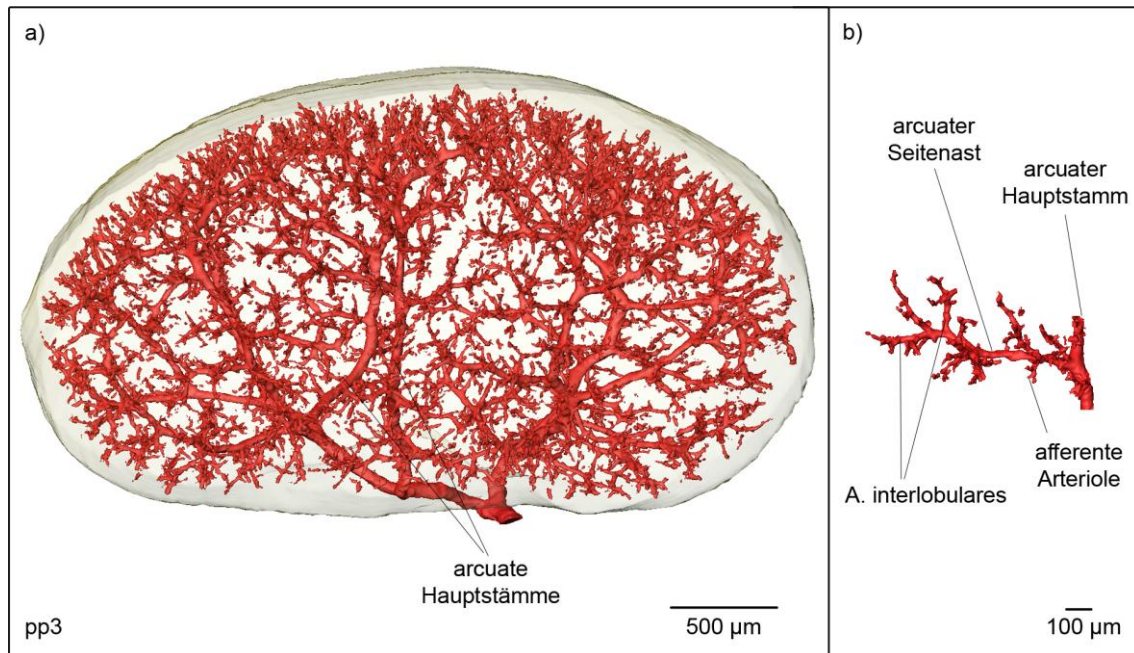


Abb.3.10 – 3D-Rekonstruktion a) der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent) b) Ausschnitt eines transversalen arcuaten Seitenastes am pp3.

Postpartaler Tag 5:

Am pp5 nehmen die bereits vorhandenen A. interlobulares weiter an Länge zu und die Anzahl an neuen Interlobulararterien sowie an afferenten Arteriolen steigt an (Abb.3.11). Zahlreiche unterbrochene Strukturen aus Glattmuskelaktin-Immunreaktionen sind vor allem in der nephrogenen Zone zwischen den Seitenarterien sichtbar, die später fusionieren und die interlobularen Arterien und die afferenten Arteriolen formen.

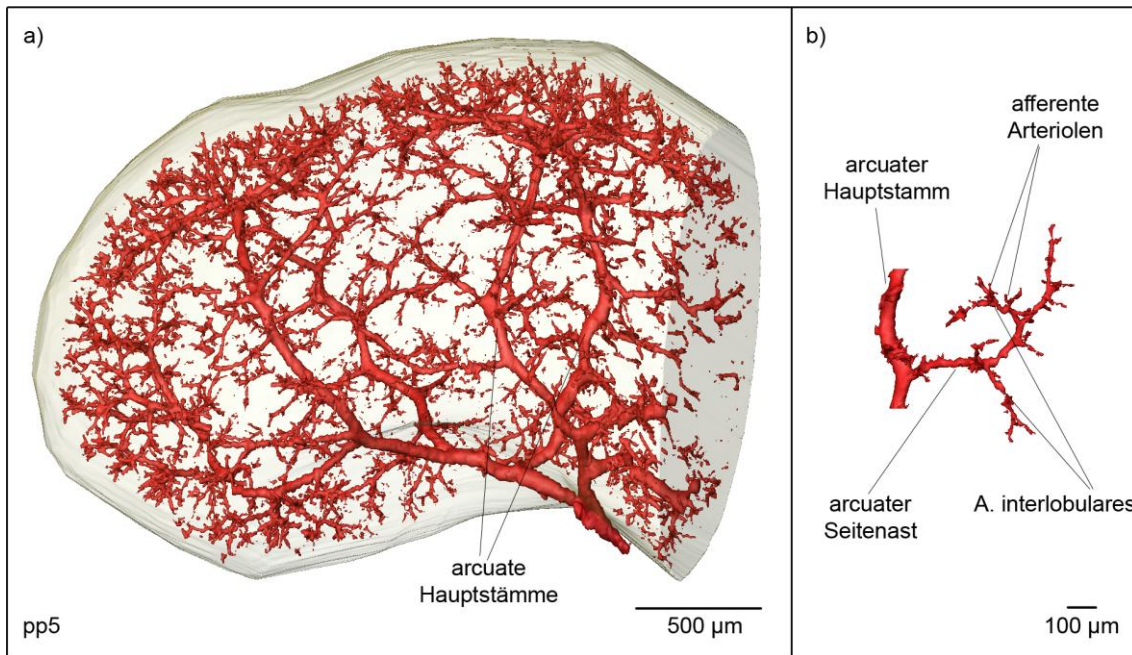


Abb.3.11 – 3D-Rekonstruktion a) der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent). b) Ausschnitt eines transversalen arcuaten Seitenastes am pp5

Postpartaler Tag 7:

Am pp7 verlängern sich sämtliche Arterien. Zudem entspringen aus den arcuaten Seitenästen neue A. interlobulares und A. afferentes. In diesem Stadium fällt auf, dass die afferenten Arteriolen zunehmend gruppenweise aus den A. interlobulares hervorgehen (gekennzeichnet durch Sterne, Abb.3.12). Diese nehmen eine fast fingerförmige Gestalt an.

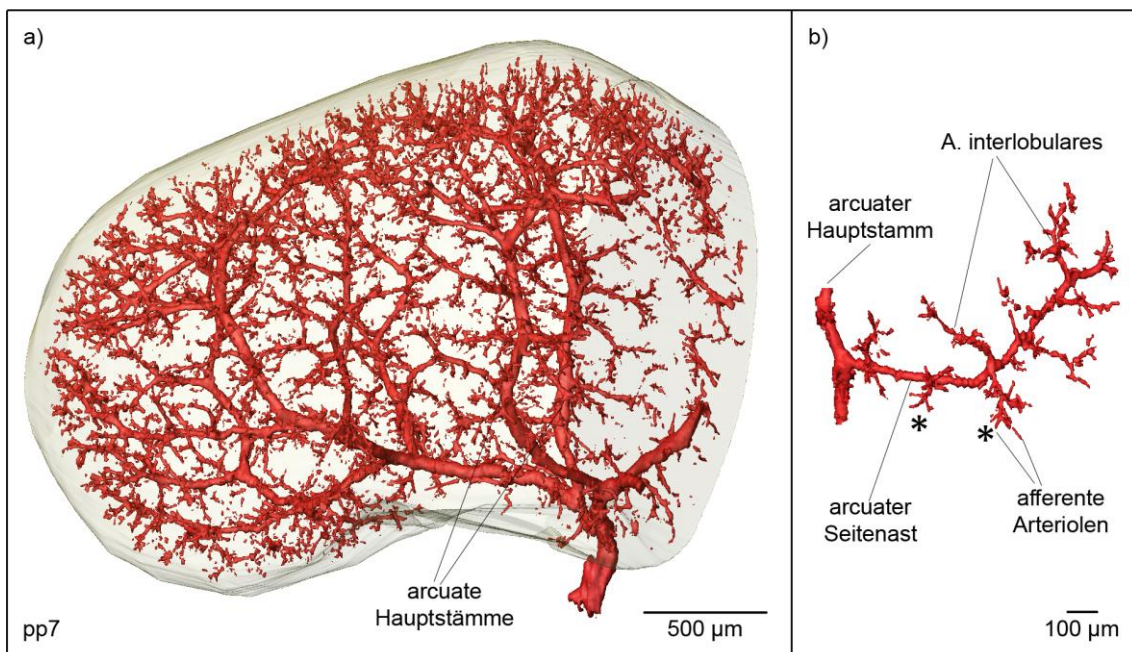


Abb.3.12 – 3D-Rekonstruktion a) der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent). b) Ausschnitt eines transversalen arcuaten Seitenastes am pp7. Die Sterne kennzeichnen die fingerförmigen afferenten Arteriolen.

Postpartaler Tag 10:

Am pp10 ist das System der interlobularen Arterien und afferenten Arteriolen in der subkortikalen Zone weiter ausgebildet. Die Anzahl, der in Gruppen aus den A. interlobulares abzweigenden afferenten Arteriolen steigt enorm an (Abb.3.13). Auffällig ist, dass keine afferenten Arteriolen, die direkt aus den arcuaten Hauptstamm hervorgehen, zu sehen sind. Folglich haben sich diese afferenten Arteriolen durch weitere Gabelung zu A. interlobulares entwickelt.

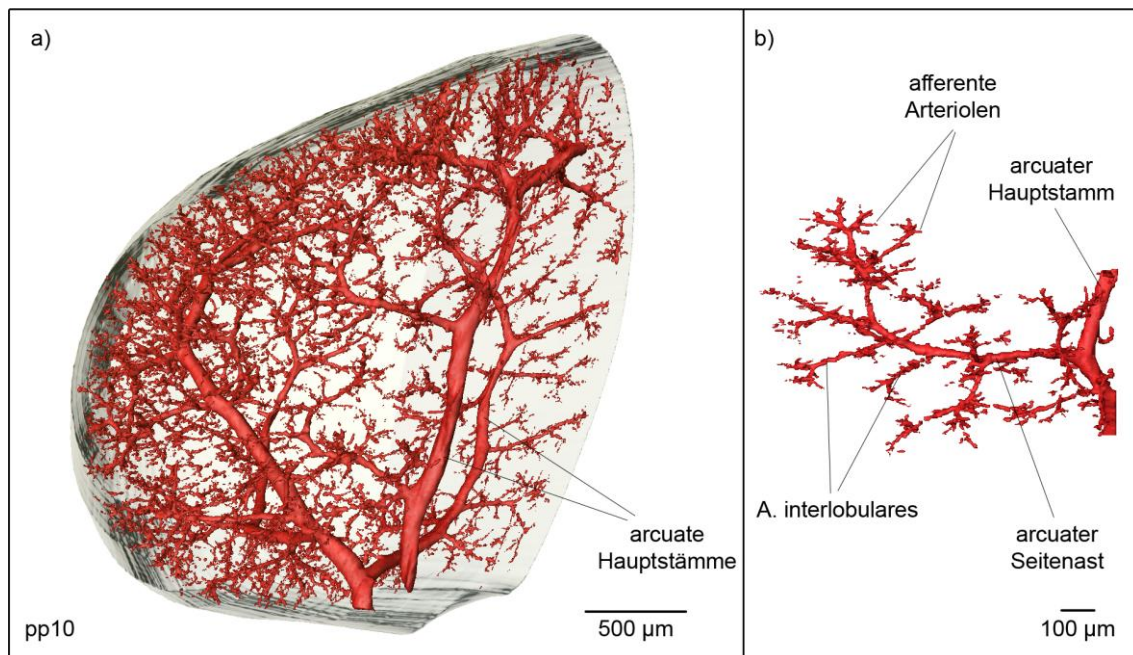


Abb.3.13 – 3D-Rekonstruktion a) der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent); b) Ausschnitt eines transversalen arcuaten Seitenastes am pp10.

Adultzustand:

Im adulten Tier hat die Länge sämtlicher Arterien noch einmal zugenommen. Auffällig sind vor allem die längeren afferenten Arteriolen. Efferente Arteriolen, insbesondere an juxtamedullären Glomeruli werden erkennbar. Im Gegensatz zu den kortikalen sind diese viel länger und schießen sich zum peritubulären Netzwerk zusammen (Abb.3.14).

Aus Abbildung 3.14 wird, vor allem durch die Rekonstruktion der Glomeruli, ersichtlich, dass die afferenten Arteriolen, die direkt aus den arcuaten Seitenästen hervorgehen und einen Glomerulus speisen, sich zu A. interlobulares weiterentwickeln (siehe auch z.B. Abb.3.22).

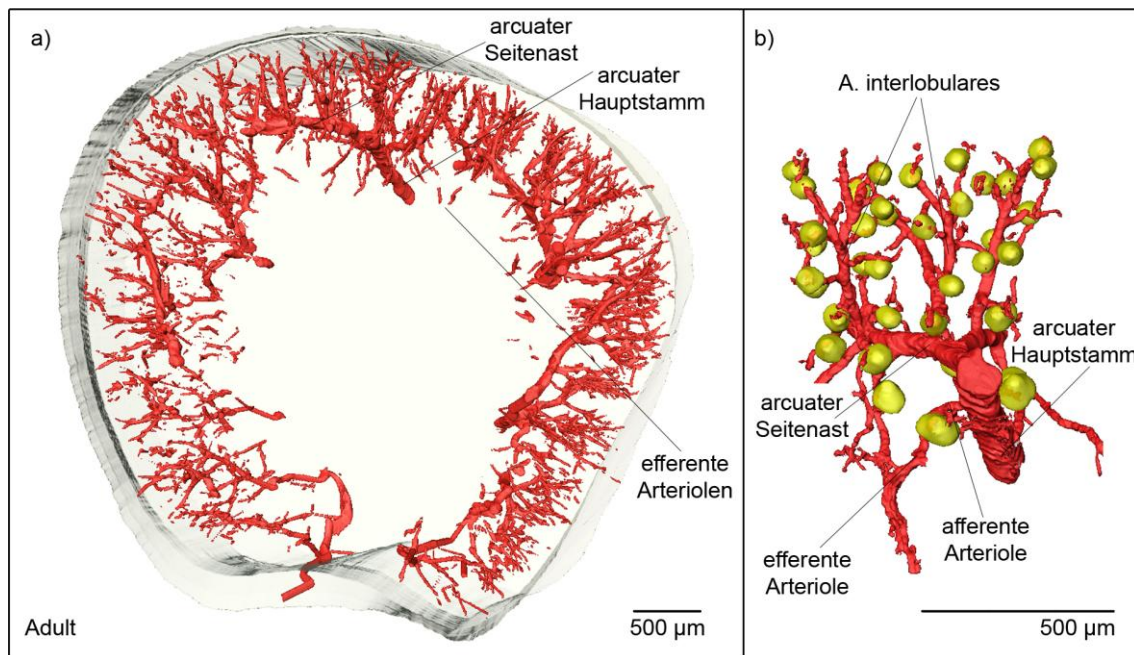


Abb.3.14 – 3D-Rekonstruktion a) der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (transparent), b) Ausschnitt eines transversalen arcuaten Seitenastes mit Glomeruli (gelb) im Adultzustand.

Zusammenfassend lässt sich ein Grundbauplan erstellen. Verfolgt man retrograd alle Verzweigungen eines kortikalen Glomerulus, so geht dessen afferente Arteriole zunächst in eine A. interlobularis über. Diese tritt über einen transversalen Seitenast in einen arcuaten Hauptast, der dann seinerseits in eine A. interlobaris mündet (Abb.3.14).

Besonderheiten während der Gefäßbaumentwicklung

Für die Analyse des strukturellen Aufbaus des Gefäßsystems wurden repräsentativ einige Glomeruli rekonstruiert. Dabei wurde beobachtet, dass die juxtamedullären Glomeruli, deren afferente Arteriolen direkt vom arcuaten Hauptstamm abgehen (Abb.3.15, siehe Pfeile) wesentlich größer sind als diejenigen, die von den arcuaten Seitenästen abzweigen (gekennzeichnet durch einen Stern). Die kortikalen Glomeruli befinden sich auf der konvexen Seite des arcuaten Hauptstammes, während die juxtamedullären auf konkaven liegen.

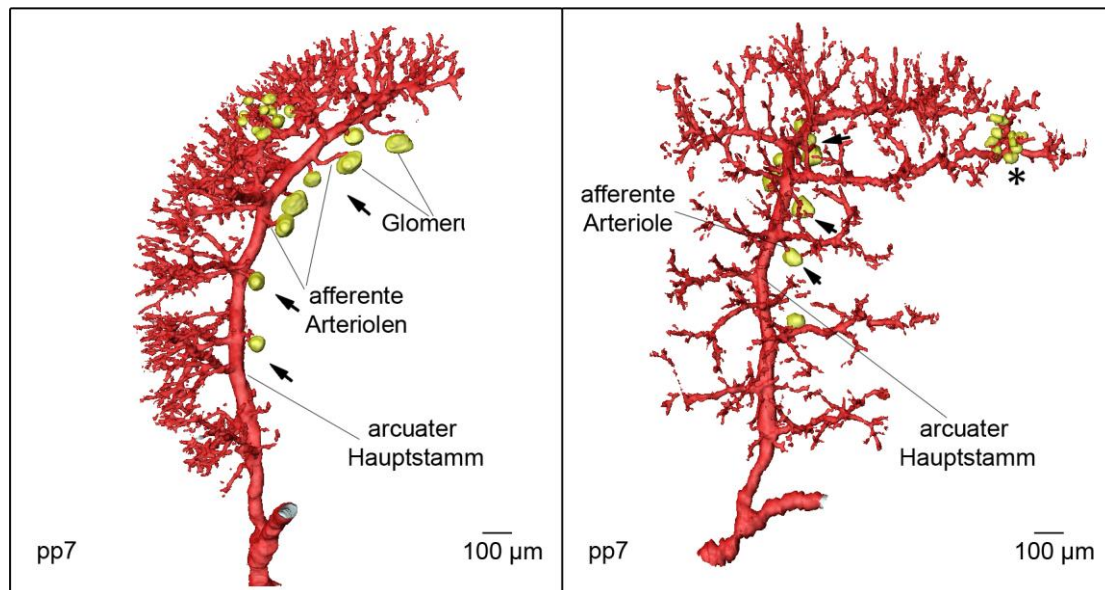


Abb.3.15 – 3D-Rekonstruktion einer isolierten A. arcuata (rot) am pp7. Abgebildet ist jeweils dieselbe Arterie in zwei Orientierungen. Repräsentativ sind einige Glomeruli gezeigt (gelb). Die Pfeile kennzeichnen die juxtamedullären Glomeruli, die Sterne die kortikalen.

In allen Entwicklungsstadien füllt das arterielle Blutgefäßsystem nicht die komplette Nierenkapsel aus, sondern weist in der Mitte eine Aussparung für das sich entwickelnde Sammelrohrsystem und Nierenbecken auf. Wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, wachsen die Gefäße um das entstehende Nierenbecken herum (siehe auch Abb.3.14). Zur besseren Veranschaulichung sind in der folgenden 3D-Rekonstruktion das Nierenbecken (hellblau) und der Ureter (dunkelblau) räumlich dargestellt.

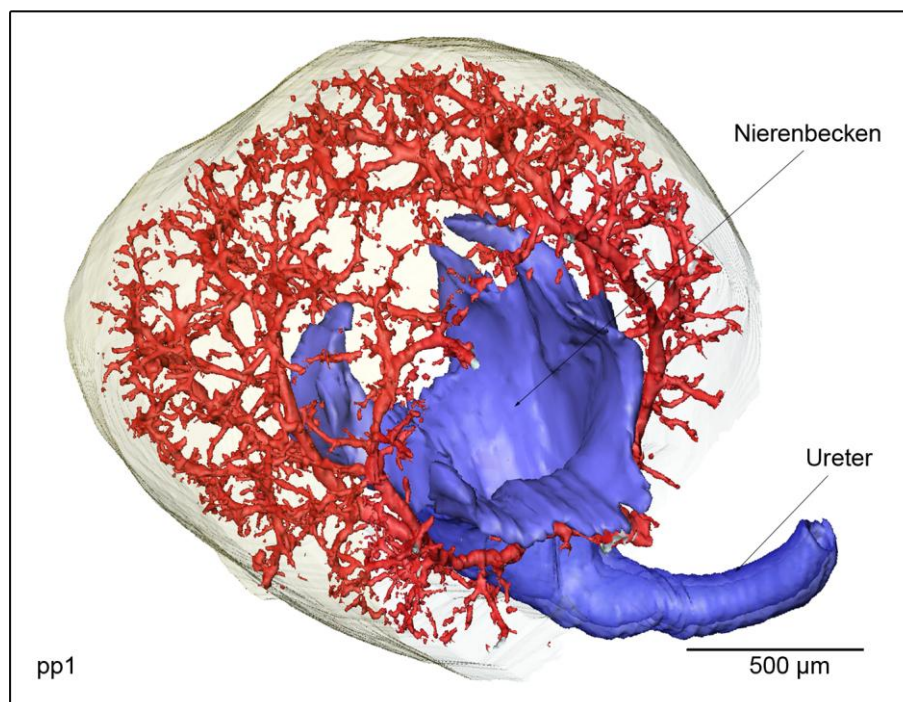


Abb.3.16 – 3D-Rekonstruktion einer halben Mausniere am pp1. Dargestellt sind das arterielle Gefäßsystem (rot), die Kapsel (transparent), das Nierenbecken (hellblau) sowie der Ureter (dunkelblau).

Dabei wurde das Nierenbecken anhand der Eigenfluoreszenz des Gewebes rekonstruiert, während der Ureter Glattmuskelaktin exprimiert.

3.2 Änderungen der Reninexpression in der Nierenentwicklung

Mit Hilfe der erstellten 3D-Rekonstruktionen wurde sowohl die räumliche als auch die zeitliche Lokalisation der Reninexpression während der Entwicklung und im Adultzustand konkret untersucht. Aufgrund der steigenden Komplexität des Gefäßsystems ist zusätzlich zu den Komplettrekonstruktionen jeweils eine A. arcuata isoliert dargestellt. Zum besseren Vergleich wurde immer die mediär gelegene A. arcuata herangezogen, die vor einer Trifurkation von einer der beiden A. interlobares abzweigt. Um bestimmen zu können, ob die Seitenäste dieser A. arcuata afferente Arteriolen oder weiter wachsende Äste sind, wurden von E15 bis E18 sämtliche Glomeruli dieses Astes anhand der Eigenfluoreszenz des Gewebes bedingt durch den sekundären Antikörper rekonstruiert. Ab pp1 sind einige Glomeruli repräsentativ dargestellt.

Embryonaltag 15:

Im Metanephros wird Immunreaktivität für Renin erstmalig am Entwicklungstag 15 in Assoziation mit dem arteriellen Gefäßbaum beobachtet. Die intrarenale Reninexpression tritt mit einem völlig diskontinuierlichen Muster im distalen Stamm der arcuaten Arterien auf (Abb.3.17a, b).

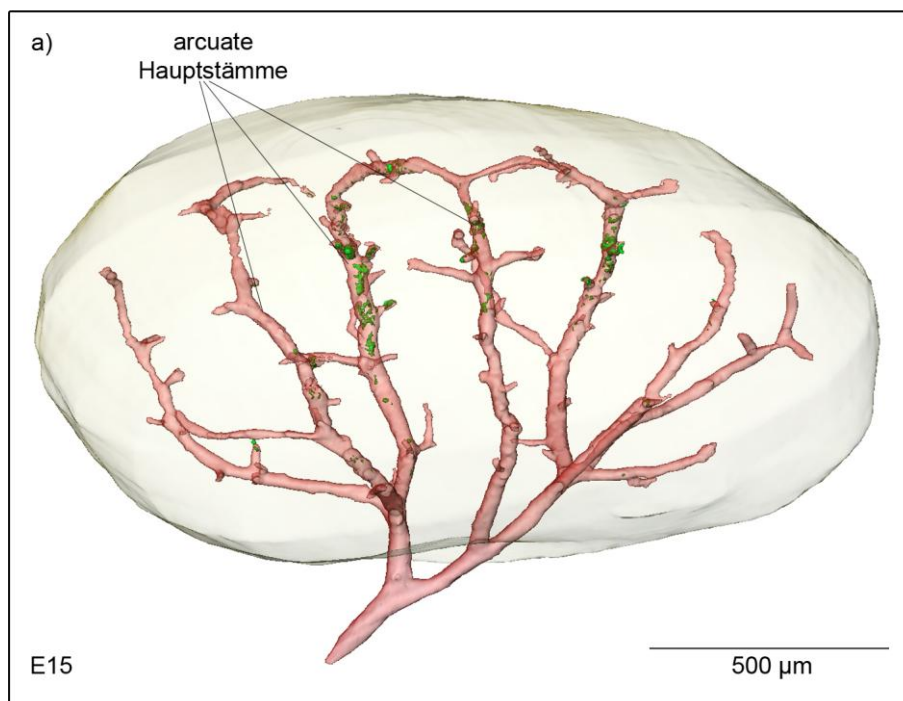


Abb.3.17a – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am E15 im arteriellen Gefäßsystem (rot)

Dabei ist auffällig, dass nicht in allen arcuaten Hauptästen Renin zu finden ist. Außerdem sind vereinzelte Reninimmunreaktionen in den sich entwickelnden Seitenästen der arcuaten Arterien zu beobachten.

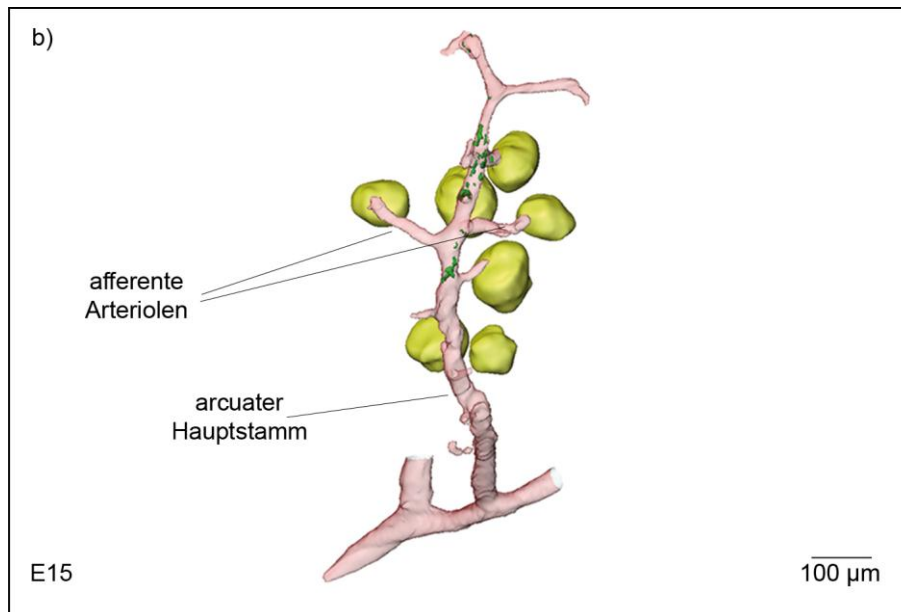


Abb.3.17b – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am E15 in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb).

Früher Embryonaltag 16:

Zu Beginn des 16. Embryonaltages verlagert sich die Reninexpression vom Hauptstamm der arcuaten Arterie retrograd in Richtung A. renalis (Abb.3.18). Außerdem expandiert Renin in einige juxtamedulläre afferente Arteriolen, die direkt vom arcuaten Hauptstamm abgehen, zum Teil bereits an das terminale Ende (siehe Stern) und in weiter entwickelte transversale arcuate Seitenarterien. Auffällig ist, dass Renin nicht kontinuierlich entlang der Gefäße exprimiert wird, sondern unterbrochen durch reninfreie Bereiche. Man kann kein sich wiederholendes Muster beobachten.

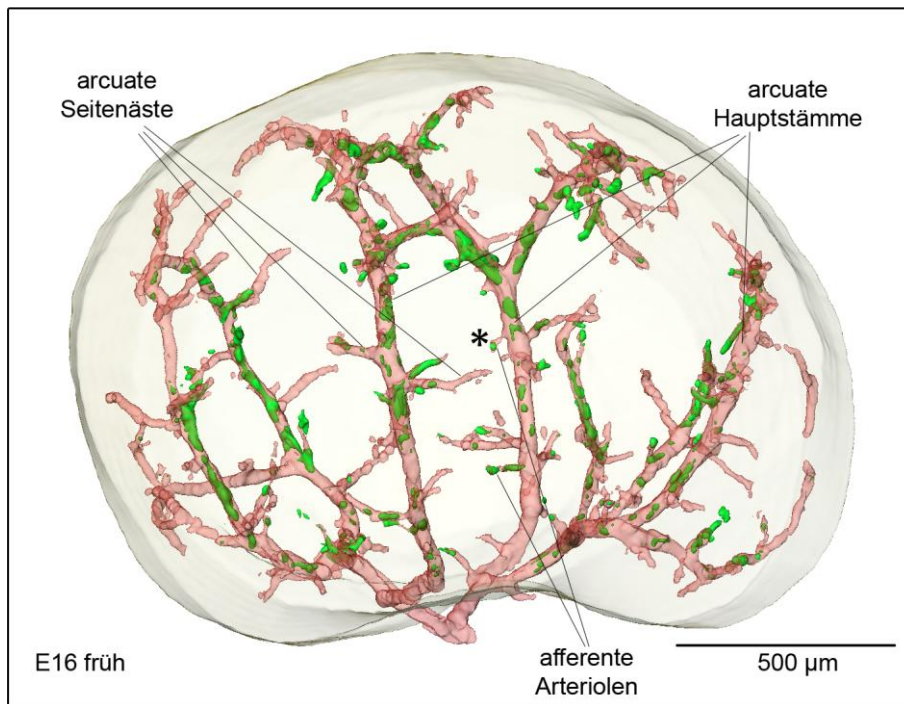


Abb. 3.18 – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am frühen E16 im arteriellen Gefäßsystem (rot).

Später Embryonaltag 16:

Am Ende des 16. Embryonaltages wird Renin nahezu entlang der gesamten arcuaten Hauptäste exprimiert (Abb.3.19a, b).

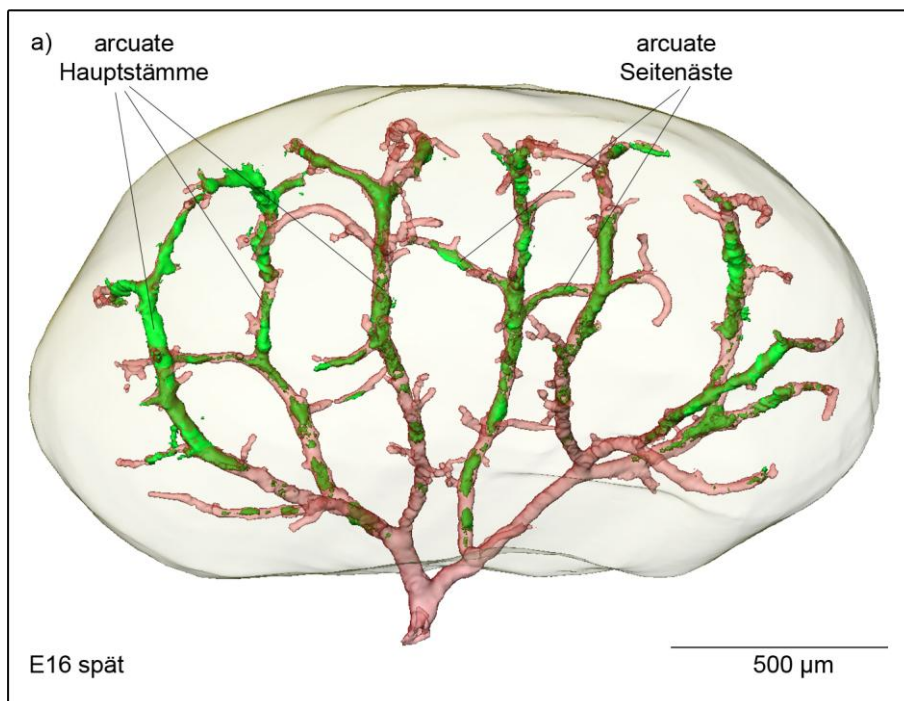


Abb.3.19a – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am späten E16 im arteriellen Gefäßsystem (rot).

Des Weiteren ist Renin stellenweise in den proximalen Abschnitten der meisten arcuaten Seitenäste vorzufinden. Außerdem exprimiert in diesem Stadium ein geringer Teil der afferenten Arteriolen bereits Renin an der klassischen juxtaglomerulären Position. Der Großteil der Glomeruli ist zu diesem Zeitpunkt jedoch noch frei von Renin. Besonders auffallend ist, dass an allen freien Verzweigungsenden der arcuaten Seitenarterien kein Renin nachgewiesen werden kann (siehe Pfeile, Abb.3.19b).

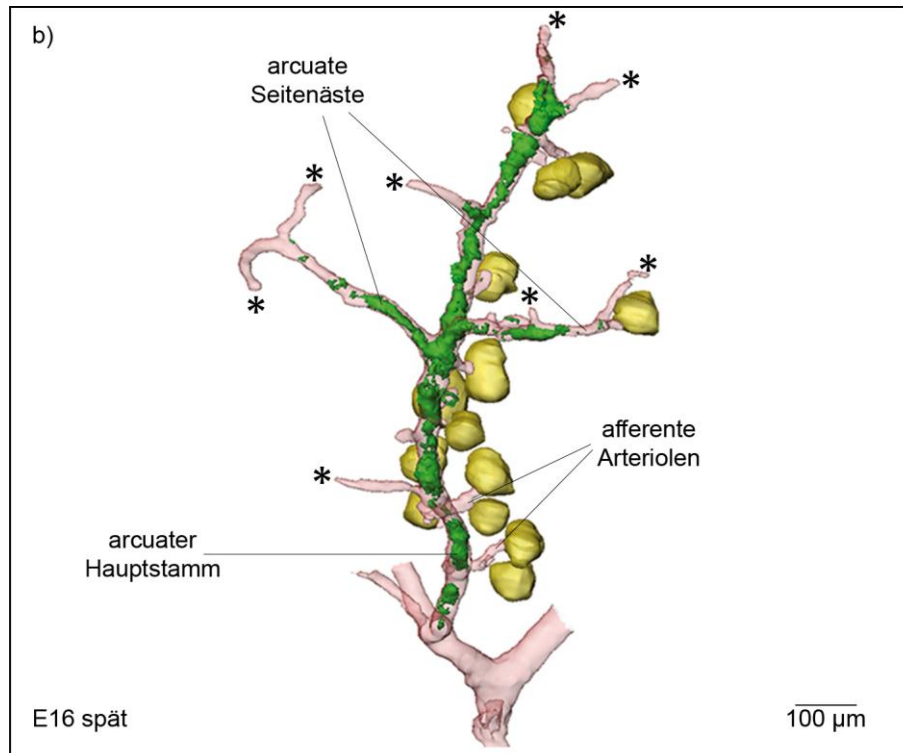


Abb.3.19b – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am späten E16 in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb). Die Sterne kennzeichnen freie Gefäßenden.

Früher Embryonaltag 17:

Am frühen E17 expandiert die Reninexpression entlang der ganzen arcuaten Hauptäste bis hin zu ihren T-Stücken (Abb.3.20). Zudem ist Renin, außer in den proximalen Abschnitten der transversalen arcuaten Seitenäste in den weiter distalen Bereichen vorzufinden. Dabei sind Seitenäste zu beobachten, die auf ganzer Länge Renin exprimieren und solche, die es nur begrenzt aufweisen. Zudem ist Renin in afferenten Arteriolen, die vom arcuaten Hauptstamm abzweigen zu finden. Renin erstreckt sich nahezu kontinuierlich fortlaufend über die großen Gefäße. In diesem Stadium ist Renin folglich auch an fast allen Verzweigungspunkten zu finden.

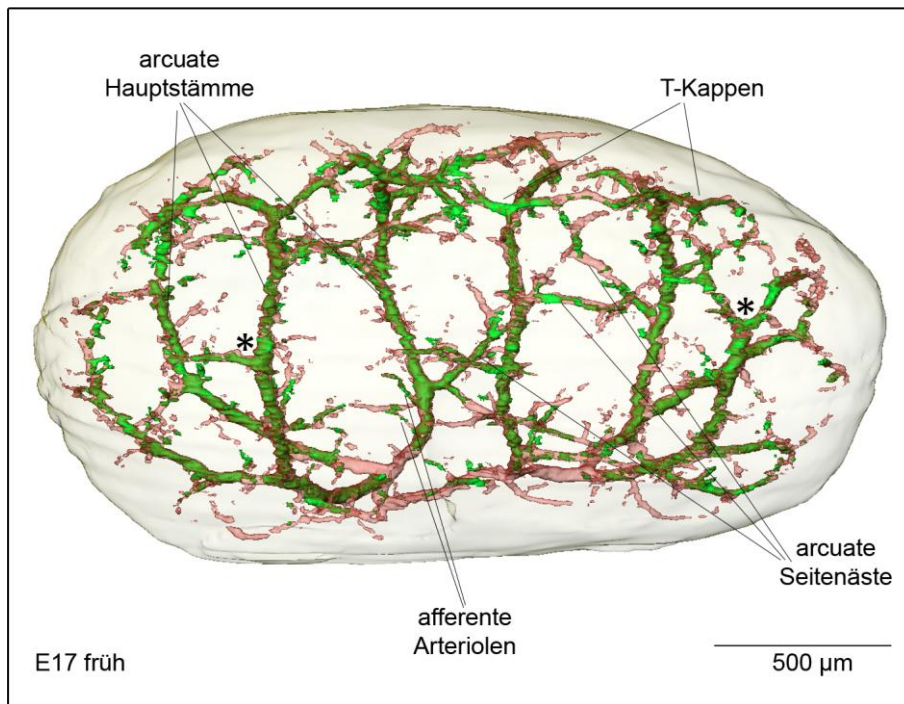


Abb.3.20 – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am frühen E17 im arteriellen Gefäßsystem (rot).

Später Embryonaltag 17:

Am späten Embryonaltag 17. verschwindet die ausgeprägte Reninexpression allmählich, vor allem von den proximalen Abschnitten der arcuaten Hauptstämme (nahe ihren Ursprungspunkten aus den A. Interlobares). Die Reninexpression erscheint nun in einem eher marmorierten Muster, das heißt die Reninexpression erstreckt sich meist nicht kontinuierlich, sondern ist durch reninfreie Bereiche unterbrochen (Abb.3.21a). In den arcuaten Seitenästen ist die Reninexpression nicht konstant, da einige völlig frei von Renin sind. Die Mehrzahl der bestehenden afferenten Arteriolen exprimieren Renin streng auf ganzer Länge, egal ob diese direkt am arcuaten Hauptast entspringen oder von den arcuaten Seitenarterien abzweigen. In den A. interlobulares, die in diesem Stadium erstmalig aus den arcuaten Seitenarterien entspringen, ist wenig Reninexpression vorzufinden (Abb.3.21a, b).

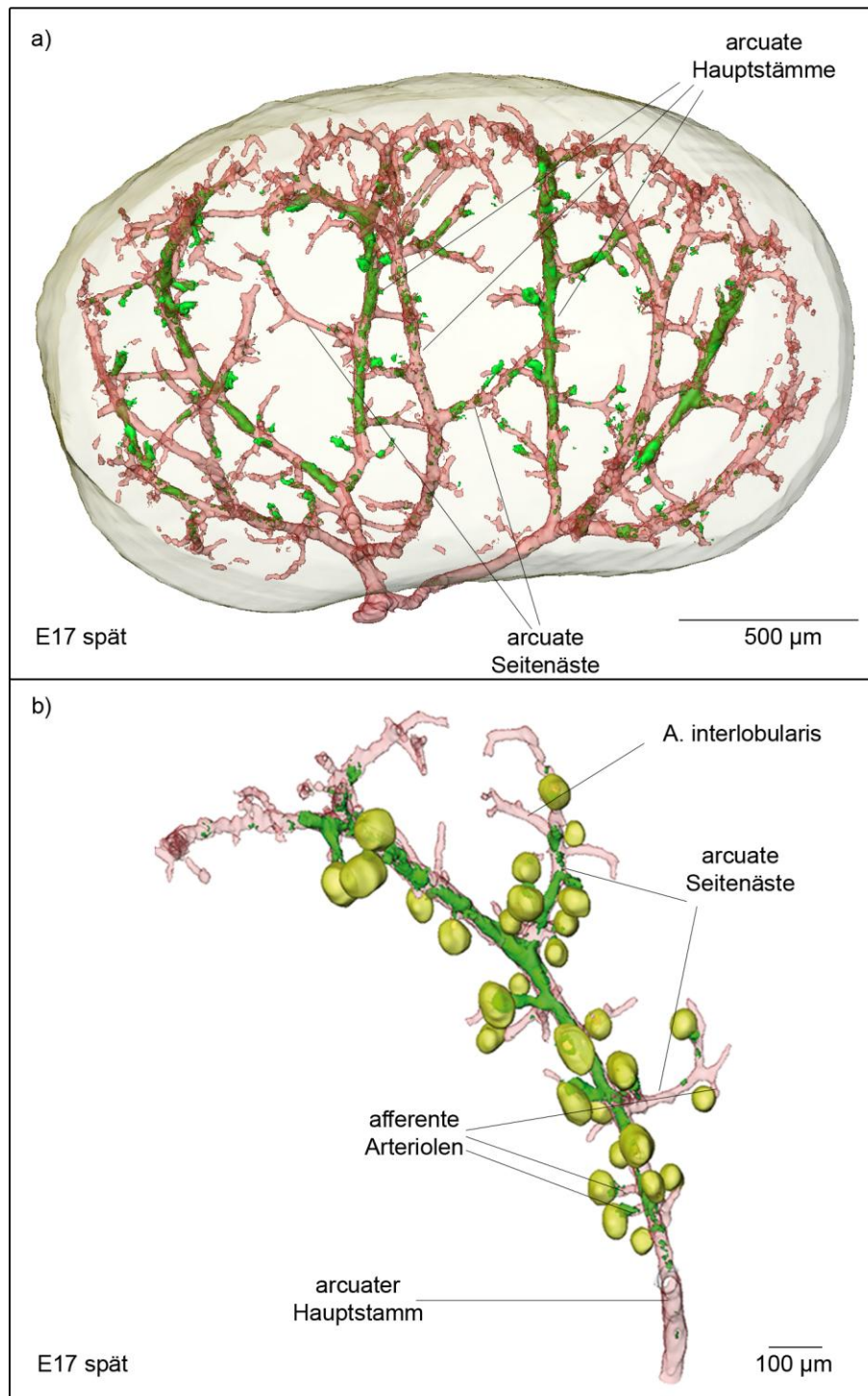


Abb.3.21 – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am späten E17 **a)** im arteriellen Gefäßsystem (rot); **b)** in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb).

Embryonaltag 18:

Am 18. Embryonaltag zieht sich die Reninexpression von den proximalen Bereichen der arcuaten Hauptstämme weiter zurück, einschließlich der Arterien, die aus dieser Region wachsen (Abb.3.22a, b). Dort bleibt Renin bereits an der juxtaglomerulären Position bestehen. Aus den arcuaten Seitenästen ist die Reninexpression zum Teil von

den proximalen Bereichen verschwunden und eher distal vorzufinden, wobei in einigen arcuaten Seitenarterien Renin noch durchgehend zu beobachten ist. Die A. interlobulares weisen nur wenig Reninexpression auf. In den afferenten Arteriolen, die direkt aus den arcuaten Seitenästen entspringen, kommt Renin sowohl auf ganzer Länge, unterbrochen, gar nicht oder schon am terminalen Ende vor.

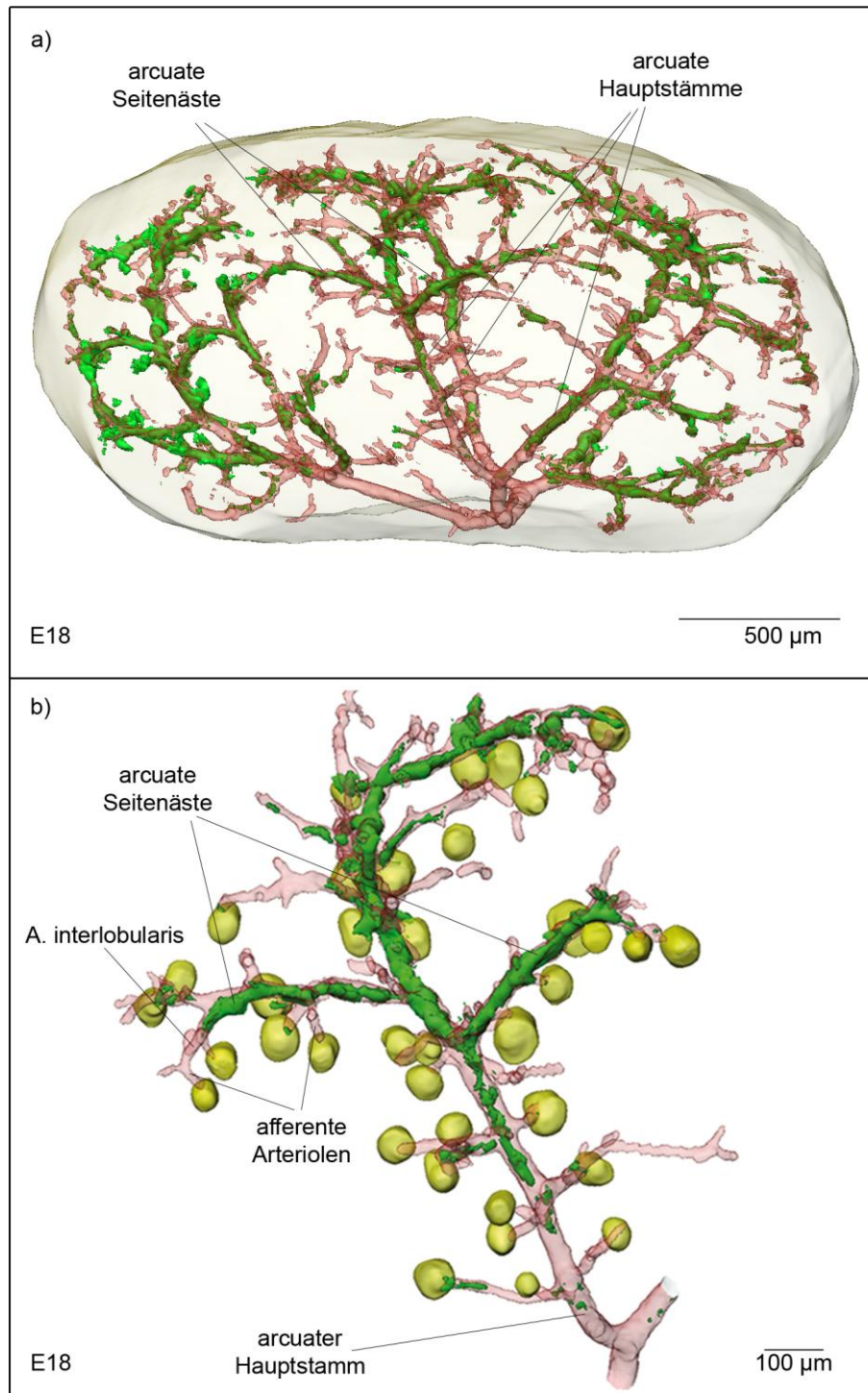


Abb.3.22 – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am E18 **a)** im arteriellen Gefäßsystem (rot); **b)** in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb).

Postpartaler Tag 1:

Am pp1 hat sich die Reninexpression aus dem arcuaten Hauptstämmen weitgehend zurückgezogen. In dieser Entwicklungsphase ist Renin hauptsächlich in den arcuaten Seitenarterien in einem gefleckten Muster lokalisiert (Abb.3.23a, b).

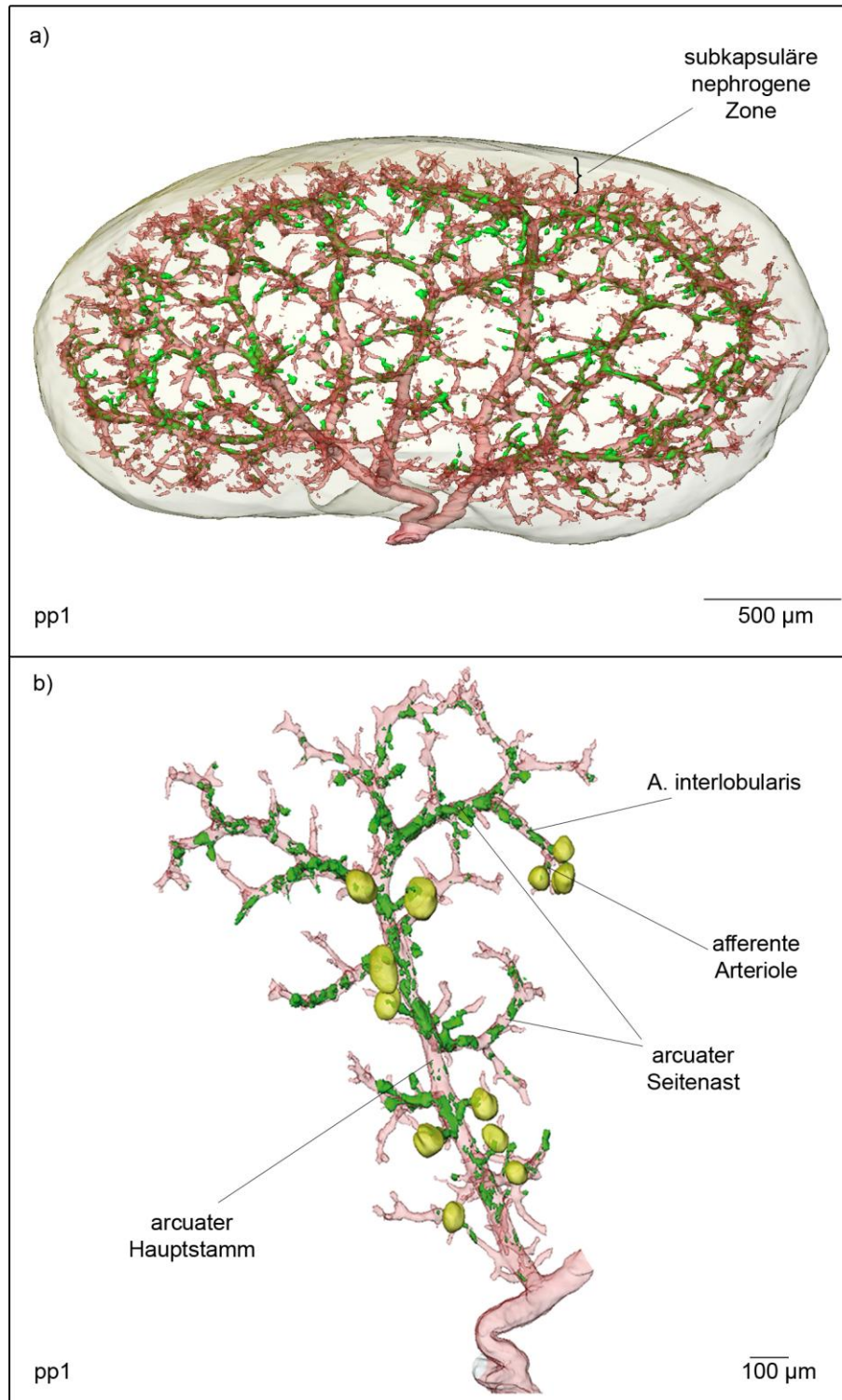


Abb.3.23 – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am pp1 **a)** im arteriellen Gefäßsystem (rot); **b)** in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb).

Zudem ist Renin in A. interlobulares und von denen abgehenden afferenten Arteriolen vorzufinden, wo Renin ungleichmäßig und teils am juxtaglomerulären Pol exprimiert wird. Afferente Arteriolen, die neu von den arcuaten Seitenästen abzweigen sind überwiegend reninfrei. Die A. interlobulares, die sich in der subkapsulären Zone entwickeln, sind komplett frei von Renin.

Postpartaler Tag 3:

Am pp3 ist die Reninexpression in den arcuaten Hauptstämmen vollständig verschwunden. Zudem ist Renin in den arcuaten Seitenarterien reduziert. In diesen Gefäßen verlagert sich die Reninexpression von den proximalen zu den distaleren Abschnitten, einschließlich der A. interlobulares und der afferenten Arteriolen, die aus diesen hervorgehen (Abb.3.24a, b). In vielen Fällen ist die Reninexpression der juxtamedullären afferenten Arteriolen bereits auf die klassische juxtaglomeruläre beschränkt. Die 3D-Rekonstruktion zeigt, dass Renin eher medullär lokalisiert ist. Das heißt die A. interlobulares, samt afferenter Arteriolen, die in der subkapsulären Zone neu hinzukommen sind zunächst reninfrei.

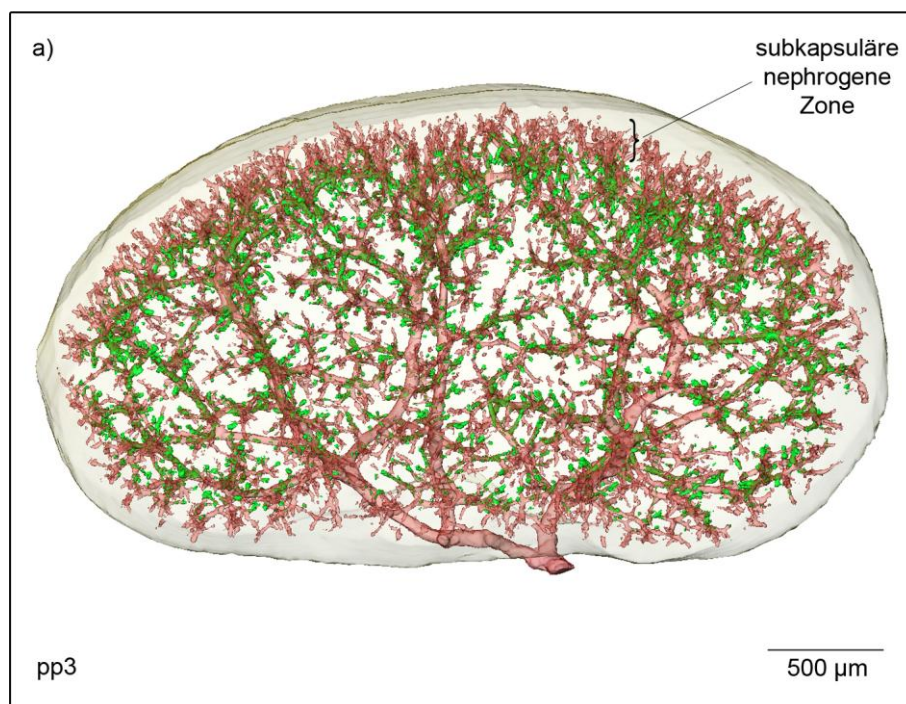


Abb.3.24a – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am pp3 im arteriellen Gefäßsystem (rot).

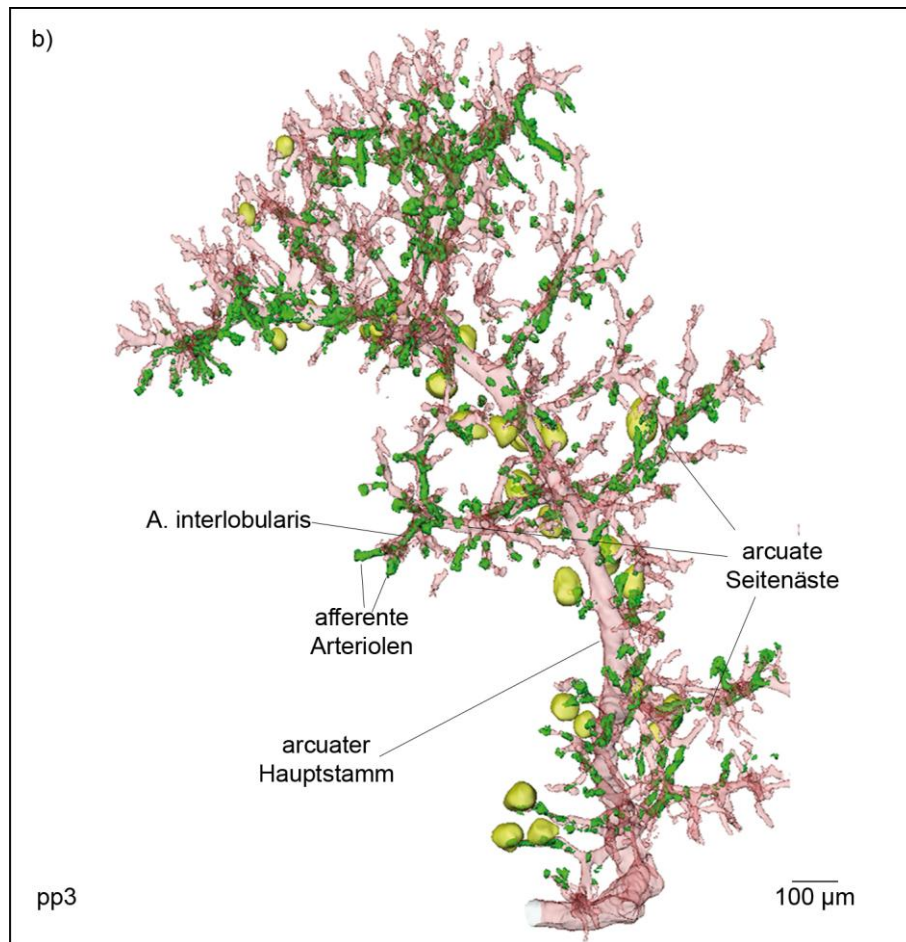


Abb.3.24b – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am pp3 in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb).

Postpartaler Tag 5:

Am pp5 ist die Reninexpression in den arcuaten Seitenästen stark reduziert und nur noch stellenweise vorzufinden. Auch in den Interlobulararterien und afferenten Arteriolen sind Reninimmunreaktionen nur vereinzelt, meist an der juxtaglomerulären Position, beobachtet worden (Abb.3.25a, b). Die sich entwickelnden kortikoradialen Interlobulararterien wie auch die afferenten (kortikalen) Arteriolen, die sich in dieser Region entwickeln, sind frei von Renin (Abb.3.25a).

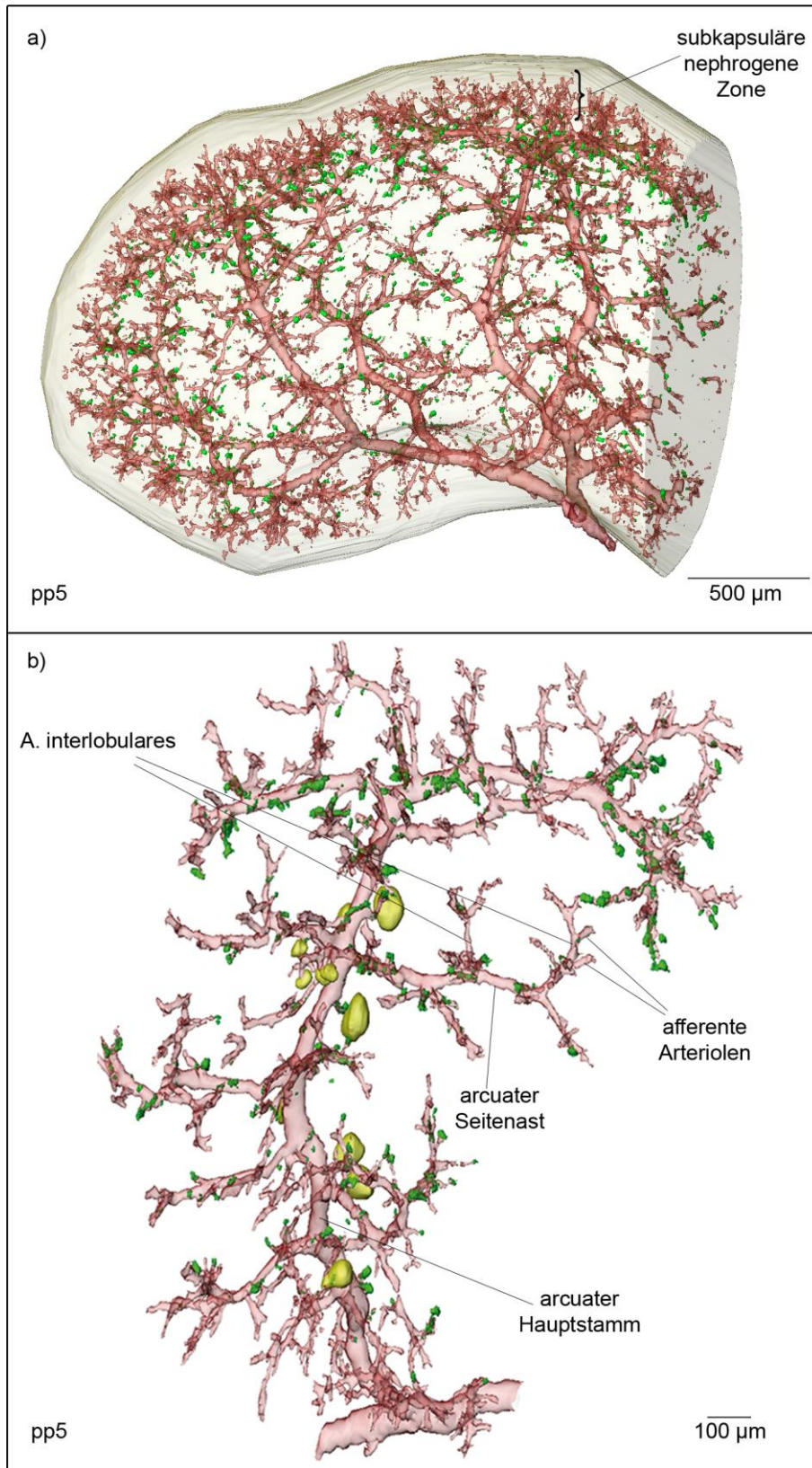


Abb.3.25 – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am pp5 **a)** im arteriellen Gefäßsystem (rot); **b)** in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb).

Postpartaler Tag 7:

Am pp7 ist Renin in den arcuaten Seitenästen nicht mehr zu sehen (Abb.3.26a,b).

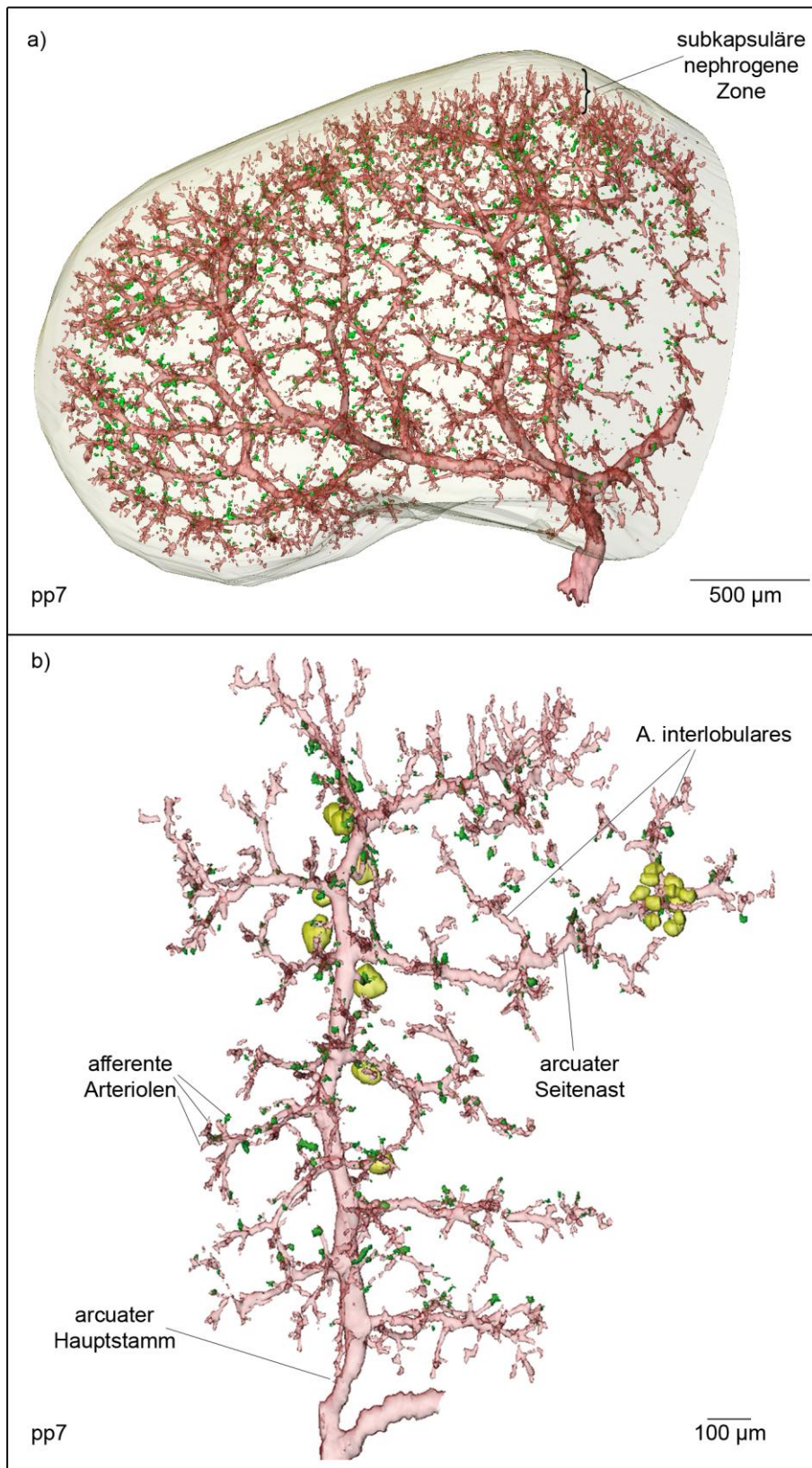


Abb.3.26 – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am pp7 **a)** im arteriellen Gefäßsystem (rot); **b)** in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb).

Auch in den juxtamedullären Interlobulararterien ist die Reninexpression weitgehend reduziert. Hauptsächlich wird Renin in juxtamedullären afferenten Arteriolen, meist an der terminalen Position exprimiert. In der subkapsulären Zone weisen die Interlobulararterien, wie auch die sich dort entwickelnden afferenten Arteriolen immer noch keine Reninexpression auf (Abb. 3.26a, b).

Postpartaler Tag 10:

Am pp10 ist die Reninexpression nicht mehr in den A. interlobulares zu beobachten. Renin ist in diesem Entwicklungsstadium bereits nur auf die juxtaglomeruläre Position beschränkt. Zudem ist Renin erstmalig auch in der subkapsulären Zone nachweisbar, und zwar auch am terminalen Ende der afferenten Arteriolen (Abb.3.27).

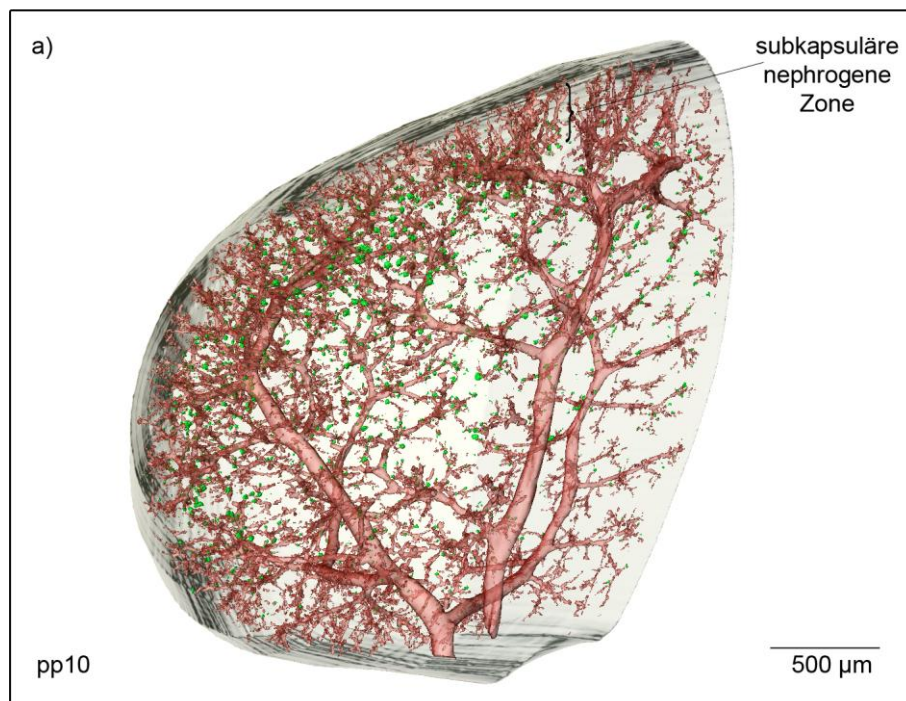


Abb.3.27a – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am pp10 im arteriellen Gefäßsystem (rot).

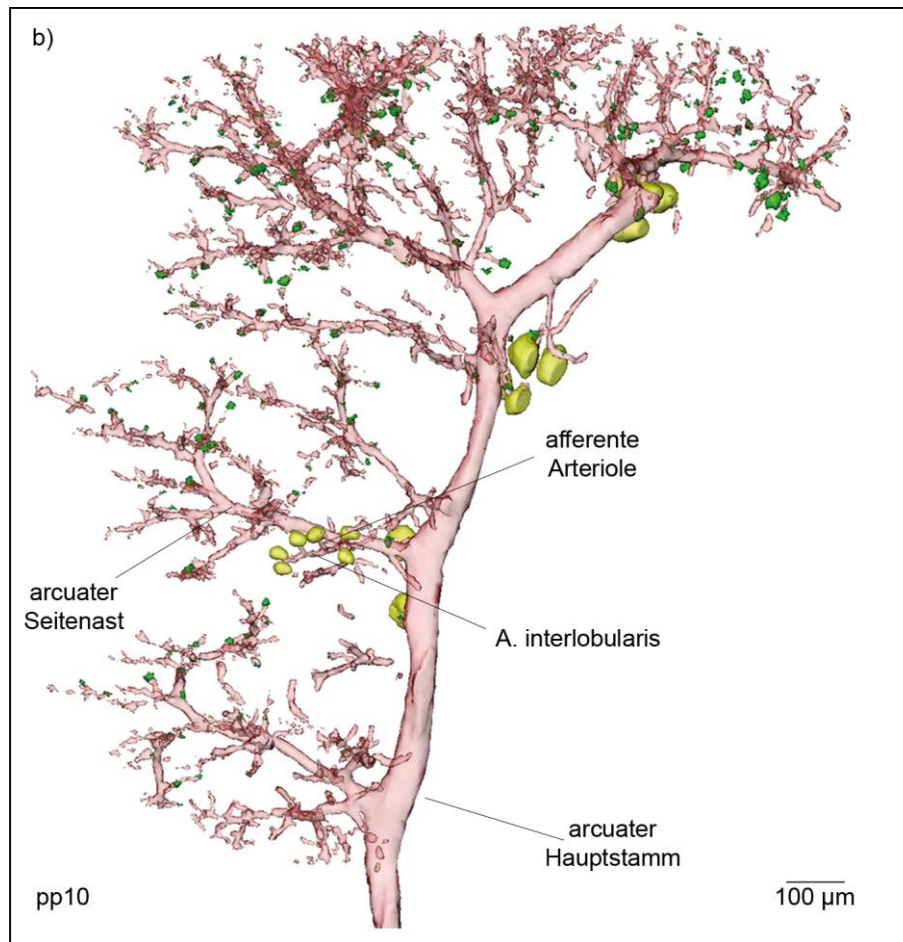


Abb.3.27b – 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am pp10 in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb).

Adultzustand:

In der adulten Niere ist die Reninexpression punktförmig lokalisiert, wobei sich Renin ausschließlich auf den terminalen Pol der afferenten Arteriolen begrenzt. Die Reninexpression in den juxtamedullären afferenten Arteriolen verschwindet zum Großteil. So findet man Renin eher kortikal als medullär, wobei viele Glomeruli keine Reninexpression aufweisen. An freien Gefäßendigungen, sowie an Gefäßverzweigungen wurde kein Renin gefunden (Abb.3.28).

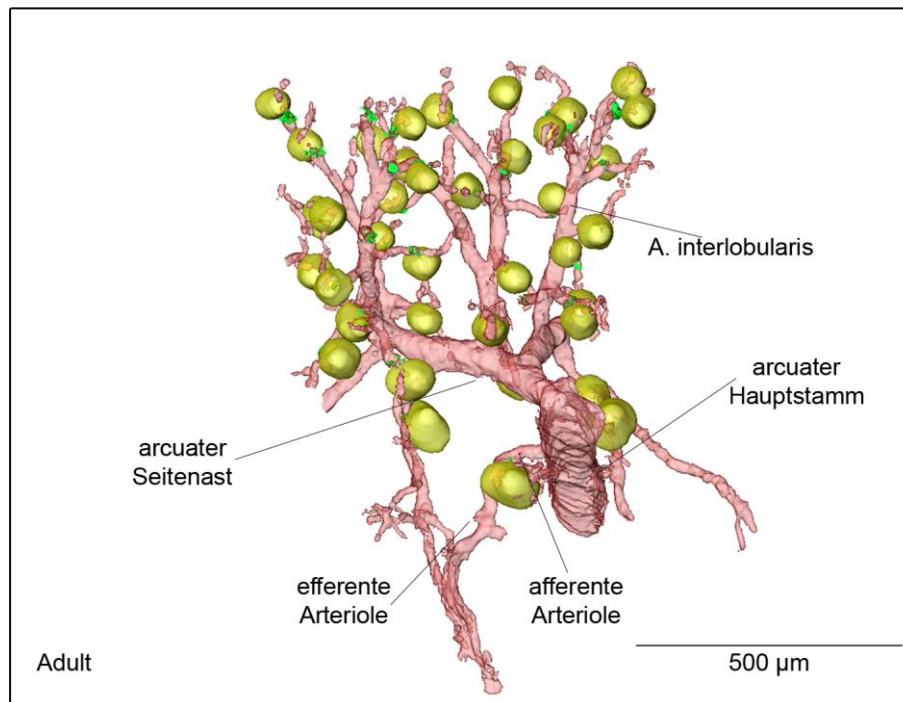


Abb.3.28 – 3D-Rekonstruktion der Reninverteilung (grün) eines kortikalen Bereiches des arteriellen Gefäßsystems (rot) im Adultzustand (90d).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Reninexpression während der Entwicklung erstmals am E15 in einem völlig diskontinuierlichen, punktförmigen Muster in den arcuaten Hauptstämmen auftaucht. Von da aus expandiert Renin über nahezu den gesamten Gefäßbaum, auch retrograd in Richtung A. renalis, wobei jedoch in der A. renalis selbst und auch in den beiden A. interlobares keine Reninimmunreaktionen zu beobachten waren. Schließlich zieht Renin sich von den arcuaten Hauptstämmen über die Seitenäste in die kleineren Gefäße zurück. Dabei ist Renin zunächst in den kleineren medullären Arterien, A. interlobulares und A. afferentes vorzufinden, während die subkapsuläre nephrogene Zone anfangs frei von Renin ist. Ab pp10 ist Renin auch dort lokalisiert. Final bleibt die Reninexpression ausschließlich in der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriolen erhalten.

3.3 Zelluläre Analyse der Reninexpression

Die Betrachtung der Reninexpression an histologischen Schnitten in einer hohen Vergrößerung macht deutlich, dass Renin in jedem Entwicklungsstadium in isolierten Zellen lokalisiert ist. Diese Zellen formen die innere Mediaschicht der Blutgefäße (Abb.3.29, durch Pfeile gekennzeichnet). Es konnte kein spezielles wiederkehrendes zelluläres Muster für die Reninexpression während der Entwicklung beobachtet werden, ausgenommen wenn Renin die juxtaglomeruläre Position der afferenten Arterien erreicht. Des Weiteren wurde festgestellt, dass an Aussprossungen und sich entwickelnden oder bereits bestehenden Verzweigungspunkten Renin nie zu beobachten war (Abb.3.29, Aussprossungen/Verzweigungspunkte durch Sterne angedeutet).

Auffallend ist, dass Renin während der Entwicklung in den größeren Gefäßen parallel zum Glattmuskelaktin koexprimiert wird (Abb.3.29, Pfeile kennzeichnen Koexpression). Sobald die Reninexpression die klassische juxtaglomeruläre Position erreicht, verschwindet die Koexpression allmählich. Die reninbildenden Zellen, die direkt am vaskulären Pol lokalisiert sind, exprimieren zum Teil nur Renin und kein Glattmuskelaktin. Dieses Phänomen ist nicht auf die ausgereifte Niere beschränkt, sondern wurde in allen Entwicklungsstadien beobachtet, sobald die Reninexpression die afferenten Arteriolen erreicht hat. Je weiter die reninbildenden Zellen am vaskulären Pol lokalisiert sind, desto mehr Renin und weniger Glattmuskelaktin wird exprimiert. Es scheint also eine indirekt proportionale Beziehung zu bestehen.

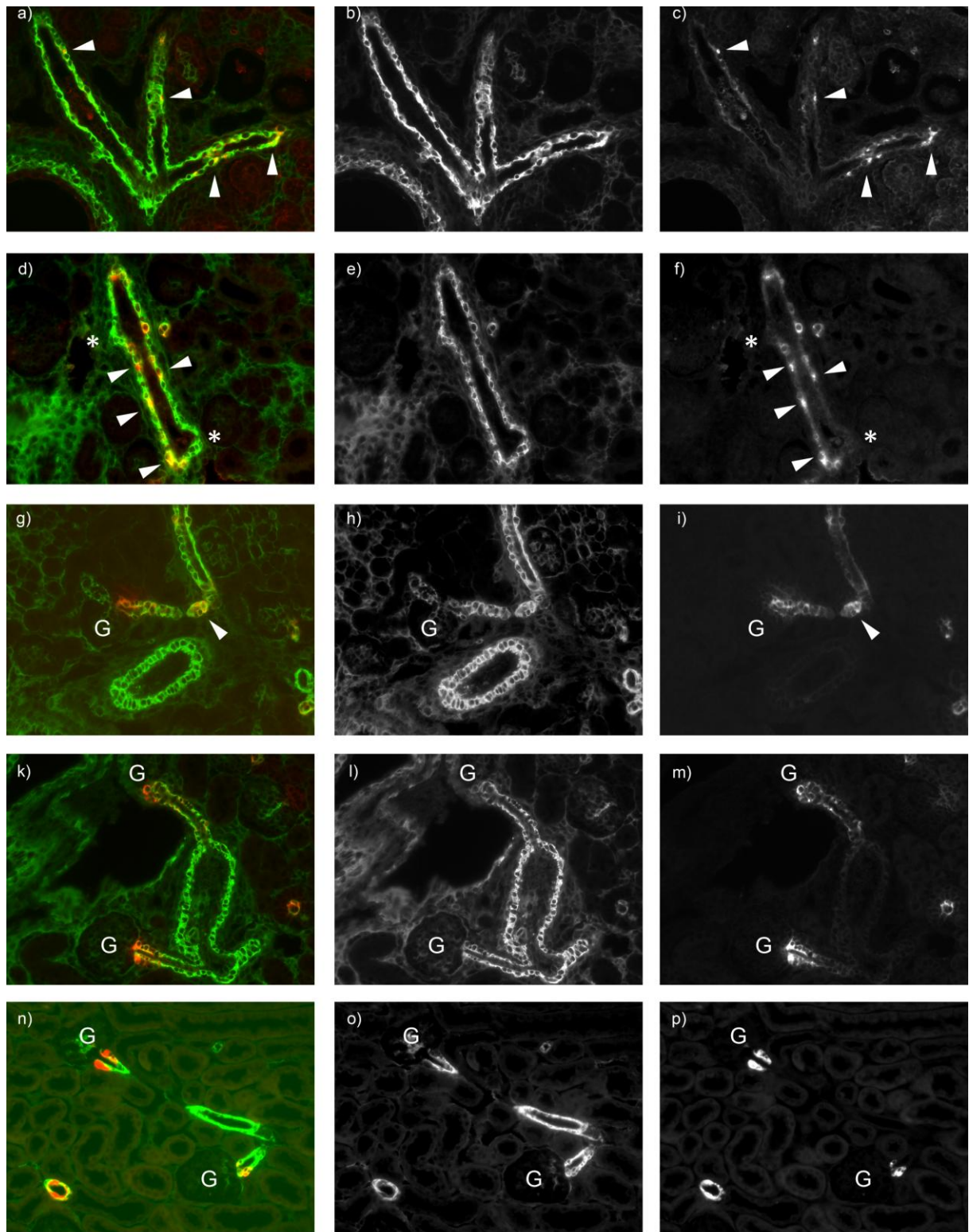


Abb.3.29 – Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinierschnitten der Stadien E16 (a-c), E18 (d-f), pp3 (g-i), pp5 (k-m), Adult (n-p). Abgebildet sind in der ersten Spalte Glattmuskelaktin Immunreaktionen (grün) und Renin Immunreaktionen (rot). Gelb zeigt die Kolokalisation von Glattmuskelaktin und Renin. In der zweiten Spalte sind nur die Glattmuskelaktin-Immunreaktionen und in der dritten nur die Renin-Immunreaktionen dargestellt. Die Vergrößerung ist 400fach. (G=Glomerulus; Pfeile zeigen Koexpression von Glattmuskelaktin und Renin; Sterne deuten auf Aussprossungen/Verzweigungspunkte).

3.4 Quantifizierung der Reninexpression in der Nierenentwicklung

Während der Nierenentwicklung steigt die Anzahl der einzelnen Gefäße, die Renin exprimieren deutlich an, wobei die relative Menge an Renin pro Gefäß geringer wird. Um die Quantität der Reninexpression pro Entwicklungsstadium bestimmen zu können, wurde mittels *Amira* das Reninvolumen bestimmt. Vergleichend dazu wurde mit Hilfe des *Roche Light Cyclers* der Renin mRNA Gehalt der gesamten Niere und die relative Renin mRNA Abundanz der verschiedenen Stadien gemessen. Außerdem wurde das Volumen der Blutgefäße und der Niere mittels *Amira* berechnet.

Reninvolumen

Das Reninvolumen pro Niere wurde mittels *Amira* anhand reninpositiver Immunreaktionen in Voxel für jedes Stadium der Nierenentwicklung gezählt und daraus das Volumen berechnet ($1\text{Voxel} = 2 \times 10^{-5} \text{ nl}$). Wie aus Abbildung 3.30 hervorgeht, steigt das Reninvolumen ab dem 15. Embryonaltag bis zur Geburt steil an und nimmt dann gemäßigt bis zum Adultstadium (90d) weiter zu. Am zehnten Tag nach der Geburt ist das Reninvolumen nahezu wie in der adulten Niere (Abb.3.30).

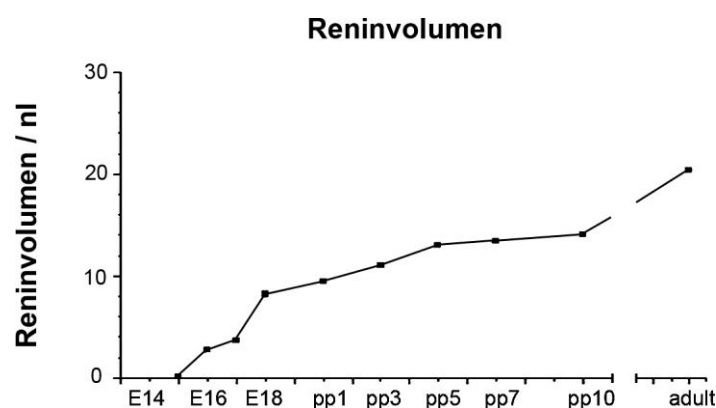


Abb.3.30 – Zeitkurve des Reninvolumens während der Entwicklung der Mausnieren. Die Daten sind Einzelwerte pro Entwicklungsstadium. Sie sind anhand der reninpositiven Immunreaktionen der Nieren, die in Abschnitt 3.2. dargestellt sind, mittels *Amira* berechnet und in nl angegeben.

Renin mRNA-Gehalt und relative Abundanz:

Diese zeitabhängige Änderung des Reninvolumens entspricht ziemlich genau dem gesamten Renin mRNA-Gehalt der Niere während der Nierenentwicklung (Abb.3.31). Für die Quantifizierung der Reninexpression wurde die Gesamt RNA von jeweils drei bis neun Nieren in der embryonalen, postnatalen sowie adulten Phase isoliert und die Renin mRNA am *Roche Light-Cycler* bestimmt. Um den gesamten Renin mRNA-Gehalt der Niere zu erhalten, wurde die Renin mRNA mit der mRNA-Ausbeute multipliziert.

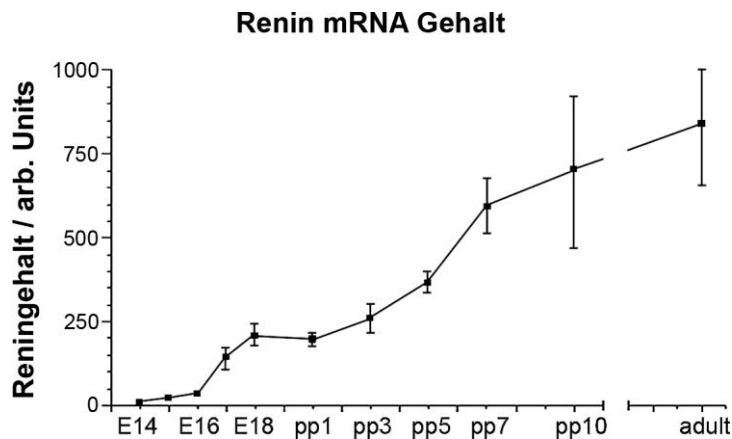


Abb.3.31 – Zeitkurve des renalen Renin mRNA Gehalts während der Entwicklung der Mausnieren. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 3-9 Nieren pro Entwicklungsstadium.

Die Reninmenge ist in der adulten Niere am höchsten, obwohl die relative Renin mRNA-Abundanz ein Maximum kurz nach der Geburt hat. Für die Berechnung der Renin mRNA-Abundanz wurde $1\mu\text{g}$ der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Als Bezugssystem diente GAPDH.

Betrachtet man die Renin mRNA-Abundanz während der Entwicklung, so ergibt sich ein glockenförmiger Verlauf. Der mRNA-Spiegel steigt ab dem 14. Embryonaltag bis zur Geburt stetig an, geht in der frühen postpartalen Phase in ein Plateau über und fällt postpartal wieder ab. Am pp1 liegt der relative mRNA-Spiegel fast um den Faktor sechs höher als im Adulttier. Die Abundanz im adulten Zustand entspricht der von E14 (Abb.3.32).

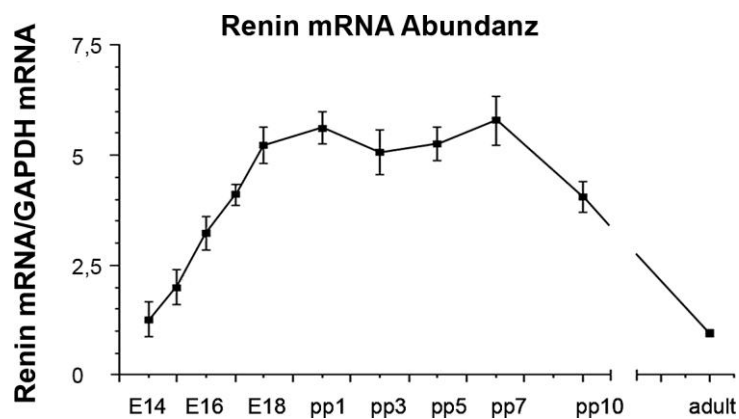


Abb.3.32 – Relative Renin mRNA-Abundanz in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 3 bis 9 Tieren pro Stadium.

Nierenvolumen:

Im Unterschied zu dem eher sigmoiden Verlauf des Reninvolumens und der Renin mRNA Gesamtausbeute, wächst das Gesamtvolumen der Niere, nach Abzug des Volumen des Nierenbeckens, im Verlauf der Entwicklung exponentiell an (Abb.3.33.).

Im Vergleich zum Reninvolumen zeigt die Kurve in der postpartalen Periode keine klare Abflachung, sondern steigt von pp10 bis zum Adultstadium um das sechs fache.

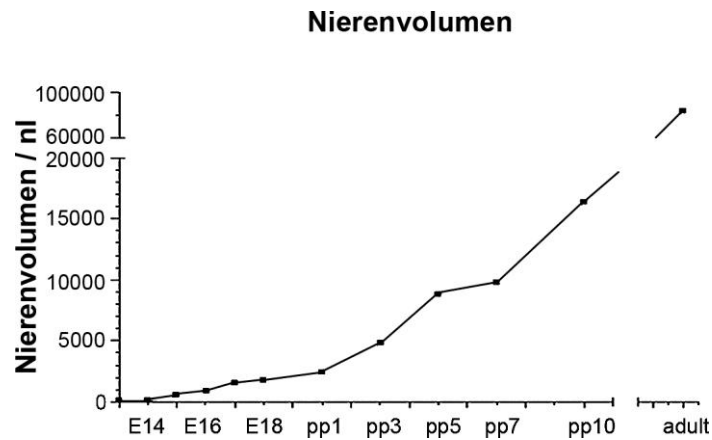


Abb.3.33 – Zeitkurve des Nierenvolumens während der Entwicklung der Mausniere. Die Daten sind Einzelwerte pro Entwicklungsstadium. Sie sind anhand der Nierenkapsel (nach Abzug des Nierenbeckenvolumens) der Nieren, die in Abschnitt 3.1. dargestellt sind, mittels *Amira* berechnet und in nl angegeben.

Gefäßvolumen:

Ebenso nimmt das arterielle/arterioläre Gefäßvolumen, das anhand der positiven Immunreaktionen für Glattmuskelaktin berechnet wurde, während der Entwicklung bis zur vollständigen Nierenreife exponentiell zu (Abb.3.34.). Dieses steigt somit parallel zum Gesamtvolumen der Niere an. Aus den Volumendaten kann für die ausgereifte Niere geschlossen werden, dass dem Reninexpressionsvolumen ca. 0,025% und dem Glattmuskelaktin-Expressionsvolumen ca. 1% des Gesamtnierenvolumens entsprechen.

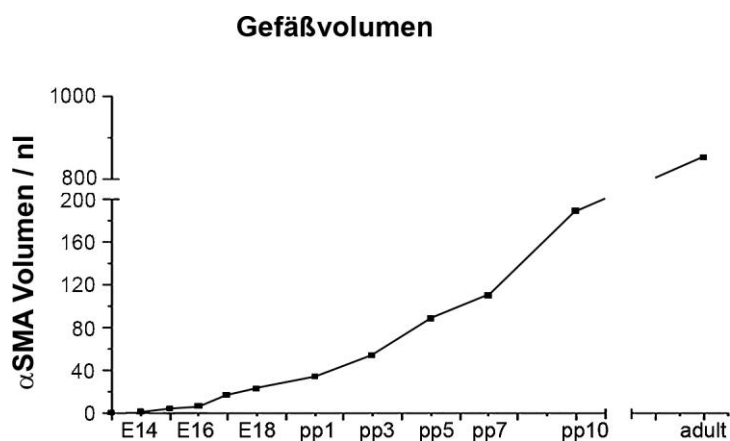


Abb.3.34 – Zeitkurve des Gefäßvolumens während der Entwicklung der Mausniere. Die Daten sind Einzelwerte pro Entwicklungsstadium. Sie sind anhand der der Glattmuskelaktin Immunreaktionen der Nieren, die in Abschnitt 3.1. dargestellt sind, mittels *Amira* berechnet und in nl angegeben.

4. Diskussion

Viele Studien haben sich ausführlich mit der Entwicklung des Metanephros in verschiedenen Spezies beschäftigt. Die meisten dieser Arbeiten konzentrieren sich auf die Entwicklung des Sammelrohrsystems und der Tubuli (Saxén and Lehtonen; 1987) oder betrachten die Glomerulogenese (Spinelli et al., 1974; Kazimierczak et al., 1980; Bertram et al., 1995; Robert and Abrahamson; 2001; Ballermann et al., 2005). Währenddessen ist ausgesprochen wenig über die Entwicklung des komplexen intrarenalen Gefäßsystems bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels einer speziellen Visualisierungsmethode die renale Gefäßbaumentwicklung dreidimensional untersucht.

4.1 Renale Gefäßbaumentwicklung

In Übereinstimmung mit unseren Befunden dokumentierten Lewis (1958), Kazimierczak (1978) und Gomez et al. (1997), dass im Metanephros der Säugetiere sich die A. renalis in eine speziesabhängige Anzahl von A. interlobares aufteilt. Diese zweigen sich erneut in Äste auf, welche die A. arcuatae bilden. Von diesen gehen die A. interlobulares ab, die sich wiederum in afferente Arteriolen aufteilen, die im Kapillarnetz der Glomeruli enden.

Da sich diese Befunde anhand histologischer Schnitte ergaben, bestehen große Differenzen, sowohl in der nomenklatorischen Interpretation als auch in der Lagebeschreibung der einzelnen Arterien. So lässt die Mehrheit der Autoren die A. interlobares ohne klare Abgrenzung in die A. arcuatae übergehen.

Die vorliegende Arbeit ist demnach die erste Studie, die es erlaubt, den Entwicklungsprozess der Mausniere im Hinblick auf den strukturellen Aufbau mit Hilfe dreidimensionaler Darstellung zu verfolgen. So konnten wir ein nahezu konstantes Verzweigungsmuster zeigen. Die A. renalis zweigt sich zunächst in der Hilusregion der Niere in zwei A. interlobares auf, die sich sehr bald in die A. arcuatae aufteilen. Aus einer Interlobararterie geht immer ein linearer Ast zusammen mit einer Trifurkation hervor, wobei die andere Interlobararterie die gleiche Teilung oder auch zwei spätere Bifurkationen durchläuft (vgl. Abb.3.2, Abb.3.3). Anhand unserer 3D-Rekonstruktion wurde die anatomische Nomenklatur so gewählt, dass eine klare Grenze zwischen A. interlobares und A. arcuatae getroffen wurde, da die Aufzweigungen im unteren Drittel der Niere ausgehend von der Hilusregion alle gleicher Ordnung sind (vgl. Abb.3.3).

Ein weiteres Ergebnis unserer Studie ist die Beobachtung einer sehr aktiven Bildung von transversalen arcuaten Seitenästen, die in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Bislang wurde postuliert, dass von den A. arcuatae gleich die A. interlobulares abzweigen (Gomez et al., 1997). Greift man aber im erstellten 3D-Modell einen

kortikalen Glomerulus heraus und verfolgt ausgehend von dessen afferenter Arteriole bis zur A. renalis sämtliche Aufzweigungen, so kann gezeigt werden, dass zwischen der A. arcuata und A. interlobularis eine weitere Arterie liegt, die wir als transversalen arcuaten Seitenast bezeichnen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass diese Seitenäste keine Anastomosen mit anderen Ästen bilden. Dies ist aus der 3D-Darstellung klar ersichtlich. Da zweidimensionale Aufnahmen nur Momentaufnahmen bieten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch Überlappung Fehleindrücke entstehen. Auch alle anderen Arterien, wie zum Beispiel die A. arcuatae anastomieren nicht.

Neben den arcuaten Seitenästen zweigen von den arcuaten Hauptästen direkt afferente Arteriolen ab. Auf diese zweite Gruppe von Ästen, die aus den A. arcuatae entspringen, wird in der Literatur nicht eingegangen.

Durch die Rekonstruktion der Glomeruli wurde zudem deutlich, dass die afferenten Arteriolen, die in embryonalen Stadien aus einem arcuaten Seitenast hervorgehen und einen Glomerulus speisen, sich zu A. interlobulares weiterentwickeln. Diese Beobachtung wurde bislang so nicht beschrieben. Casellas et al. (1994) jedoch beschrieben ein paarweises Auftreten afferenter Arteriolen, die einen gemeinsamen Ursprung haben. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass eine afferente Arteriole, die vom arcuaten Haupt- oder Seitenast hervorgeht, zunächst einen Glomerulus speist und sich dann in zahlreiche afferente Arteriolen aufzweigt (vgl. Abb.3.12 und Abb.3.14). Deshalb sind wir der Meinung, dass sich die zunächst einzelnen afferenten Arteriolen zu A. interlobulares weiterentwickeln.

Übereinstimmungen im zeitlichen Ablauf der Entwicklung bestehen darin, dass der Gefäßbaum in der Mausniere in seiner Grundform zwar während der Fötalzeit ausgebildet wird, aber in Größe und Komplexität postnatal bis zum Erwachsenenstadium zunimmt (Carey et al., 1992). Als geeigneter Marker für das arterielle Gefäßsystem wurde in dieser Studie Glattmuskelaktin gewählt (Carey et al., 1992). Unsere Beobachtung, dass einzelne Glattmuskelaktin Immunreaktionen als Inseln an den Enden der Gefäße zu finden sind, gilt als Anhaltspunkt, dass das Wachstum des kompletten Gefäßbaumes noch fortfährt. Somit wird die Annahme bestätigt, dass die Expression von Glattmuskelaktin für die Bildung der Blutgefäße nur sekundär wichtig ist, einschließlich für die Stabilisierung der Gefäßwände (Carey et al., 1992).

Der Vollständigkeit wegen sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass in Übereinstimmung mit Carey et al., (1992) in frühen embryonalen Stadien in der Niere noch kein Glattmuskelaktin detektiert werden konnte, obwohl andere embryonale Gewebe, wie Herz und Aorta, Glattmuskelaktin exprimieren. Auch der Ureter wird erst ab E16 nahezu vollständig mit Glattmuskelaktin ausgekleidet. In E15 findet man

allenfalls einzelne lose angeordnete glattmuskelaktinexprimierende Zellen um den Ureter. Ferner fiel uns im Gegensatz zu Carey et al., (1992) auch im Adultzustand Glattmuskelaktin in den glomerulären Kapillaren auf, die in der adulten Rattenniere ein Verschwinden von Glattmuskelaktin aus dem glomerulären Kapillarnetz beobachten (vgl. Abb.3.29o).

4.2 Lokalisation der Reninexpression während der Nephrogenese

Die Lokalisation der Reninexpression wurde in der Literatur für verschiedene Spezies des Öfteren beschrieben: im Menschen (Celio et al., 1985; Graham et al., 1992; Phat et al., 1981), im Schwein (Egerer et al., 1984; Kon et al., 1989) im Hamster (Dodge et al., 1993) im Schaf (Kon et al., 1994). Insbesondere gilt dies für Ratte und Maus. In diesen Arbeiten wurde Renin mit größeren Arterien assoziiert beobachtet. Dabei wurde Renin in fötalen Sprague-Dawley Ratten erstmals am 17. Embryonaltag in der A. renalis gefunden (Pupilli et al., 1990). Richoux et al. (1987) detektierten erste Immunreaktionen am E15 in der Gonadenarterie von Wistar Ratten. Später, am E17 wurde Renin in der Aorta, in der A. renalis, in den Gonaden- und den Nebennierenarterien beobachtet (Richoux et al., 1987). Gomez et al. (1986, 1988, 1989) beschrieben Renin in den Wänden der arcuaten und interlobaren Arterien. Auch in der Maus wurde Reninexpression in größeren intrarenalen Gefäßen nachgewiesen (Minuth et al., 1981; Jones et al., 1990).

Dabei wurde in allen Spezies während der Nierenentwicklung des fötalen und postnatalen Lebens eine Verlagerung der Reninexpression von den großen Arterien, über die kleineren, bis hin zu ihrer klassischen JG-Position beobachtet (Gomez et al., 1986; Minuth et al., 1981). Mit Hilfe der in situ Hybridisierung konnte für die Renin mRNA ein ähnliches intrarenales zentrifugales Ausbreitungsmuster von großen intrarenalen Arterien im Fötus zur klassischen Position im adulten Tier beobachtet werden (Gomez et al., 1989).

Diese Studien beruhen jedoch auf Extrapolationen ausgewählter histologischer Schnitte. Über die Reninverteilung besteht deshalb in der Literatur keine einheitliche Auffassung. Durch die, in der vorliegenden Arbeit verwendete, neue Visualisierungsmethode wurden erstmalig andere Einblicke und Perspektiven möglich, die es erlauben die Lokalisation der Reninexpression dreidimensional zu untersuchen.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Befunden, wurde in unserer Studie Renin weder in extrarenalen Gefäßen, noch in der A. renalis und in den A. interlobares gefunden. Entsprechend unseren Beobachtungen beginnt die Reninexpression in den distalen arcuaten Hauptstämmen in einem diskontinuierlichen Muster. Von da aus breitet sich Renin erst in retrograder Weise bis an den Ursprung der A. arcuatae aus, expandiert über deren gesamte Länge, einschließlich der transversalen Seitenäste, um sich schließlich aus ihnen wieder zurückzuziehen und über die A. interlobulares und Vasa afferentia an die klassische juxtaglomeruläre Position zu gelangen.

In allen afferenten Arteriolen, sowohl in den juxtamedullären und kortikalen als auch in denen, die direkt von den arcuaten Hauptästen abgehen, ist die Reninverteilung heterogen. Dies stimmt überein mit den Befunden von Reddi et al. (1998), die während der Entwicklung sieben Verteilungsmuster für Renin entlang der afferenten Arteriolen in der Ratte postulierten. Typ I, Renin wird auf ganzer Länge exprimiert. Typ II, Renin wird weiter upstream vom Glomerulus, aber nicht entlang der gesamten Arteriole gefunden. Typ III, Renin ist in einem gebänderten Muster präsent. Typ IV, Renin ist auf die klassische juxtaglomeruläre Position beschränkt. Typ V, in der Arteriole ist kein Renin vorzufinden. Typ VI und VII sind Mischtypen aus III/IV und III/II. All diese heterogenen Verteilungstypen für die Reninexpression wurden auch in dieser Studie in der Maus beobachtet.

Die Befunde, der angeführten Autoren ergaben sich aus zweidimensionalen Schnitten. Mit welchem räumlichen Muster die reninbildenden Zellen entlang dem sich entwickelnden Nierenarteriensystem auftauchen und wieder verschwinden, ist bislang noch nicht untersucht worden. In Kongruenz mit diesen immunhistochemischen und In situ Hybridisierungs-Befunden konnten wir zum ersten Mal dreidimensional bestätigen, dass die Reninexpression sich während der Entwicklung zentrifugal über den arteriellen Gefäßbaum ausbreitet. Jedoch konnten wir auch zeigen, dass diese Ausbreitung nicht, ausgehend von der A. renalis in einer Richtung von den größeren zu den kleineren Gefäßen, stattfindet, sondern zuerst in den A. arcuatae zu finden ist und sich von da aus zunächst auch retrograd ausbreitet.

An dieser Stelle sollte allerdings noch einmal darauf hingewiesen werden, dass Unstimmigkeiten in der anatomischen Nomenklatur und der Lagebeschreibung der A. interlobares und A. arcuatae bestehen. Wie oben erwähnt, findet man in der Literatur einen Übergang der A. interlobares in die A. arcuatae ohne definierte Abgrenzung. So beschreiben Kon et al. (1989) Renin entlang der A. interlobares. Beim Vergleich der histologischen zweidimensionalen Schnitte würden wir auf ein ähnliches Ergebnis kommen, da die von Kon et al. beschriebenen A. interlobares möglicherweise unseren

A. arcuatae entsprechen. Aus diesem Grund müssen Unstimmigkeiten in der Reninverteilung kritisch betrachtet werden.

Übereinstimmungen in Hinsicht auf den Zeitpunkt, wann die Reninexpression zum ersten Mal zu beobachten ist, ergeben sich bei den Befunden von Jones et al. (1990) und Kon et al. (1998) an Mäusen. So konnten wir bestätigen, dass Renin in der Mausniere am 15. Embryonaltag zum ersten Mal auftaucht.

Abweichende zeitliche Angaben lassen sich erklären, da in der Literatur beschriebene Stadien mit den Stadien dieser Arbeit eventuell nicht exakt übereinstimmen, da die Verpaarung der Versuchstiere terminlich schwer festzulegen ist. Außerdem sind die Embryonen in einem Muttertier, das heißt, die Geschwister aufgrund ihrer ungleichen uterinen Versorgung über die Plazenta und Nabelschnur hinsichtlich ihrer Größe unterschiedlich. Innerhalb von wenigen Stunden sind enorme Entwicklungsfortschritte zu verzeichnen.

Studien über den Ursprung der reninbildenden Zelle ergeben in der Literatur auch kein einheitliches Bild. So besagt eine Hypothese von Sequeira Lopez et al. (2001) und Reddi et al. (1998), dass die Reninzellen als eigene Entität erstmals im metanephrogenen Mesenchym auftreten, sekundär mit dem sich entwickelnden arteriellen Gefäßbaum assemblieren und sich dann mit dem Gefäßbaum geordnet weiterverbreiten. Nach einer anderen Hypothese entwickeln sich die reninbildenden Zellen in der Gefäßwand ohne absolut nierenspezifischen Induktor, weil sich vor allem während der Entwicklung, aber auch im adulten Organismus reninbildende Zellen in der Mediaschicht extrarenaler Arterien finden lassen (Richoux et al., 1987, Fuchs et al., 2002). Sequeira Lopez et al. (2004) beschreiben die reninbildende Zelle als Vorläufer für eine Reihe nicht reninexprimierender Zelltypen, wie glatte Muskelzellen, glomeruläre und tubuläre Epithelzellen, Mesangialzellen und extrarenale Zellen, die in Abhängigkeit vom Stimulationszustand des RAAS die Fähigkeit zur Reninsynthese an- bzw. abschalten. So wurde Renin intrarenal außerhalb des Gefäßbaumes in großen, runden bis ovalen Precursor-Zellen mitten im lose organisierten Mesenchym als einzelne Zellen oder in kleinen Gruppen von zwei bis drei Zellen entdeckt (Liu and Ballermann, 1998; Gomez et al., 1998; Richoux et al., 1987; Sequeira Lopez et al., 2003 und 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Reninexpression ausschließlich in Assoziation mit dem arteriellen Gefäßbaum beobachtet werden. Außerhalb der Glattmuskelaktin exprimierenden Gefäßstrukturen und im Besonderen im Mesenchym konnte kein Renin detektiert werden.

In der adulten Niere ist Renin an der typischen juxtaglomerulären Position lokalisiert (Barajas et al., 1986; Taugner et al., 1979). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Reninzellen kein Glattmuskelaktin exprimieren. Am terminalen Pol der Glomeruli wird keine Koexpression von Renin und Glattmuskelaktin gefunden. Dies wurde nicht nur im adulten Zustand festgestellt, sondern sobald die reninexprimierenden Zellen die klassische Position erreicht haben (vgl. Abb.3.29). Diesen Befund bestätigten auch Liu and Ballermann (1998).

Reddi et al., (1998) postulierten bei der adulten Ratte, dass 47% der afferenten Arteriolen Renin an der JG-Position exprimieren, 34% kein Renin exprimieren und der Rest ein gestreiftes bzw. ein rekrutiertes Muster aufweist. Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch Taugner und Hackenthal (1989) für die Ratte. Augenscheinlich können wir diesen Befund für die adulte Niere der Maus bestätigen (vgl. Abb.3.28).

Weitere Studien ergaben eine Expression von Renin in verschiedenen Bereichen, die in dieser Studie nicht belegt werden konnten. Beispielsweise wurde Renin in der nephrogenen Zone, in den S-förmigen Körperchen detektiert. Gomez et al. (1989) beobachteten in Rattennieren des E20, dass Renin im unteren Spalt der S-förmigen Körperchen exprimiert wird. Auch Richoux et al. (1987) wiesen eine Lokalisation von Renin in S-förmigen Körperchen in Ratten nach. Diese Beobachtung ließ sich in der vorliegenden Arbeit für die Maus nicht bestätigen. Bei den Untersuchungen von Gomez et al. handelt es sich allerdings um die Renin-mRNA Verteilung, die mit der in situ Hybridisierung lokalisiert wurde, und nicht wie in dieser Arbeit um eine immunhistochemische Studie und damit um den Proteinnachweis.

Außerdem wurde immunhistochemisch gezeigt, dass Renin in Assoziation mit dem distalen Tubulus (Rohrwasser et al., 1999) und im Sammelrohrsystem (Rohrwasser et al., 2003) gefunden wird. Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit ebenfalls nicht bestätigt werden.

4.3 Quantifizierung der Reninexpression

Obwohl das Reninvolumen in der adulten Niere, verglichen mit der sich entwickelnden Niere, auf den ersten Blick eher niedrig wirkt, veranschaulichen unsere Daten, dass die Menge an reninbildenden Zellen in der adulten Niere am höchsten ist. Dies wurde sowohl an der Bestimmung des Total Renin mRNA Gehalts der Niere (Renin mRNA x mRNA Ausbeute) als auch an dem, mittels *Amira*, berechneten Reninvolumen an verschiedenen Entwicklungsstufen gezeigt (vgl. Abb.3.30 und Abb.3.31). Beide Kurven weisen einen sigmoiden Verlauf auf. Da aber das Nieren- sowie das Gefäßwachstum (vgl. Abb.3.33 und Abb.3.34) einer eher exponentiellen Kinetik folgen, scheint die

Regulation des Renins nicht von der Größenzunahme des ganzen Organs abzuhängen.

Betrachtet man die relative Abundanz der Reninexpression (Renin mRNA/GAPDH mRNA), so erreicht der Renin mRNA Spiegel kurz nach der Geburt ein Maximum und fällt postnatal wieder ab, was mit den Befunden von anderen Arbeitsgruppen übereinstimmt. Gomez et al. (1989) und Yosipiv et al. (1996) postulierten bei der Ratte, dass der renale Renin mRNA-Spiegel am Embryonaltag 20, verglichen mit dem von adulten Tieren, 20 bzw. 6 mal höher ist. Ähnliche Befunde ergaben auch Untersuchungen an anderen Spezies, wie Maus, Kaninchen, Schwein und Mensch (Drukker et al., 1983; Carbone et al., 1993; Gomez et al., 1991; Taylor et al., 1986).

Aus den parallelen Änderungen der Reninimmunreaktivitätsvolumen, das heißt der Proteinmenge und dem mRNA Gehalt darf geschlossen werden, dass die Proteinmenge nicht durch einen weiteren Faktor beeinflusst wird, sondern direkt vom Reningenexpressionslevel abhängt.

4.4 Mögliche Funktion des Renins während der Entwicklung

Die Beobachtung, dass Renin in embryonalen und neonatalen Mausnieren sowohl anders verteilt ist, als auch in höherer Konzentration als in adulten Tieren produziert wird, wirft die Frage auf, ob Renin während der Entwicklung die gleiche Aufgabe erfüllt wie im Adulttier bzw. welche Funktion embryonal produziertes Renin in der Entwicklung hat. Denkbar wäre, dass die Reninverteilung die phylogenetische Entwicklung widerspiegelt. Bei primitiven Fischen z.B. ist Renin in den großen renalen Arterien lokalisiert und wirkt rein endokrin. Es trägt also nur zur systemischen Blutdruckregulation bei (Nishimura, 1978). Erst im Säuger mit der Entwicklung des juxtaglomerulären Apparates mit Macula densa, Henle'scher Schleife und der Lokalisation in den afferenten Arteriolen am vaskulären Pol der Glomeruli, übernimmt Renin vermutlich eine parakrine Funktion, was bedeutet, es spielt bei der tubulären und glomerulären Regulation (Tubuloglomerulärer Feedbackmechanismus TGF, Schnermann and Briggs, 1986; Schnermann, 1998) eine Rolle. Im adulten Tier ist Renin zusätzlich auch für die Aldosteronausschüttung zuständig (Minuth et al., 1981).

In der Literatur ist die bedeutende Rolle des RAAS für die Nierenentwicklung unbestritten. So wurde in verschiedenen pharmakologischen Studien und an Knockout Modellen belegt, dass das RAAS sowohl für die Morphologie der gesamten Niere als auch für die arterielle Gefäßentwicklung wichtig ist. Die pharmakologische Inhibition des RAAS (z.B. mit AT-Rezeptor-Blockern, ACE-Inhibitoren) führt während der

neonatalen Phase zu erheblichen renalen Abnormitäten (Friberg et al., 1994; Tufro-McReddie et al., 1995; Guron et al., 1997; Gomez et al., 1999; Guron and Friberg, 2000, Chung et al., 2001).

So ist in der Regel die Anzahl der Glomeruli stark reduziert, und größtenteils zeigen sie eine eingeschränkte Proliferation. Durch die Ausdehnung des interstitiellen Gewebes und einer Dilatation des Nierenbeckens zeigen die Papille und ebenso die tubulären Strukturen eine deutliche Atrophie (Tufro-McReddie et al., 1995; Gomez and Norwood, 1995). Die Schäden bleiben auch im Adultzustand bestehen. Funktionell kennzeichnend ist die fehlende Fähigkeit zur Urinkonzentrierung. Ferner wurde demonstriert, dass die Reduktion der Nephronanzahl durch Glucocorticoide oder ACE-Inhibitoren während der Nephrogenese von Schafen (Moritz et al., 2002) und Ratten (Woods et al., 1998) eine Hypertension im adulten Tier auslösen.

Bedeutsam scheint in diesem Zusammenhang auch der *insulin-like growth factor* (IGF-I) zu sein. Nilsson et al. (2002) beschrieben, dass eine IGF-I-Gabe nach vorausgegangener ACE-Inhibition die renale Funktion und Histologie normalisieren kann. Weiter wurde festgestellt, dass IGF-I zumindest im späten Schafembryo die Reninsynthese stimuliert (Marsh et al., 2001).

Auch Loss-of-function-Modelle des Renin-Angiotensin-Systems (Atg^{-/-}, ACE^{-/-} und AT1^{-/-} Knockout Mäuse) zeigen vergleichbare morphologische und funktionelle Abnormitäten (Nagata et al., 1996; Esther et al., 1996; Tsuchida et al., 1998; Oliverio et al., 1998; Matsusaka et al., 2002). Da bei Nagern die arterielle Verzweigung nach der Geburt ihren Höhepunkt hat, weisen die Knockout Modelle gravierende Missbildungen im Bereich der Gefäße auf, so sind die Arteriolen verdickt und reduziert (Hilgers et al., 1997, Hilgers and Norwood, 1997).

Diese Befunde deuten darauf hin, dass das RAAS eine essentielle Rolle in der morphologischen und funktionellen Entwicklung der Niere spielt. Ob jedoch das Renin selbst für die arterielle Gefäßentwicklung relevant ist, ist bislang noch nicht geklärt.

Die Beobachtung, dass Renin in bereits ausgebildeten Gefäßwänden auftaucht und verschwindet, stimmt mit der These überein, dass Renin möglicherweise keine Voraussetzung für die korrekte Ausbildung des intrarenalen arteriellen Gefäßbaumes ist (Takahashi et al., 2005).

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass keines der Gefäßenden, das heißt, die Bereiche mit dem höchsten Wachstum und der höchsten Verzweigungsaktivität, Reninexpression aufweisen. Bei genauerer Untersuchung stellten wir fest, dass jedes Gefäßende, das reninpositiv ist, einen Glomerulus speist und sich nicht weiter teilt

(siehe Abb.3.19). Die Schlussfolgerung wäre, dass Renin nicht auftaucht, bevor die funktionelle Gefäßwand gebildet ist.

Außerdem ist aus den Daten der vorliegenden Arbeit keine bevorzugte Expression von Renin an Verzweigungspunkten des renalen arteriellen Gefäßbaumes ersichtlich (vgl. Abb.3.29d-f), wie es von Reddi et al. (1998) sowohl für die sich entwickelnde, als auch für die ausgewachsene Rattenniere beschrieben wurde. Reddi et al. (1998) postulierten, dass Renin als angiogener Faktor für die Verzweigung des intrarenalen Gefäßsystems verantwortlich sei, was wir nicht bestätigen konnten.

Besonders auffällig ist, dass die Entwicklung der kortikoriären A. interlobulären in der nephrogenen Zone (subkapsuläre Zone) nicht mit der Hauptreninexpression assoziiert ist. Erst ab dem 10. postpartalen Entwicklungstag wird Renin auch direkt unter der Kapsel gefunden und zwar hauptsächlich in den neu entwickelten kortikalen afferenten Arteriolen.

Als weiteres Beispiel kann das gewebspezifische $G\alpha$ -Knockout Modell angeführt werden. Dabei wurde unter Kontrolle des renalen Reninpromotors das stimulatorische G-Protein ($G\alpha$) und somit der über die Adenylatcyclase vermittelte klassische cAMP-Signalweg in den JGE-Zellen deletiert (Chen et al., 2007). Nach unpublizierten Daten unserer Arbeitsgruppe weisen diese $G\alpha$ -Knockout Mäuse, die nahezu reninfrei sind, ein normal entwickeltes arterielles Gefäßsystem auf.

All diese oben aufgelisteten, unterschiedlichen Aspekte, führen zu dem Eindruck, dass die charakteristischen Änderungen der intrarenalen Reninexpression während der Entwicklung aus dem räumlich-zeitlichen Muster eines bis jetzt nicht identifizierten direkten Aktivators der Reninexpression und weniger von einem An- und Abschalten eines relevanten Transkriptionsfaktors in den Gefäßwänden von präglomerulären Arterien resultieren (Pupilli et al., 1991). Tatsächlich wurde bereits spekuliert, dass die intrarenalen Änderungen der Reninexpression während der Entwicklung ähnlich verlaufen wie die Entwicklung der sympathischen Nerven (Pupilli et al., 1991). Pupilli et al. (1991) postulierten, dass sich die Innervation der Niere im fötalen und postnatalen Leben parallel zur Reninverteilung entwickelt und sich zentrifugal über das Blutgefäßsystem ausbreitet. Es ist bekannt, dass das sympathische Nervensystem eine wichtige Rolle in der Regulation der Reninexpression und Verteilung spielt (Celio, 1986). Pharmakologische Studien haben demonstriert, dass eine Stimulation der Nervenfasern über β -adrenerge Rezeptoren eine Reninfreisetzung in der adulten Niere bewirkt (Nakamura et al., 1989; El Dahr et al., 1990). Inwiefern jedoch die morphologische Entwicklung und die

endokrine Differentiation der JGE-Zelle von renalen Nerven abhängt, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Einen weiteren parallelen Zusammenhang zeigt die Expression des *transforming growth factor-beta* (TGF- β) Typ II Rezeptors. Während der Nierenentwicklung ändert sich die Verteilung der TGF- β Typ II Rezeptoren im gleichen Muster wie die Reninexpression und beschränkt sich im adulten Zustand ebenfalls auf die JGE-Zellen (Liu and Ballermann, 1998). Im adulten Tier wurde bereits nachgewiesen, dass die Expression des TGF- β Typ II Rezeptors bei einer Stimulation des RAAS ansteigt und eine Rekrutierung von JGE-Zellen zu den A. interlobulares zu verzeichnen ist (Horikoshi et al., 1991). Unklar ist jedoch, ob Renin und TGF- β Typ II Rezeptoren von einem gemeinsamen Mechanismus reguliert werden oder einer die Expression des anderen steuert.

Ein möglicher Zusammenhang könnte auch zwischen der Reninexpression und den Angiotensinrezeptoren AT1 und AT2 bestehen. So zeigt der zeitliche Verlauf von AT2 Ähnlichkeiten in der Expression zu Renin. Die Expression von AT2 steigt in der Ratte vom E14 bis zur Geburt an, erreicht um die Geburt einen Höhepunkt, fällt postpartal wieder ab und ist ab der zweiten postnatalen Woche nicht mehr nachweisbar (Gomez, 1998). Währenddessen steigt der AT1 etwas verzögert bis zur Geburt an, flacht etwas ab und bleibt in der adulten Niere enthalten, dabei wird der AT1 zunächst im Mesenchym lokalisiert gefunden und wandert postpartal über die größeren Gefäße in die Glomeruli, wobei der Rezeptor immer erst in den reiferen, juxtamedullären Glomeruli zu finden ist (Gomez, 1998). Der AT1-Rezeptor scheint möglicherweise der Reninverteilung während der Entwicklung zu folgen.

4.5 Ausblick

Um die essentiellen Faktoren, die die Reninexpression auslösen, zu identifizieren und nachzuweisen, ist es jetzt von Interesse die intrarenale Reninexpression während der Entwicklung in Mäusen mit bestimmten Genmutationen zu untersuchen. Dazu soll das räumlich-zeitliche Verteilungsmuster der Reninexpression von verschiedenen Knockout Modellen rekonstruiert werden, wobei die Ergebnisse dieser Arbeit als Referenzsystem dienen. Nahe liegende Kandidaten in diesem Zusammenhang werden sowohl β -adrenerge Rezeptoren, AT1-Rezeptoren als auch der Typ II Rezeptor von TGF- β sein.

5. Zusammenfassung

Während der metanephrogenen Nierenentwicklung findet man Reninexpression in den Wänden größerer intrarenaler Arterien, während sie in der adulten Niere auf den terminalen Teil der präglomerulären Arterien begrenzt ist. Der Mechanismus dieses streng konservierten Phänomens der unterschiedlichen Lokalisation von reninbildenden Zellen ist noch nicht geklärt. Um dies zu untersuchen, haben wir jetzt die dreidimensionale Entwicklung der Reninexpression sowie die Entwicklung und den Verlauf der arteriellen Blutgefäße in der Mausniere während des fötalen und postnatalen Lebens beschrieben. Wir fanden erste Reninimmunreaktionen am 15. Embryonaltag in den Wandzellen der arcuaten Arterien, die auch Glattmuskelaktin exprimieren, punktförmig und in einem völlig diskontinuierlichen Muster. Mit fortschreitender Reifung der Niere steigt die Anzahl der Verzweigungen der arcuaten Arterien exponentiell an, wobei die Reninexpression von den proximalen zu den distalen Teilen des arteriellen Gefäßbaums shiftet. Dabei ist auffällig, dass die Reninexpression nicht nur in eine Richtung, sondern auch retrograd zur A. renalis expandiert. Eine Ansammlung von reninbildenden Zellen an den Verzweigungsstellen, wie sie in der Literatur beschrieben ist, wurde dabei allerdings nicht gefunden. Sämtliche Enden der sich entwickelnden Gefäße sind auch stets reninfrei. Stattdessen erscheint die Reninexpression erst, wenn die Gefäßwände und Aufzweigungen bereits bestehen. Sie verschwindet einige Tage später und bleibt letztendlich nur an den juxtaglomerulären Regionen der afferenten Arteriolen zurück. In den afferenten Arteriolen verschwindet die Koexpression von Renin und Glattmuskelaktin allmählich und die terminalen Zellen exprimieren nur Renin. In allen Stadien der Nierenentwicklung ist die Reninexpression entlang der vergleichbaren Gefäßabschnitte eher heterogen lokalisiert. Wenn die Reninexpression, am Ende der Nierenreifung, die terminalen Teile der afferenten Arteriolen erreicht hat, findet man an den meisten glomerulären Polen reninbildende Zellen, aber nicht an allen.

Wir schließen daraus, dass die Reninexpression sich während der Nierenentwicklung parallel mit dem räumlich-zeitlichen Muster eines noch unbekanntes direkten Aktivators der Reninexpression ändert.

6. Literaturverzeichnis

Abrahamson DR. Glomerulogenesis in the developing kidney. *Semin Nephrol* 11(4):375-389, 1991

Abrahamson DR, Robert B, Hyink DP, et al. Origins and formation of microvasculature in the developing kidney. *Kidney Int Suppl* 67:S7-S11, 1998

Anderhuber F, Weiglein A. Zur Nomenklatur der Nierengefäße. *Ann Anat* 174:229-234, 1992

Aukland, K. Intrarenal distribution of blood flow. Are reliable methods available for measurements in man? *Scand J Clin Lab Invest* 35:481-486, 1975

Bader M, Ganten D. Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med* 78(3):130-139, 2000

Ballermann BJ. Glomerular endothelial cell differentiation. *Kidney Int* 67:1668-1671, 2005

Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 236:240-246, 1979

Barajas L, Salido E. Juxtaglomerular apparatus and the renin-angiotensin system. *Lab Invest* 54(4):361-364, 1986

Bernstein J, Cheng F, Roszka J. Glomerular differentiation in metanephric culture. *Lab Invest* 45(2):183-90, 1981

Bertram JF. Analyzing renal glomeruli with the new stereology. *Int Rev Cytol* 161:111-172, 1995

Carbone GM, Sheikh AU, Rogers S, et al. Developmental changes in renin gene expression in ovine kidney cortex. *Am J Physiol* 264:R591-R596, 1993

Carey AV, Carey RM, Gomez RA. Expression of alpha-smooth muscle actin in the developing kidney vasculature. *Hypertension* 19 [Suppl 2]:168-175, 1992

Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, et al. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100(6):1566-1574, 1997

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessels development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature (Lond.)* 380:435-439, 1996

Casellas D, Dupont M, Bouriquet N, et al. Anatomic pairing of afferent arterioles and renin cell distribution in rat kidneys. *Am J Physiol* 267:F931-F936, 1994

Chen L, Kim SM, Oppermann M, et al. Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein G α in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F27-F37, 2007

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987

Chung NA, Lip GY, Beevers M. Angiotensin-II-receptor inhibitors in pregnancy. *Lancet* 357(9268):1620-1621, 2001

Celio MR, Groscurth P, Inagami T. Ontogeny of renin immunoreactive cells in the human kidney. *Anat Embryol* 173:149-155, 1985

Celio MR. Renin-containing cells in kidney transplants into the anterior eye chamber. *Kidney Int* 29(6):1234-1236, 1986

Davis JO, Freeman RH. Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev* 56:1-56, 1976

Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, et al. Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(19):7552-7556, 1986

Dodge AH. Sites of renin production in fetal, neonatal and postnatal Syrian hamster kidneys. *Anat Rec* 235:144-150, 1993

Drukker A, Donoso VS, Linshaw MA, et al. Intrarenal distribution of renin in the developing rabbit. *Pediatr Res* 17:762-765, 1983

Egerer G, Taugner R, Tiedemann K. Renin immunocytochemistry in the mesonephros and metanephros of the pig embryo. *Histochemistry* 81: 385-390, 1984

Ekblom P. Determination and differentiation of the nephron. *Med Biol* 59(3):139-160, 1981

El Dahr SS, Gomez RA, Gray MS, et al. In situ localisation of renin and its mRNA in neonatal ureteral obstruction. *Am J Physiol* 258:F854-862, 1990

Eng E, Holgren C, Hubchak S, et al. Hypoxia regulates PDGF-B interactions between glomerular capillary endothelial and mesangial cells. *Kidney Int* 68:695-703, 2005

Esther CR Jr, Howard TE, Marino EM, et al. Mice lacking angiotensin converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 74:953-965, 1996

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 4;380(6573):439-442, 1996

Fischer E, Schnermann J, Briggs JP, et al. Ontogeny of NO synthase and renin in juxtaglomerular apparatus of rat kidneys. *Am J Physiol* 268:F1164-F1176, 1995

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 5;267(16):10931-10934, 1992

Fong GH, Rossant J, Gerstenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature (Lond.)* 376:66-70, 1995

Foo SS, Turner CJ, Adams S, et al. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* 124:161-173, 2006

Fourman J, Moffat DB. The blood vessels of the kidney. *Black well Scientific Publications Oxford and Edinburgh*, 1971

Fray JCS, Lush DJ. Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney. *Am J Physiol* 231:936-944, 1976

Fray JCS, Lush DJ. Stretch receptor hypothesis for renin secretion: the role of calcium. *J Hypertens* 2 [Suppl 1]:19-23, 1984

Friis UG, Jensen BL, Sethi S, et al. Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circulation Research* 90:996-1003, 2002

Friberg P, Sundelin B, Bohman S-O, et al. Renin-angiotensin system in neonatal rats: Induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney Int* 45:485-492, 1994

Fuchs S, Germain S, Philippe J, et al. Expression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promoter/LacZ transgenic mouse. *Am J Pathol* 161(2):717-725, 2002

Gomez RA, Chevalier RL, Sturgill BC, et al. Mutation of the intrarenal renin distribution in Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens* 4 [Suppl 5]:S31-S33, 1986

Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, et al. Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney. *Am J Physiol* 254:F582-F587, 1988

Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, et al. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol* 257:F850-F858, 1989

Gomez RA, Chevalier RL, Everett AD, et al. Recruitment of renin gene-expression cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol* 259 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 28):F660-F665, 1990

Gomez RA, Pupilli C, Everett AD. Molecular and cellular aspects of renin during kidney ontogeny. *Pediatr Nephrol* 5:80-87, 1991

Gomez RA, Norwood VF. Developmental consequences of the renin-angiotensin system. *Am J Kidney Dis* 26:409-431, 1995

Gomez RA, Norwood VF, Tufro-McReddie A. Development of the kidney vasculature. *Microsc Res Tech* 39:254-260, 1997

Gomez RA. Role of Angiotensin in renal vascular development. *Kidney Int* 54:12-16, 1998

Gomez RA, Sequeira Lopez ML, Fernandez L, et al. The maturing kidney: development and susceptibility. *Ren Fail* 21(3-4):283-291, 1999

Goormaghtigh N. L'appareil neuromyo-arteriel juxtaglomerulaire du rein; ses reactions en pathologie et ses rapports avec le tube urinifere. *C R Soc Biol* 124:293-296, 1937

Graham PC, Kingdom JC, Raweily EA, et al. Distribution of renin-containing cells in the developing human kidney: an immunocytochemical study. *Br J Obstet Gynaecol* 99:765-769, 1992

Grobstein C. Inductive interaction in the development of the mouse metanephros. *J Exp Zool* 130:319-340, 1955

Grünberger C, Obermayer B, Klar J, et al. The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res* 24;99(11):1197-1206, 2006

Guron G, Adams MA, Sundelin B, et al. Neonatal angiotensin-converting enzyme inhibition in the rat induces persistent abnormalities in renal function and histology. *Hypertension* 29:91-97, 1997

Guron G, Friberg P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J Hypertens* 18:123-137, 2000

Hackenthal E, Paul M, Ganten, et al. Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70:1067-1116, 1990

Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, et al. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126:3047-3055, 1999

Herzlinger D. Renal stem cells and the lineage of the nephron. *Annu Rev Physiol* 56: 671-689, 1994

Hess H, Sinowatz F. Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopische Anatomie. Deutscher Ärzte-Verlag Köln, 3. Auflage, S.285-298, 2000

Hilgers KF, Norwood VF, Gomez RA. Angiotensin's role in renal development. *Semin Nephrol* 17(5):492-501, 1997

Hilgers KF, Reddi V, Krege JH, et al. Aberrant renal vascular morphology and renin expression in mutant mice lacking Angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 29:216-221, 1997

Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, et al. Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 15:1471-1479, 1997

Horikoshi S, McCune BK, Gomez RA, et al. Water deprivation stimulates transforming growth factor- β 2 accumulation in the juxtaglomerular apparatus of mouse kidney. *J Clin Invest* 88:2117-2122, 1991

Horster M, Huber S, Tschöp J, et al. Epithelial nephrogenesis. *Eur J Physiol* 434:647-660, 1997

Jensen BL, and Skott O. Blockade of chloride channels by DIDS stimulates renin release and inhibits contraction of afferent arterioles. *Am J Physiol* 270:718-727, 1996

Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A. Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29(5):1148-1155, 1997

Jones CA, Sigmund CD, McGowan RA, et al. Expression of murine renin genes during fetal development. *Mol Endocrinol* 4:375-383, 1990

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Histologie. *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York*, 5. Auflage, S.329, 2002

Kazimierczak J. Development of the renal corpuscle and the juxtaglomerular apparatus: a light and electron microscopic study. *Munksgaard, Copenhagen*, 9 pp, 1971

Kazimierczak J. Topography and structure of vasculature in developing cortex of rat kidney. *Anat Embryol* 153:213-226, 1978

Kazmierczak J. A study of scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy of the glomerular capillaries in developing rat kidney. *Cell Tissue Res* 212:241-255, 1980

Keeton TK, Campbell WB. The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev* 31:81-227, 1981

King JA, Fray JCS. Hydrogen and potassium regulation of (pro)renin processing and secretion. *Am J Physiol* 267:1-12, 1994

Kitamoto Y, Tokunaga H, Tomita K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest* 99:2351-2357, 1997

Klinke R, Silbernagel S. Lehrbuch der Physiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York*, 2. Auflage, S.283-329, 1996

Kloth S, Aigner J, Schmidbauer A, et al. Interrelationship of renal vascular development and nephrogenesis. *Cell Tissue Res* 277(2):247-257, 1994

Kloth S, Suter-Crazzolara C. Modulation of renal blood vessel formation by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Microvasc Res* 59:190-194, 2000

Kon Y, Hashimoto Y, Kitagawa H, et al. An immunohistochemical study on the embryonic development of renin-containing cells in the mouse and pig. *Anat Histol Embryol* 18:14-26, 1989

Kon Y, Hashimoto Y, Kitagawa H, et al. Renin immunohistochemistry in the adrenal gland of the mouse fetus and neonate. *Anat Rec* 227:24-131, 1990

Kon Y, Alcorn D, Murakami K, et al. Immunohistochemical studies of renin-containing cells in the developing sheep kidney. *Anat Rec* 239:191-197, 1994

Kon Y. Comparative study of renin containing cells. Histological approaches. *J Vet Med Sci* 61:1075-1086, 1999

Kurtz A. Cellular control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmac* 113: 2-40, 1989

Langman J. Medizinische Embryologie. *Thieme Verlag, Stuttgart, 8. Auflage, Kapitel 11. Urogenitalsystem*, 1989

Latta H. Ultrastructure of the glomerulus and juxtaglomerular apparatus. In: Handbook of Physiology. *Renal Physiology. Washington, DC: Am Physiol Soc sect. 8, chapt. 1, p.1-29*, 1973

Leonhardt H, Tillman B, Töndury G, et al. Rauber/Kopsch Anatomie des Menschen, Lehrbuch und Atlas, Bd.II Innere Organe. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S.279*, 1987

Lewis OJ. The development of the blood vessels of the metanephros. *J Anat* 92:84-97, 1958

Lindahl P, Hellstrom M, Kalen M, et al. PDGF-Rbeta signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development* 125:3313-3322, 1998

Liu A, Ballermann BJ. TGF-beta type II receptor in rat renal vascular development: localization to juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 53:716-725, 1998

Makanya AN, Stauffer D, Ribatti D, et al. Microvascular growth, development, and remodeling in the embryonic avian kidney: the interplay between sprouting and intussusceptive angiogenic mechanisms. *Microsc Res Tech* 66:275-288, 2005

Marsh AC, Gibson KJ, Wu J, et al. Insulin-like growth factor I alters renal function and stimulates renin secretion in late gestation fetal sheep. *J Physiol* 530:253-262, 2001

Matsusaka T, Miyazaki Y, Ichikawa I. The renin angiotensin system and kidney development. *Annu Rev Physiol* 64:551-556, 2002

Mattot V, Moons L, Lupu F, et al. Loss of the VEGF(164) and VEGF(188) isoforms impairs postnatal glomerular angiogenesis and renal arteriogenesis in mice. *J Am Soc Nephrol* 13:1548-1560, 2002

McCright B, Gao X, Shen L, et al. Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development* 128:491-502, 2001

McGowan RA, Kane-Haas C, Gross KW. High resolution, low exposure times for insitu hybridization using ³⁵S-labeled SP6 probe. *N Engl Nuclear Products News* 4(5):1, 1980

Mercure C, Ramla D, Garcia R, et al. Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS Lett* 422(3):395-399, 1998

Minuth M, Hackenthal E, Poulsen K, et al. Renin immunocytochemistry of the differentiating juxtaglomerular apparatus. *Anat Embryol* 162:173-181, 1981

Moffet RB, McGowan RA, Gross KW. Modulation of kidney renin messenger RNA levels during experimentally induced hypertension. *Hypertension* 8:874-882, 1986

Moritz KM, Johnson K, Douglas-Denton R, et al. Maternal glucocorticoid treatment programs alterations in the renin-angiotensin system of the ovine fetal kidney. *Endocrinology* 143:4455-4463, 2002

Nafz B, Berthold H, Ehmke H, et al. Dissociation of blood pressure and blood flow. *Kidney Blood Press Res* 20(3):205-209, 1997

Nagata M., Tanimoto K, Fukamizu A, et al. Nephrogenesis and renovascular development in angiotensinogen deficient mice. *Lab Invest* 75:745-753, 1996

Nakamura KT, Page WV, Sato T, et al. Ontogeny of isoproterenol-stimulated renin secretion from sheep renal cortical slices. *Am J Physiol* 256:R1258-R1263, 1989

Neiss WF. Morphogenesis and histogenesis of the connecting tubule in the rat kidney. *Anat Embryol* 165:81-95, 1982

Nishimura H. Physiological evolution of the renin-angiotensin system. *Jpn Heart J* 19:806-822, 1978

Noden DM. Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am Rev Respir Dis* 140(4):1097-1103, 1989

Oliverio MI, Kim HS, Ito M, et al. Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15496-15501, 1998

Osathanondh V, Potter EL. Development of human kidney as shown by microdissection. V. Development of vascular pattern of glomerulus. *Arch Pathol* 82(5):403-411, 1966

Pan L, Black TA, Shi Q, et al. Critical roles of cyclic AMP responsive elements in regulation of renin gene transcription. *J Biol Chem* 271:22499-22505, 1996

Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol* 1;552(Pt 3):667-671, 2003

Peters JS, Clausmeyer S. Intracellular sorting of renin: Cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol* 34:1561-1568, 2002

Phat VN, Camilleri JP, Bariety J, et al. Immunohistochemical characterization of renin-containing cells in the human juxtaglomerular apparatus during embryonal and fetal development. *Lab Invest* 45:387-390, 1981

Pupilli C, Gomez RA, Tuttle JB et al. Co-localization of renin and nerve fibers in the developing rat kidney. *Clin Res* 38:69A, 1990

Pupilli C, Gomez RA, Tuttle JB, et al. Spatial association of renin-containing cells and nerve fibers in developing rat kidney. *Pediatr Nephrol* 5:690-695, 1991

Reddi V, Zaglul A, Pentz ES, et al. Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *J Am Soc Nephrol* 9:63-71, 1998

Reid IA, Chiu YJ. Nitric oxide and the control of renin secretion. *Fund Clin Pharmac* 9:309-323, 1995

Richoux AS, Amsaguine S, Grignor G et al. Earliest renin-containing cell differentiation during ontogenesis in the rat. An immunocytochemical study. *Histochemistry* 88:41-46, 1987

Risau W, Eklom P. Production of a heparin-binding angiogenesis factor by the embryonic kidney. *J Cell Biol* 103:1101-1107, 1986

Risau W, Sariola H, Zerwes H-G, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102:471-478, 1988

Robert B, St John PL, Abrahamson DR. Direct visualization of renal vascular morphogenesis in Flk1 heterozygous mutant mice. *Am J Physiol* 275:F164-F172, 1998

Robert B, Abrahamson DR. Control of glomerular capillary development by growth factor/receptor kinases. *Pediatr Nephrol* 16:294-301, 2001

Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, et al. Elements of paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* 34:1265-1274, 1999

Rohrwasser A, Ishigami T, Gociman B, et al. Renin and kallikrein in connecting tubule of mouse. *Kidney Int* 64:2155-2162, 2003

Romeis B. Romeis mikroskopische Technik. *Urban & Schwarzenberg, München, 17. Auflage, S.256-259, 1989*

Romero JC, Lahera V, Salom MG, et al. Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 2(9):1371-1387, 1992

Rüsse I, Sinowatz F. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. *Parey Buchverlag Berlin, 2. Auflage, S.304-311, 1998*

Sariola H, Eklom P, Lehtonen E, et al. Differentiation and vascularization of the metanephric kidney grafted on the chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 96(2):427-435, 1983

Sariola H. Mechanisms and regulation of the vascular growth during kidney differentiation. *Issues in Biomed* 14:69-80, 1991

Saxén L. Organogenesis of the kidney. In: Barlow PW, Green PB, Wyhi CC (eds) Developmental and cell biology series. *Cambridge Univ Press, Cambridge: 1-34*, 1987

Saxén L, Lehtonen E. Embryonic kidney in organ culture. *Differentiation 36:2-11*, 1987

Schnermann J, Briggs J. Role of the renin-angiotensin system in tubuloglomerular feedback. *Fed Proc 45:1426-1430*, 1986

Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol 274:R263-R279*, 1998

Schutz S, Le Moullec JM, Corvol P, et al. Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. *Am J Pathol 149:2067-2079*, 1996

Schweda F, Kurtz A. Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand 181(4):383-90*, 2004

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, et al. Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Renal Physiol 281:F345-F356*, 2001

Sequeira Lopez ML, Chernavsky DR, Nomasa T, et al. The embryo makes red blood cell progenitors in every tissue simultaneously with blood vessels morphogenesis. *Am J Physiol Integr Comp Physiol 284:R1126-R1137*, 2003

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, et al. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to renin phenotype when homeostasis is threatened. *Developmental Cell 6:719-728*, 2004

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature (Lond.) 376:62-66*, 1995

Spinelli F. Structure and development of the renal glomerulus as revealed by scanning electron microscopy. *Int Rev Cytol 39:345-378*, 1974

Takahashi N, Sequeira Lopez ML, et al. Ren1c homozygous null mice are hypotensive and polyuric, but heterozygotes are indistinguishable from wild-type. *J Am Soc Nephrol* 16:125-132, 2005

Takahashi T, Takahashi K, Gerety S, et al. Temporally compartmentalized expression of ephrin-B2 during renal glomerular development. *J Am Soc Nephrol* 12:2673-2682, 2001

Taugner C, Poulsen K, Hackenthal E, et al. Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney. *Histochemistry* 62(1):19-27, 1979

Taugner R, Buhle CP, Hackenthal E, et al. Morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Contr Nephrol* 43:76-101, 1984

Taugner R, Buhle CP, Nobiling R. Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res* 237:459-472, 1984

Taugner R, Kim SJ, Murakami K, et al. The fate of prorenin during granulopoiesis in epithelioid cells. Immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment. *Histochemistry* 86(3):249-253, 1987

Taugner R, Hackenthal E. The juxtaglomerular apparatus: structure and funktion. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*, 1989

Taylor GM, Peart WS, Porter KA, et al. Concentration and molecular forms of active and inactive renin in human fetal kidney, amniotic fluid and adrenal gland: evidence for renin-angiotensin system hyperactivity in 2nd trimester of pregnancy. *J Hypertens* 4:121-129, 1986

Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X, et al. Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 101:755-760, 1998

Tufro A, Norwood VF, Carey RM, et al. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol* 10:2125-2134, 1999

Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, et al. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol* 269:F110-F115, 1995

Tufro-McReddie A, Norwood VF, Aylor KW, et al. Oxygen regulates vascular endothelial growth factor-mediated vasculogenesis and tubulogenesis. *Dev Biol* 183:139-149, 1997

Vander AJ. Control of renin release. *Physiol Rev* 47:359-382, 1967

Wagner C, Jensen BL, Kramer BK, et al. Control of the renal renin system by local factors. *Kidney Int Suppl* 67:S78-S83, 1998

Wagner C, Kurtz A. Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7:437-441, 1998

Wagner C, Hinder M, Krämer BK, et al. Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension* 34:1101-1105, 1999

Woods LL, Rasch R. Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. *Am J Physiol* 275 (5 Pt 2):1593-1599, 1998

Ying L, Morris BJ, Sigmund CD. Transactivation of the human renin promoter by the cyclic AMP/protein kinase A pathway is mediated by both cAMP-responsive element binding protein-1 (CREB)-dependent and CREB-independent mechanisms in Calu-6 cells. *J Biol Chem* 272(4):2412-2420, 1997

Yosipiv IV, El-Dahr SS. Activation of angiotensin-generating systems in the developing kidney. *Hypertension* 27:281-286, 1996

7. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1:	Die drei Nierenanlagen im Überblick	7
Abb.1.2:	Schematische Darstellung der Bildung der Nephronanlage	8
Abb.1.3:	Schematische Darstellung der Entwicklung eines unreifen Nephrons	8
Abb.1.4:	Nephrogenese	9
Abb.1.5:	Schematische Darstellung des Blutgefäßsystems	12
Abb.1.6:	Schematische Darstellung der Signalkaskade des RAAS	14
Abb.1.7:	Schematische Darstellung eines Glomerulus	15
Abb.1.8:	Die Abstammung der JG-Zellen	19
Abb.2.1:	Bildstapelgenerierung	32
Abb.2.2:	Farbkanalauftrennung	32
Abb.2.3:	Alignierung	33
Abb.2.4:	Datensegmentierung	35
Abb.3.1:	Überblick: 3D-Rekonstruktionen	40
Abb.3.2:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am E13	41
Abb.3.3:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am E14	42
Abb.3.4:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am E15	43
Abb.3.5:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am E16	43
Abb.3.6:	3D-Rekonstruktion einer isolierten A. arcuata am E16	44
Abb.3.7:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am E17	45
Abb.3.8:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am E18	46
Abb.3.9:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am pp1	46
Abb.3.10:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am pp3	47
Abb.3.11:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am pp5	48
Abb.3.12:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am pp7	48
Abb.3.13:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße am pp10	49
Abb.3.14:	3D-Rekonstruktion der renalen arteriellen Blutgefäße im Adultzustand	50
Abb.3.15:	3D-Rekonstruktion einer isolierten A. arcuata am pp7	51
Abb.3.16:	3D-Rekonstruktion einer halben Mausniere am pp1 mit Nierenbecken und Ureter	51
Abb.3.17a:	3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters im arteriellen Gefäßsystem am E15	52
Abb.3.17b:	3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters in einer isolierten A. arcuata am E15	53
Abb.3.18:	3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters im arteriellen Gefäßsystem am frühen E16	54

Abb.3.19a: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters im arteriellen Gefäßsystem am späten E16	54
Abb.3.19b: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters in einer isolierten A. arcuata am späten E16	55
Abb.3.20: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters im arteriellen Gefäßsystem am frühen E17	56
Abb.3.21: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters am späten E17 a) im arteriellen Gefäßsystem b) in einer isolierten A. arcuata	57
Abb.3.22: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters am E18 a) im arteriellen Gefäßsystem b) in einer isolierten A. arcuata	58
Abb.3.23: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters am pp1 a) im arteriellen Gefäßsystem b) in einer isolierten A. arcuata	59
Abb.3.24a: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters im arteriellen Gefäßsystem am pp3	60
Abb.3.24b: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters in einer isolierten A. arcuata am pp3	61
Abb.3.25: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters am pp5 a) im arteriellen Gefäßsystem b) in einer isolierten A. arcuata	62
Abb.3.26: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters am pp7 a) im arteriellen Gefäßsystem b) in einer isolierten A. arcuata	63
Abb.3.27a: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters im arteriellen Gefäßsystem am pp10	64
Abb.3.27b: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters in einer isolierten A. arcuata am pp10	65
Abb.3.28: 3D-Rekonstruktion der Reninverteilung eines kortikalen Bereiches des arteriellen Gefäßsystems im Adultzustand	66
Abb.3.29: Immunfluoreszenzdoppelfärbung	68
Abb.3.30: Zeitkurve des Reninvolumens während der Entwicklung der Mausniere	69
Abb.3.31: Zeitkurve des renalen Renin mRNA Gehalts während der Entwicklung der Mausniere	70
Abb.3.32: Relative Renin mRNA-Abundanz in den verschiedenen Entwicklungsstadien	70
Abb.3.33: Zeitkurve des Nierenvolumens während der Entwicklung der Mausniere	71
Abb.3.34: Zeitkurve des Gefäßvolumens während der Entwicklung der Mausniere	71

Abkürzungsverzeichnis

Chemische und biologische Größen und Einheiten

bp	Basenpaare
I.E.	internationale Einheit
M	molar
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)
U	enzymatische Einheit (Unit)

Physikalische Größen und Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung (gravity)
g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
min	Minute(n)
s	Sekunde(n)
V	Volumen

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

k	kilo (1×10^3)
m	milli (1×10^{-3})
μ	micro (1×10^{-6})
n	nano (1×10^{-9})
p	pico (1×10^{-12})

Sonstige

3D	dreidimensional
%	Prozent
α SMA	α smooth muscle actin
A.	Arteria(e)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting Enzyme
ANGI	Angiotensin I
ANGII	Angiotensin II
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT2	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cy2	Carbocyanin
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (et alii)
EtOH	Ethanol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase
H ₂ O bidest.	zweifach entionisiertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HS	Pferdeserum (horse serum)
Ig	Immunglobulin
i.p.	intra peritoneal
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
JGE-Zelle	juxtaglomeruläre Epitheloidzelle
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
H ₂ KPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MD	Macula densa
mRNA	messenger ribonucleic acid
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO	di-Natriumhydrogenphosphat
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF- β	platelet derived growth factor-beta
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pp	postpartal
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl)-amino-methan
TRITC	Tetramethylrhodamin
ün	über Nacht
V.	Vena(e)
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die während der letzten Jahre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe des Themas und für die Bereitstellung der benötigten Arbeitsmittel und Geräte. Sein großes Interesse und sein Engagement trugen wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Für die fachliche Unterstützung, die kompetente Betreuung und für ihre fortwährende Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Charlotte Wagner bedanken. Danke auch für das Korrekturlesen dieses Manuskripts, und dass ich jederzeit mit Fragen und Problemen zu dir kommen konnte.

Anna M'Bangui, Melanie Gerl und Lisa Kurtz möchte ich für die Freundlichkeit und stets harmonische Zusammenarbeit im Histolabor danken, und dabei ganz besonders Björn Neubauer, der mir immer mit wertvollen Ideen und Anregungen zur Seite stand. Vor allem aber für seine geduldige und aufmunternde Art, die ansteckte und die auch bei schwierigen Situationen den Optimismus und die Freude am „Forschen“ bewahren half. Die gemeinsame Arbeit im Labor hat viel Spaß gemacht.

Dank auch an Prof. Dr. Richard Warth, der sein Mikroskop freundlicherweise zu jeder Zeit zur Verfügung stellte.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, für ihre Freundlichkeit und kollegiale Atmosphäre und die vielen kleinen Tipps und Tricks bei der Bewältigung des Laboralltags bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Gabriele und Andreas für ihre kontinuierliche Unterstützung, und dass sie mir bei allen Entscheidungen stets den Rücken frei gehalten haben. Vielen Dank schließlich auch an meine Schwester Sylvia und meine Freunde, die mir stets freundschaftlich zur Seite standen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 20.12.2007

Katharina Machura