

Die Bedeutung der cAMP-Signalkaskade für die Entwicklung des Reninsystems 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
Björn Neubauer
aus Donauwörth
im Jahr 2010

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von März 2006 bis November 2010 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am 10.11.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner

Prüfungskommission: Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Armin Kurtz

1. Prüfer: Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner

2. Prüfer: Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann

3. Prüfer: Herr Prof. Dr. Richard Warth

Inhalt

1. Zusammenfassung	- 5 -
2. Einleitung	- 9 -
2.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	- 10 -
2.2. Reninsynthese und -sekretion	- 12 -
2.3. Regulation von Reninsynthese und -sekretion	- 13 -
2.3.1. Systemische Faktoren der physiologischen Regulation	- 13 -
2.3.2. Humorale und lokal sezernierte Faktoren – weitere Hormone	- 17 -
2.4. Faktoren der zellulären Regulation	- 18 -
2.4.1. Der cAMP-Signalweg	- 18 -
2.4.2. Kalzium und Proteinkinase C	- 20 -
2.4.3. cGMP-Signalweg	- 21 -
2.5. Die juxtaglomeruläre Zelle	- 21 -
2.6. Das Reninsystem während der Nierenentwicklung	- 23 -
2.7. Zielsetzung	- 25 -
3. Material und Methoden	- 27 -
3.1. Material	- 28 -
3.1.1. Geräte	- 28 -
3.1.2. Verbrauchsmaterial	- 30 -
3.1.3. Chemikalien, Enzyme, Kits	- 30 -
3.1.4. Primer	- 32 -
3.1.5. Antikörper	- 33 -
3.1.6. Puffer und Lösungen	- 33 -
3.1.7. Software und Internetdienste	- 35 -
3.2. Methoden	- 36 -
3.2.1. Versuchstiere	- 36 -
3.2.2. Histologische Methoden	- 37 -
3.2.3. Dreidimensionale Rekonstruktion	- 39 -
3.2.4. Molekularbiologische Methoden	- 44 -

4. Ergebnisse	- 49 -
4.1. Die Entwicklung der Reninexpression in der normalen Mausniere	- 50 -
4.2. Untersuchungen im $G_{s\alpha}$ -Knockout	- 53 -
4.2.1. 3D-Modelle der Reninverteilung während der Nierenentwicklung	- 53 -
4.2.2. Statistische Untersuchung zur Architektur des Gefäßsystems	- 64 -
4.2.3. Histologische Betrachtung	- 64 -
4.3. Untersuchungen im β_1/β_2 -Adrenozeptor-Knockout	- 66 -
4.3.1. 3D-Modelle der Reninverteilung während der Nierenentwicklung	- 66 -
4.3.2. Entwicklung der Renin-mRNA Abundanz	- 75 -
4.3.3. Rekrutierung reninbildender Zellen in der adulten Niere	- 76 -
4.3.4. Immunhistochemischer Nachweis der Innervierung reninbildender Zellen	- 78 -
5. Diskussion	- 80 -
5.1. Die ontogenetische Reninexpression der Mausniere	- 81 -
5.2. Die Reninentwicklung in Abwesenheit rezeptoraktivierter cAMP-Produktion	- 82 -
5.3. Die Reninentwicklung im β_1/β_2 -Adrenozeptor-Knockout	- 87 -
6. Literaturverzeichnis	- 93 -
7. Anhang	- 111 -
7.1. Abbildungsverzeichnis	- 112 -
7.2. Abkürzungsverzeichnis	- 115 -
7.3. Veröffentlichungen	- 117 -
7.4. Danksagung	- 118 -

1. Zusammenfassung

Das Phänomen der unterschiedlichen Plastizität reninbildender Zellen zwischen unreifer und adulter Niere ist seit längerer Zeit in der Literatur bekannt. Allerdings ist völlig ungeklärt, welche Faktoren für dieses typische An- bzw. Abschalten der Reninexpression und für das phänomenologische Verschwinden reninbildender Zellen während der Nierenentwicklung und nach chronischer Stimulation verantwortlich sind. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst das dreidimensionale Expressionsmuster der Reninzellen sowie die Entwicklung und der Verlauf der arteriellen Blutgefäße in der normalen Mausnieren während der Nierenreifung beschrieben. Als Basis für die 3D-Rekonstruktionen dienten Serienfolgeschnitte von Mausnieren der Embryonalstage E13 bis zum postpartalen Tag 10 sowie der erwachsenen Niere, an denen die Expression von Renin und Glattmuskelaktin als Marker des arteriellen Gefäßsystems mittels indirekter Immunfluoreszenz dargestellt wurde. Renin war dabei erstmals am Embryonaltag E15 in der Media der arcuaten Hauptstämme nachweisbar, wobei nur vereinzelte Zellen positive Immunsignale zeigten. Ausgehend von dieser initialen Expression konnte einerseits eine retrograde Ausbreitung in die proximalen Bereiche der arcuaten Hauptstämme beobachtet werden, andererseits verlagert sich die Reninexpression über die vom arcuaten Hauptstamm abzweigenden arcuaten Seitenäste über die Interlobulararterien zu den afferenten Arteriolen. Dabei zeigte sich am E17 und E18 eine gleichzeitige Reninexpression in nahezu allen Gefäßabschnitten, die mit fortschreitender Entwicklung aus den größeren Gefäßen verschwindet, bis schließlich nur noch Zellen in klassischer juxtaglomerulärer Position Renin exprimieren. Das Gefäßwachstum folgte dabei keineswegs einem regelmäßigen Verzweigungsschema, sondern vielmehr einem unregelmäßigen, nicht genau vorhersagbaren Muster. Die systematische Erstellung dreidimensionaler Nierenmodelle ermöglicht es uns jedoch, Raumstruktur und Zeitschema der Reninexpression als Referenzsystem zu verwenden, das den Vergleich zwischen Wildtypmäusen und Mäusen mit genetischem Defekt für ein Regulatorgen der Reninexpression erlaubt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle des cAMP-Signalwegs als zentraler positiver Regulator des Reninsystems für das Anschalten der Reninexpression während der Nephrogenese untersucht. Dazu wurden Mäuse mit einem reninzellspezifischen Knockout des stimulatorischen Gs-Proteins charakterisiert. Entsprechend der

Vorgehensweise an der normalen Niere wurde das zeitlich-räumliche Renin-expressionsmuster in diesem Knockoutmodell betrachtet.

Dabei zeigte sich, dass eine gewebspezifische Deletion der rezeptorinduzierten cAMP-Produktion in den reninbildenden Zellen die Reninexpression in der Niere praktisch aufhebt. Dieses Ausbleiben der Reninexpression zieht sich durch sämtliche Entwicklungsstadien von den frühen metanephrogenen Stadien über die postpartale Phase bis hin zur adulten Niere. Die Befunde weisen darauf hin, dass die Reninverteilung entlang des präglomerulären Gefäßsystems mit ihrem zeitlich festgelegten Rahmen und ihrem spezifischen räumlichen Muster entscheidend von der Verfügbarkeit des Gs-Proteins und damit des Adenylatzyklasewegs abhängt. Folglich ist dies ein klarer Hinweis darauf, dass der cAMP-Signaltransduktionsweg nicht nur in der adulten Niere für die Regulation der Reninsynthese und -sekretion eine wichtige Rolle spielt, sondern auch für die Ontogenese der renalen Reninexpression entscheidend ist.

Desweiteren sollten Faktoren identifiziert werden, die über Gs-gekoppelte Rezeptoren wirken und an der Ausbreitung der reninbildenden Zellen beteiligt sind. Das sympathische Nervensystem stellt in der adulten Niere einen wichtigen Stimulator des Reninsystems dar, wobei unter physiologischen Bedingungen die renale Innervierung von reninbildenden Zellen über β_1 -Adrenozeptoren erfolgt. Um die Bedeutung des sympathischen Systems für die Rekrutierung von reninbildenden Zellen während der Ontogenese beurteilen zu können, wurden Mäuse mit doppeltem Knockout für den β_1 - und den β_2 -Rezeptor untersucht. Der Vorzug der β_1/β_2 -Doppelknockoutmaus gegenüber dem einfachen β_1 -Knockout ist darin zu sehen, dass eine mögliche kompensatorische Hochregulation des β_2 -Rezeptors ausgeschlossen ist.

Die Durchführung der Versuche erfolgte wie bereits für die $G_{s\alpha}$ -Knockoutmaus beschrieben. Als interessanter Befund zeigt sich, dass die Nieren der β_1/β_2 -Doppelknockoutmaus in allen untersuchten embryonalen und postpartalen Stadien ein prinzipiell normales Reninverteilungsmuster aufweisen. Allerdings mit dem wesentlichen Unterschied zum Wildtyp, dass Renin in den großen renalen Gefäßen β_1/β_2 -defizienter Mäuse während der Nierenentwicklung sowohl auf mRNA- als auch

auf Proteinebene je nach Stadium in teils erheblich geringerem Ausmaß nachgewiesen wurde.

Die Anwendung von chronischen RAAS-Stimulationsmanövern (Niedrigsalz/ACE-Inhibitor) in β_1/β_2 -Doppelknockoutmäusen sollte die Rolle des Sympathikus in diesem Zusammenhang konkretisieren. Dabei zeigte die 3D-Analyse, dass die Reninexpression zwar leicht erniedrigt ist, dennoch aber auf diesem Niveau stimulierbar bleibt und mit einer Erhöhung der Zahl reninbildender Zellen einhergeht. Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass das typische Reninverteilungsmuster während der Nephrogenese und in der erwachsenen Niere nicht über den β_1 -Adrenozeptor vermittelt wird. Die Rolle des Sympathikus bei der Regulation des Reninsystems scheint darin zu liegen, die Reninexpression als verstärkender Faktor zu beeinflussen, aber nicht als Induktor die Reninsynthese in diesen Zellen anzuschalten.

2. Einleitung

2.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

In allen landlebenden Säugetieren, einschließlich des Menschen, stellt die Verfügbarkeit von Wasser und Elektrolyten eine zentrale Frage des Überlebens dar. Zur Reaktion auf umweltbedingte Schwankungen benötigt die Niere ein exakt gesteuertes System zur Aufrechterhaltung der Salz-Wasser-Homöostase und damit des Blutdrucks. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) der Niere spielt in diesem Zusammenhang die zentrale Rolle. Die Wichtigkeit des RAAS zeigt sich darin, dass aus einer Fehlsteuerung stets schwere Störungen im Flüssigkeitshaushalt und der Blutdruckregulation resultieren. Das RAAS besteht aus der Aspartylprotease Renin, dem Glykoprotein Angiotensin und dem Steroidhormon Aldosteron (Abb. 1). Im Plasma zirkulierendes Renin spaltet von dem aus der Leber stammenden Oligopeptid Angiotensinogen das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (AngI) ab. AngI wird anschließend durch das im Lungenepithel produzierte Angiotensin Converting Enzyme (ACE) um zwei Aminosäuren zu Angiotensin II (AngII) verkürzt. Das Oktapeptid AngII (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) stellt die aktive und vasokonstriktorisch wirksame Komponente dar. Die Signalweiterleitung erfolgt über AngII-Rezeptoren (AT₁-, AT₂-Rezeptor), welche sich auf Zellen des kardiovaskulären, des endokrinen und des Endothelsystems befinden (Unger et al., 1996; Ardaillou, 1999; Grobecker, 1999). Der vasokonstriktorische Effekt von AngII wird in erster Linie vom AT₁-Rezeptor über eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes vermittelt. Der wesentlich schwächer exprimierte AT₂-Rezeptor ist in den Reproduktionsorganen, aber auch im Herzen (Wang et al., 1998) und den Nebennieren (Martineau et al., 1999) lokalisiert. Über Struktur und Funktion des AT₂-Rezeptors wird noch spekuliert. Neben dem direkten vasokonstriktorischen Effekt löst AngII über das zentrale Nervensystem ein Durstgefühl aus sowie in der Nebennierenrinde die Synthese und Ausschüttung des Hormons Aldosteron, welches in der Niere zu einer verstärkten Rückresorption von Kochsalz und Wasser führt. Der dadurch bedingte Anstieg des Blutvolumens führt stets zu einer Erhöhung des Blutdrucks (Hackenthal et al., 1990). Unter physiologischen Bedingungen hängt die Aktivität der RAAS-Kaskade von der Expressions- und Sekretionsrate des Renins in den juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen) der Niere ab. Angiotensinogen und ACE sind im gesunden Individuum im Überschuss vorhanden, so dass Renin den

limitierenden Faktor darstellt (Kurtz, 1989; Peters und Clausmeyer, 2002; Mercure et al., 1998). Die Reninsynthese und -Freisetzung sind auch die Ansatzpunkte eines negativen Feedbacks. So hemmen ein hoher systemischer Blutdruck, ein hoher renaler Perfusionsdruck oder ein erhöhter tubulärer Kochsalzspiegel sowohl die Synthese als auch die Sekretion (Hackenthal et al., 1990). Neben dem renalen RAAS konnten in verschiedenen Organen „lokale“ Renin-Angiotensin-Systeme nachgewiesen werden. Dazu zählen Augen, Herz, Gehirn oder die Fortpflanzungsorgane. Über deren Funktionen ist insgesamt noch wenig bekannt. Dem RAAS im Herzen wird aber eine regulierende Funktion der Myozytenkontraktilität zugeschrieben (Delbridge et al. 1995).

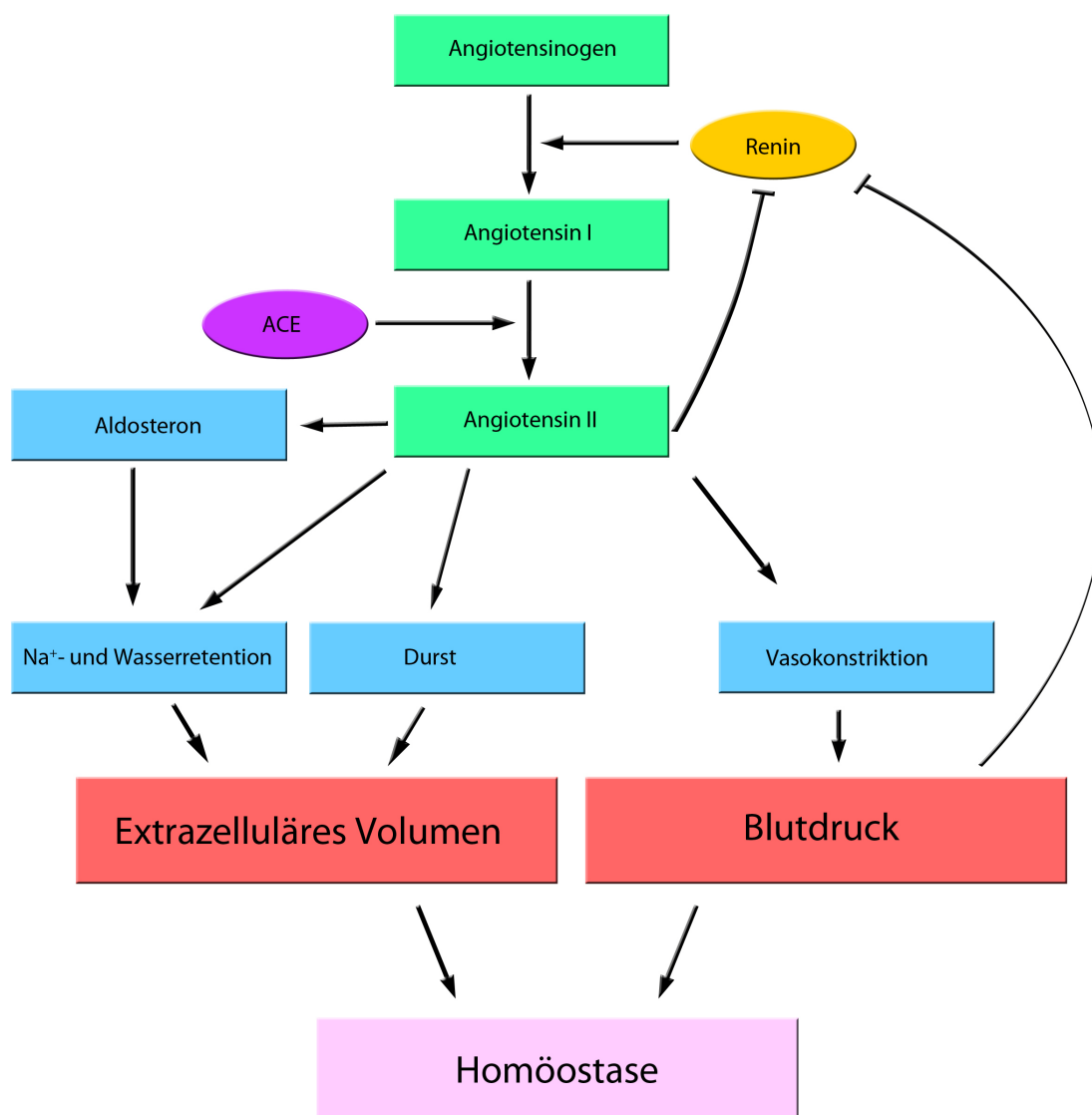


Abb. 1 - schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems

2.2. Reninsynthese und -sekretion

Das Reningen wurde bereits für einige Säugerspezies charakterisiert. Meist besteht es aus 8 Introns und 9 Exons (Maus, Ratte, Kaninchen). Der Mensch und das Schaf besitzen ein zehntes Exon mit unbekannter Funktion. Einige Labormausstämme besitzen statt dem „normalen“ Ren1^c (z.B. C57/Bl6) zwei Reningene: Ren1^d und Ren2 (z.B. 129Sv). Es wird davon ausgegangen, dass Ren2 aus einer Genduplikation des Ren1 hervorgegangen ist. Anders als Ren1^c und Ren1^d enthält das Ren2 Genprodukt keine Glykosylierungsstellen und kann damit nicht reguliert exocytiert, sondern nur konstitutiv sezerniert werden (Morris et al., 1992). Renin wird in den JG-Zellen zunächst als Präprorenin translatiert. Durch Abspaltung der Präsequenz, welche das Signalpeptid für die Translokation ins endoplasmatische Reticulum darstellt, entsteht das enzymatisch inaktive Prorenin (Hackenthal et al., 1990; Morris et al., 1992 und 1996; Tamura et al., 1995). Nach dem Transport durch den Golgi-Apparat wird Prorenin im weiteren Verlauf entweder posttranslational modifiziert oder konstitutiv sezerniert. Nicht sezerniertes Prorenin wird durch Mannose-6-Phosphatreste glykosyliert (Faust et al., 1987) und anschließend unter Beteiligung von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren in prälysosomale Kompartimente transportiert (Chao et al., 1990). Das Prorenin wird in lysosomenähnliche Vesikel, die Speichergranulen oder Protogranula verpackt (Taugner et al., 1987). Diese wandern dann zur Zellmembran und verschmelzen zu Granulen mit hoher Dichte, welche den JG-Zellen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen ihr typisches gekörntes Aussehen verleihen. Im Inneren der Vesikel erfolgt die Aktivierung des inaktiven Prorenins unter Abspaltung der 46 Aminosäuren langen N-terminalen Prosequenz (Taugner et al., 1987; Reudelhuber et al., 1995). Das fertig prozessierte aktive Renin wird über eine regulierte Exocytose der Speichervesikel, die im Einzelnen jedoch nicht verstanden ist, freigesetzt (Taugner et al., 1984; Skott, 1986). In vivo real time imaging Experimente mit markierten Granulen (Peti-Peterdi et al., 2004) haben gezeigt, dass die Sekretion schubweise, das heißt nach dem Alles-oder-Nichts Prinzip verläuft. Die Vesikel schwellen wie in anderen sekretorischen Zellen zunächst an und fusionieren dann entweder untereinander zu größeren Granulen oder mit der Zellmembran zur Exocytose (Skott und Taugner, 1987). Wie Kurtz und Schweda (2006) an der isoliert

perfundierten Mausnieren nachweisen konnten, zeigt der Sekretionsmechanismus eine Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität. So wird die Reninausschüttung durch Perfusion mit hyperosmolarer Lösung stimuliert. Widersprüchliche Ergebnisse von Skott (1988) an isolierten Glomeruli und Tubuli ergaben dagegen eine Hemmung der Reninsekretion durch Erhöhung der extrazellulären Osmolarität. Es wurde auch noch nicht abschließend geklärt, ob das Aktin-Myosin-Cytoskelett der JG-Zellen die Fusion der Vesikel mechanisch beeinflusst (Ogawa et al., 1995; Park et al., 1996).

2.3. Regulation von Reninsynthese und -sekretion

2.3.1. Systemische Faktoren der physiologischen Regulation

Um auf potentiell blutdruckverändernde Parameter wie Salz- oder Wasseraufnahme adäquat reagieren zu können, bedarf das renale RAAS einer präzisen Steuerung. Aus diesem Grund beeinflusst eine Fülle von Faktoren, darunter Hormone, Autacoide, die Salzaufnahme oder auch das Nervensystem sowohl die Expression als auch die Sekretion von Renin (Wagner und Kurtz, 1998).

2.3.1.1. Blutdruck

Innerhalb der Niere setzt sich der systemische Blutdruck als renaler Perfusionsdruck fort. So sinkt bei einem Blutdruckabfall auch der renale Perfusionsdruck, wodurch eine vermehrte Expression und Sekretion von Renin ausgelöst wird. Der gegenteilige Effekt kann bei einem Blutdruckanstieg beobachtet werden (Skinner et al., 1964; Nafz et al., 1997). Für die Vermittlung des Signals wird ein bislang nicht näher aufgeklärter Barorezeptor verantwortlich gemacht. Nachdem die druckabhängigen Effekte auf das RAAS auch in der isoliert perfundierten Niere weiter bestehen, scheint der Barorezeptor in der Niere selbst lokalisiert zu sein (Scholz et al., 1994). Es wird vermutet, dass durch einen luminalen Druckanstieg die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration der Gefäßmuskelzellen im juxtaglomerulären Apparat (JGA) ansteigt. Die folgende Kontraktion hat mutmaßlich eine Dehnung der JG-Zellmembran zur Folge, die zu einem veränderten Membranpotential führt (Carey et al., 1997; Bader und Ganten 2000). Verschiedene Gruppen bestätigten in isolierten JG-Zellen bereits eine

verminderte Reninsekretion während mechanischer Dehnung (Fray und Lush, 1984; Ryan et al., 2000).

2.3.1.2. Salzhaushalt und Macula Densa

Als weiterer etablierter Regulator des RAAS gilt der Salzhaushalt des Körpers. Vermehrte Salzaufnahme führt zu verminderter Reninsekretion und -expression und umgekehrt (Davis und Freeman, 1976). Die Vermittlung dieser kochsalzabhängigen Kontrolle des Renins wird seit langem der Macula Densa (MD) zugeschrieben (Goormaghtigh, 1937; Vander, 1967). MD-Zellen sind spezialisierte Endothelzellen des distalen Tubulus und befinden sich in enger Nachbarschaft zu den reninbildenden Zellen der afferenten Arteriole. Der in der apikalen Membran exprimierte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC2) bewirkt die von der luminalen Kochsalzkonzentration abhängige Na^+ und Cl^- -Aufnahme in die Zelle (Schlatter et al., 1989; Lapointe et al., 1990). Perfusionsexperimente an mikrodisszierten JGAs zeigen eine direkte Modulation der Reninsekretion in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration (Skott und Briggs, 1987). Nachdem der genaue Signalweg von den MD- zu den JG-Zellen noch nicht bekannt ist, wurden Mediatoren, wie die Produkte der NO-Synthase I und der Cyclooxygenase 2 (COX-2) diskutiert, die beide in MD-Zellen salzabhängig exprimiert werden (Mundel et al., 1992; Harris et al., 1994). Mittlerweile konnte aber gezeigt werden, dass NO lediglich eine modulierende und keine zentral regulierende Funktion besitzt (Castrop et al., 2004). Die Rolle des Prostaglandin E_2 wird ebenfalls in Frage gestellt, nachdem am 2 Kidney - 1Clip - Modell der Maus eine Kombination aus Salzdiät und Schleifendiuretika eine parallele Regulation von COX-2 und Reninexpression in beiden Nieren erbracht hat. Die Filtration an sich scheint also kein Induktor der Expression zu sein (Schweda et al., 2004). Betrachtet man die regulierende Funktion der Macula Densa, bleibt aber zu bedenken, dass eine vermehrte Kochsalzaufnahme auch eine erhöhte Wasserretention zur Folge hat und umgekehrt. Eine solche volumetrische Blutdruckänderung bewirkt wiederum ein Eingreifen des Barorezeptors. Die salzabhängige Regulation des renalen Reninsystems dürfte also auf ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen zurückzuführen sein. Neben der Funktion als Salzsensoren steuert die Macula Densa den Gefäßwiderstand von afferenten und

efferenten Arteriolen des Glomerulus über den tubuloglomerulären Feedback (TGF). Bei niedriger tubulärer Salzbelastung führt die Vasodilatation zu einer gesteigerten glomerulären Filtration (Castrop et al., 2004). Der TGF verhindert kapazitätsbedingte Natriurese und trägt so zur Natriumhomöostase im Körper bei.

2.3.1.3. Das Sympathische Nervensystem

Der Sympathikus als Teil des vegetativen Nervensystems besitzt eine ergotrope Funktion, das heißt er versetzt den Körper in Handlungsbereitschaft. Über den Neurotransmitter Noradrenalin erfolgen bei Sympathikusaktivierung vielfältige Reaktionen. Darunter eine Steigerung des Herzzeitvolumens, des Kohlenhydratstoffwechsels, des Muskeltonus und auch eine Steigerung des systemischen Blutdrucks. Seine Wirkung entfaltet der Sympathikus über α - und β -adrenerge G-Protein gekoppelte Rezeptoren. α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren finden sich im Endothel arterieller Gefäße. Der α_1 -Subtyp übt einen stark vasokonstriktorischen Effekt aus (Rohrer et al., 1998), während α_2 -Rezeptoren relaxierende Wirkung an die Gefäßmuskulzellen vermitteln (Egleme et al., 1984; Angus et al., 1986). β -Adrenozeptoren werden in die Subtypen β_1 , β_2 und β_3 eingeteilt. Der β_1 -Rezeptor wird in hoher Konzentration im Herz exprimiert und zeigt positiv inotrope und chronotrope Wirkung. Im Gefäßsystem vorkommende β_2 - und β_3 -Rezeptoren agieren vasodilatierend (Cohen et al., 1984; Molenaar et al., 1988; Rohrer et al., 1999). Ob die Aktivierung des Sympathikus in einem Gefäßabschnitt zur Vasodilatation oder Vasokonstriktion führt, hängt dabei von der genauen Verteilung der Subtypen ab. In der Niere findet sich sympathische Innervierung an den Glattmuskulzellen afferenter und efferenter Gefäße, an proximalen und distalen Tubuli, an der Henle-Schleife und auf JG-Zellen (Barajas et al., 1992; DiBona, 2000). Neben den vaskulären Effekten über α - und β_2 -Rezeptoren reguliert der Sympathikus den Blutdruck über β_1 vermittelte Aktivierung der Reninproduktion. Die Präsenz von β -adrenergen Rezeptoren auf JG-Zellen wurde vor schon längerer Zeit durch Ligandenbindungsstudien, in situ Hybridisierung und immunhistochemisch nachgewiesen (Hackenthal et al., 1990; Boivin et al., 2001). Bei Bindung von Adrenalin oder Noradrenalin an β_1 -Adrenozeptoren erfolgt über das stimulatorische G-Protein G_s die Aktivierung von Adenylatzyklen und damit ein

intrazellulärer Anstieg von cAMP. Dieser führt wiederum zu verstärkter Renin-expression und -sekretion (Holmer et al., 1997; Kurtz, 1997). Allerdings wurde gezeigt, dass nur reninhaltige Zellen des JGA über den Sympathikotonus zur Sekretion angeregt werden können. Rekrutierte, vom JGA räumlich getrennte reninpositive Zellen verfügen nicht mehr über diese Eigenschaft (Wagner et al., 1999). Die Gabe von β -Rezeptorantagonisten oder renale Denervierung führen im Versuch zu erheblich verringerter Expression und Sekretion von Renin (Keeton et al., 1980; Holmer et al., 1994; Golin et al., 2001; Castrop et al., 2004). Ebenso erbringt die Gabe von Rezeptoragonisten wie Isobuterenol einen dosisabhängigen Anstieg von Renin-expression und -sekretion (Vandongen et al., 1973, Schricker et al., 1997; Moosavi et al., 2003). Die Charakterisierung der adulten β_1/β_2 -Adrenozeptor-Knockoutmaus (β_1/β_2 Adr-/-) zeigt eine um 85% verringerte basale Plasmenreninkonzentration (PRC). Das Reninsystem dieser Tiere reagiert zwar noch auf akute und chronische Manipulation wie Hoch- oder Niedrigsalzdiät, Schleifendiuretika, ACE-Hemmer oder AT_1 -Antagonisten, die absolute Höhe dieser Schwankungen ist aber deutlich vermindert (Kim et al., 2007).

2.3.1.4. Angiotensin II

Das im Körper zirkulierende AngII übt neben dem bereits erwähnten vasokonstriktorisches Effekt auch eine inhibierende Funktion auf die Sekretion und Synthese von Renin im Sinne einer negativen Rückkopplung aus (Hackenthal et al., 1990). Es wurde gezeigt, dass die pharmakologische Inhibition der AT_1 -Rezeptoren oder die Gabe von ACE-Hemmern zu einem starken Anstieg der Produktionsrate von Renin führt (Castrop et al., 2003; Höcherl et al., 2001). Die AT_1 -Knockoutmaus zeigt außerdem eine deutliche Rekrutierung reninbildender Zellen (Oliverio et al., 1998). Zunächst wurden die AT_1 -Rezeptoren der JG-Zellen (Gase et al., 1994) mit der negativen AngII-Wirkung auf die Reninproduktion in Verbindung gebracht (Naftilan und Oparil, 1978). Studien an chimären Mäusen und Studien zur Kreuztransplantation von Nieren deuten aber mittlerweile darauf hin, dass die renalen AT_1 -Rezeptoren zwar einen erheblichen Einfluss auf den systemischen Blutdruck haben und damit den

Barorezeptor-Mechanismus bedienen, aber keine direkte „intrazelluläre“ Kontrolle über die Reninproduktion besitzen (Mizoguchi et al., 1983; Crowley et al., 2005).

2.3.1.5. Aldosteron

Die vierte Komponente des RAAS, das Mineralocorticoid Aldosteron stammt aus der Zona Glomerulosa der Nebenniere. Es erhöht die Na^+ - und damit die Wasserretention des distalen Nephrons. Die Na^+ -Konzentration und die damit verbundene blutdrucksteigernde Wirkung üben wiederum einen inhibierenden Einfluss auf die Reninexpression aus (Hackenthal, 1990; Kurtz und Wagner, 1999). Die Aldosteronsekretion wird primär durch AngII und Durst stimuliert. Die Aldosteronbehandlung isolierter JG-Zellen führt zu einer erhöhten Renin-mRNA-Stabilität (Klar et al., 2004). Andererseits zeigen Mineralocorticoidrezeptor und Aldosteronsynthase defiziente Mäuse trotz des unterbrochenen Aldosteron-Signalwegs stark erhöhte Reninwerte. Der Grund dafür dürfte in der Kompensation der Hypovolämie durch die verminderte Retentionsfähigkeit und dem damit chronisch niedrigen Na^+ -Spiegel dieser Tiere zu finden sein (Berger et al., 2000; Makhanova et al., 2006). Aldosteron übt also auf die Reninproduktion einerseits einen positiven Effekt über die Renin-mRNA, und andererseits einen negativen systemischen Effekt über die Salzretention, bzw. den Blutdruck aus.

2.3.2. Humorale und lokal sezernierte Faktoren – weitere Hormone

Zur Regulation des RAAS tragen neben den bereits genannten systemischen Mechanismen auch humorale und lokal sezernierte Faktoren bei. Unstrittig inhibierend wirken der Tumor Necrosis Factor $\text{TNF}\alpha$, Interleukin-1 und -6, $\text{TGF-}\beta\text{II}$, der platelet activating factor (PAF), das atriale natriuretische Peptid (ANP), Adenosin, Endothelin oder auch das Hormon Vasopressin (Petrovic et al., 1997; Keeton und Campell, 1980; Pfeilschifter et al., 1985; Kurtz et al., 1988; Scholz et al., 1995; Pietri et al., 2002; Todorov et al., 2002; Kageyama 1990; Kurtz et al., 1986). Als stimulierende Faktoren gelten Adrenomedullin, Bradykinin, das Calcitonin Gene related Peptide (CGRP), NO, die Prostaglandine PGE_2 und PGI_2 , aber auch Histamin sowie Thyroxin und

Triiodthyronin (Keeton und Campell, 1980; Kurtz et al., 1988; Jensen et al., 1997; Chen et al., 2007; Schwertschlag und Hackenthal, 1982).

2.4. Faktoren der zellulären Regulation

Betrachtet man die Steuerung der Reninproduktion auf zellulärer Ebene, so gelten hier die Signalwege der klassischen second messenger cAMP, Kalzium und cGMP als die wesentlichen regulierenden Elemente bei der Expression und Sekretion von Renin.

2.4.1. Der cAMP-Signalweg

Hinsichtlich der zellulären Signalwege, welche die Reninexpression steuern, ist die cAMP-Signalkaskade am besten etabliert (Klar et al., 2002; Pan et al., 2001). Die Aktivierung dieses Signalwegs erfolgt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie die adrenergen β -Rezeptoren, oder Faktoren wie Dopamin, CGRP, PGE_2 und PGI_2 (Kurtz et al., 1989). Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgt dabei die Aktivierung des heterotrimeren stimulierenden G-Proteins G_s . Dieses dissoziiert in einen Komplex aus β - und γ -Untereinheit sowie der katalytisch aktiven α -Untereinheit, die wiederum verschiedene Adenylatzyklen aktiviert und damit zu einem steigenden cAMP-Spiegel in der Zelle führt. Die intrazelluläre Konzentration an cAMP unterliegt einem Wechselspiel aus Produktion durch Adenylatzyklen und der Degradation durch Phosphodiesterasen (Chiu et al., 1996 und 1999). Die Wirkung von cAMP auf die Renintranskription erfolgt unter Beteiligung der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA) (Lalli et al., 1994). Die aktivierten katalytischen Untereinheiten der PKA bewegen sich in den Zellkern und phosphorylieren den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element binding protein). Dieser ist konstitutiv an CRE-Elemente (CRE; cAMP response element) des Renin-Promotors gebunden und führt bei Phosphorylierung zu einer Transaktivierung der Expression (Klar et al., 2002; Pan et al., 2001).

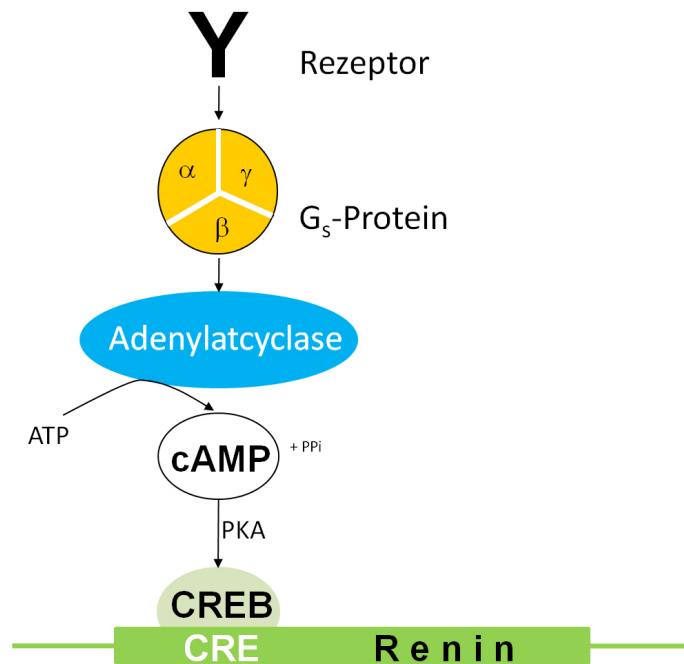


Abb. 2 - Die rezeptorvermittelte Aktivierung der Reninexpression

Die zentrale Rolle der cAMP-Signalkaskade für die Reninregulation im adulten Individuum wurde durch die Generation einer reninzellspezifischen $G_{s\alpha}$ -Knockoutmaus (RC- $G_{s\alpha}/-$) unterstrichen. In diesen Tieren wurde die α -Untereinheit des Gs-Proteins unter der Kontrolle des renalen Reninpromotors, also nur in reninbildenden Zellen deletiert (Abb. 3). Die Reninexpression und Plasmareninkonzentration dieser Mäuse sind dramatisch verringert (Chen et al., 2007). Als weiterer regulierender Faktor wird derzeit $LXR\alpha$ diskutiert. Die Bindung dieses Kernfaktors an das CNRE (cAMP and negative response element) des Reninpromotors führt zu gesteigerter Renintranskription und $LXR\alpha$ -Knockoutmäuse zeigen sich unempfindlich gegenüber adrenerger und damit cAMP-gesteuerter Stimulation (Horiuchi et al., 1993; Tamura et al., 2004). Neuere Studien (Tanimoto et al., 2008) stellen die Bedeutung von $LXR\alpha$ allerdings in Frage.

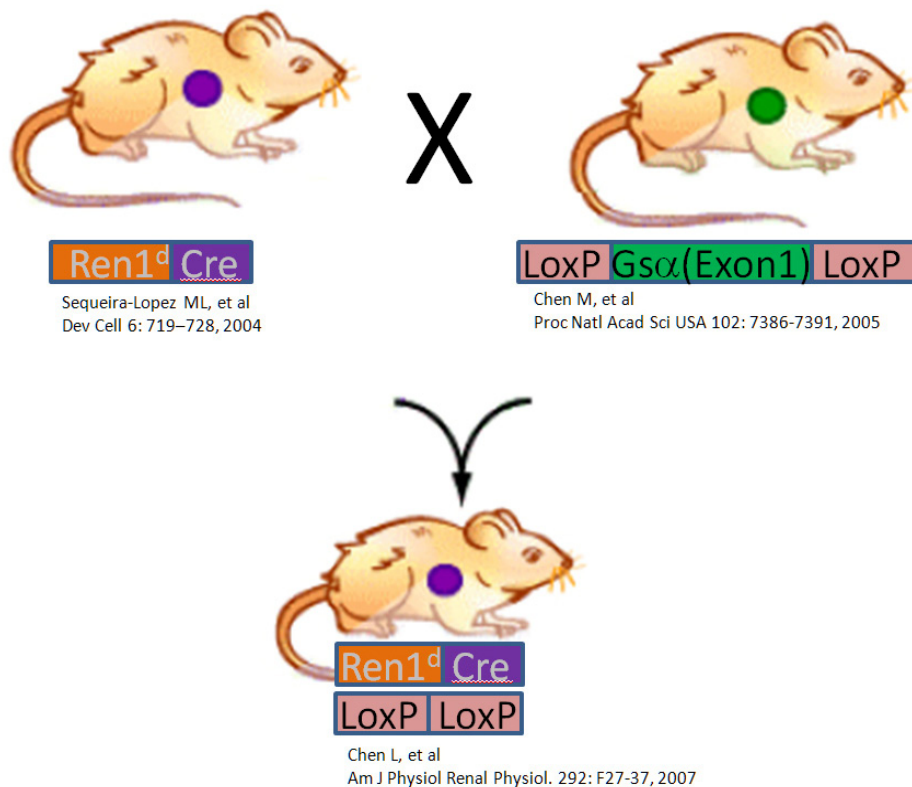


Abb. 3 - Die gewebsspezifische $G_{s\alpha}$ -Knockoutmaus wurde durch Kreuzung einer Maus, in der ein $Ren1^d$ -Allel durch die Cre-Recombinase ersetzt ist, mit einer Maus, deren Exon 1 von $G_{s\alpha}$ von loxP-Sequenzen flankiert ist, generiert. Dieses Exon wird in den Nachkommen in allen Zellen mit aktivem Reninpromotor durch die Cre-Recombinase ausgeschnitten.

2.4.2. Kalzium und Proteinkinase C

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) wirken in sezernierenden Geweben üblicherweise stimulierend auf die Sekretion (Cohen et al., 1997). In JG-Zellen jedoch agiert Ca^{2+} als Inhibitor von Reninsekretion und -expression. Man spricht daher auch vom Kalzium-Paradoxon der Renin-freisetzung. Auf welche Weise die Hemmung zustande kommt oder was die Ziele der PKC, sind ist weitgehend unklar. Es ist aber bekannt, dass AngII und Endothelin zu einer gesteigerten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und/oder einer Aktivierung der PKC führen (Hackenthal et al., 1990; Kurtz et al., 1986; Müller et al., 2002; Ritthaler et al., 1995). Es konnte auch gezeigt werden, dass eine verringerte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration die Reninsekretion isolierter JG-Zellen anregt (Moe et al., 1991). Als mögliche Beteiligte an der Ca^{2+} -abhängigen Suppression werden derzeit, die durch Kalzium hemmbaren Adenylatzyklase-Isoformen AC5 und AC6 diskutiert. Beide

konnten auf RNA-Ebene in JG-Zellen nachgewiesen werden (Grünberger et al., 2006; Ortiz-Capisano et al., 2007). In primären JG-Zellkulturen wurde demonstriert, dass der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg nach Gabe von AngII oder Endothelin eine Senkung des cAMP-Levels und der Reninsekretion zur Folge hat. Diese Querverbindung zwischen Ca^{2+} und dem cAMP-Signalweg bietet zwar eine mögliche Erklärung für das Kalzium-Paradoxon, es bleibt aber Klärungsbedarf hinsichtlich der Funktion von AC5 und AC6 in vivo (Grünberger et al., 2006).

2.4.3. cGMP-Signalweg

Die Beteiligung von cGMP an der Regulation des Reninsystems ist unbestritten (Reid und Chiu, 1995; Romero et al., 1992; Kurtz, 1989), wird aber kontrovers diskutiert. Je nach Versuchsansatz führt die Modulation der cGMP-Konzentration zu einer Aktivierung oder Hemmung der Reninfreisetzung. cGMP wird in den JG-Zellen von NO- oder ANP-aktivierbaren Guanylatzyklasen gebildet. Ein Effektor stellt die durch cGMP hemmbare Phosphodiesterase-3 (PDE-3) dar. PDE-3 Inhibition führt über eine verzögerte cAMP-Hydrolyse zu einem erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle und damit zu verstärkter Aktivität des Reninsystems (Beavo, 1995; Reid und Chiu, 1996; Friis et al., 2002). Andererseits aktiviert cGMP in JG-Zellen die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII). Diese findet sich assoziiert mit den Reninspeichergranulen und übt einen inhibitorischen Effekt auf die Reninfreisetzung aus (Kurtz, 1998). Die Ziele der cGKII in diesem Zusammenhang sind bis dato nicht bekannt. Der konträre Effekt von cGMP könnte auf dessen intrazellulärer Konzentration beruhen. Niedrige cGMP-Spiegel führen zunächst zur Hemmung von PDE-3 und einer RAAS-Aktivierung, während eine hohe Konzentration den negativen cGKII-Effekt begünstigt (Kurtz und Wagner, 1998).

2.5. Die juxtaglomeruläre Zelle

Das im Blut zirkulierende Renin wird in erster Linie in den granulierten juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) der Niere synthetisiert (Latta, 1987; Barajas und Salido, 1986; Deschepper et al., 1986; McGowan et al., 1980; Taugner et al., 1979).

Verringerung reninhaltiger Zellen (Taugner und Hackenthal, 1989; Kurtz, 1989; Sequeira Lopez et al., 2001). Wegen der vorhandenen Myofilamente und ihrer Lokalisation wurde lange Zeit angenommen, dass sich JG-Zellen durch eine reversible metaplastische Transformation aus Gefäßmuskelzellen entwickeln (Taugner et al., 1984; Barajas, 1979). Derzeit werden aber verschiedene Hypothesen diskutiert. So könnten sich reninbildende Zellen als eigenständige Entität entwickeln, welche erstmals im metanephrogenen Blastem auftreten und sich dann, mit dem Gefäßbaum assembliert, hin zur finalen Position weiterverbreiten (Sequeira Lopez et al., 2001; Reddi, 1998). Auch die Entstehung der Zellen direkt in der Gefäßwand ohne nierenspezifischen Induktor ist denkbar, nachdem in der Embryonalentwicklung aber auch später noch einzelne Reninzellen in der Media extrarenaler Arterien gefunden wurden (Richoux et al., 1987; Fuchs et al., 2002). Nach einer weiteren Hypothese stellen die reninbildenden Zellen den Vorläufer verschiedener nicht renin-exprimierender Zelltypen dar. Sequeira Lopez (2001) berichtet, dass glatte Gefäßmuskelzellen, Epithelzellen, Mesangialzellen oder auch extrarenale Zellen in der Lage sind die Reninsynthese je nach Stimulationszustand des RAAS an- oder abzuschalten (Abb. 5). Welche Faktoren die Transformation der Zellen steuern ist dabei nicht klar.

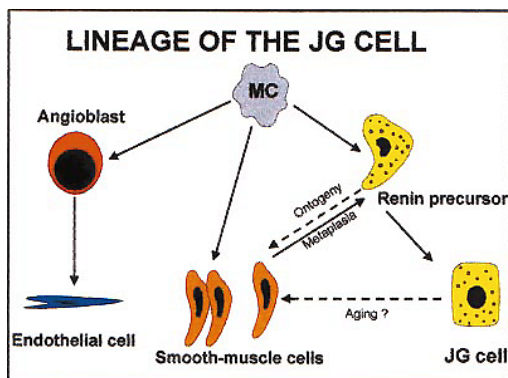


Abb. 5 - Ursprung der JG-Zellen: aus mesenchymalen Zellen (MC) gehen Glattmuskelzellen und Reninvorläuferzellen hervor, die entweder zu JG-Zellen oder selbst zu Muskelzellen reifen. Daneben entstehen aus den MC Angioblasten und Endothelzellen (Abbildung aus Sequeira Lopez et al., 2001).

2.6. Das Reninsystem während der Nierenentwicklung

Während der Nephrogenese zeigt das Reninsystem eine hohe Aktivität (Gomez und Norwood, 1995) mit starker Expression der einzelnen Komponenten (Hilgers et al., 1997). Die Messung des relativen Renin mRNA-Gehalts an embryonalen und

neonatalen Ratten zeigt bis zu zwanzigfach höhere Werte als im adulten Tier (Gomez, 1998; Guron und Friberg, 2000). Die Reningenexpression folgt dabei einer glockenförmigen Kurve. Sie startet in Mäusen und Ratten etwa am 15. Embryonaltag in Assoziation mit den wachsenden renalen Gefäßen und steigt steil an. Das Maximum liegt um den Zeitpunkt der Geburt, danach fällt die Expression kontinuierlich bis zum adulten Wert ab. Ein ähnlicher Verlauf wurde unter anderen auch an Kaninchen oder Schafen beobachtet (Minuth et al., 1981; Drukker et al., 1983; Carbone et al., 1993; Sauter et al., 2008). Während der Entwicklung ändert sich nicht nur das zeitliche, sondern auch das räumliche Muster der Reninproduktion. So ist die als „klassisch“ bezeichnete juxtaglomeruläre Position der reninbildenden Zellen am vaskulären Pol der Glomeruli nur für die vollständig entwickelte Niere typisch (Taugner et al., 1979; Barajas et al., 1986). Zunächst findet man reninhaltige Zellen in der Media der großen renalen Gefäße. Mit zunehmendem Reifegrad der Niere wird die Reninproduktion dort eingestellt und verlagert sich in die distalen Bereiche des wachsenden Gefäßbaums. Dieses An- und Abschalten und damit die scheinbare Verschiebung der Reninexpression während der Nierenentwicklung kann bei diversen Säugerspezies beobachtet werden, darunter Hamster, Kaninchen, Schaf, Schwein und der Mensch (Dodge, 1993; Drukker et al., 1983; Kon 1994; Carbone et al., 1993; Kon et al., 1989; Egerer et al., 1984; Phat et al., 1981; Celio et al., 1985; Graham, 1992). Trotz intensiver Studien an Maus- und Rattennieren (Minuth et al., 1981; Kon, 1989; Gomez et al., 1986, 1988, 1989; Jones et al., 1990) konnten der Mechanismus und die Faktoren, die diesen Shift bewirken, bislang nicht aufgeklärt werden. Ebenso unbekannt ist die mögliche physiologische Wirkung dieses Phänomens. Während der Nephrogenese verschiedener Spezies wurde die prärenale und extrarenale Expression von Renin beschrieben. So wurden bereits im Mesonephros von Schwein, Maus, Ratte und Mensch (Egerer et al., 1984; Kon, 1989, Richoux et al., 1987; Celio et al., 1985) Reninzellen nachgewiesen. Weiterhin wurde Reninproduktion in Nebennieren und Hoden der Maus gezeigt (Kon, 1989) sowie in proximalen Tubulusabschnitten des Schweineembryos (Egerer et al., 1984).

2.7. Zielsetzung

Die Reningenexpression während der Nephrogenese unterliegt bei allen Säugerspezies einer hohen Plastizität. Sie beginnt zunächst in der Wand großer renaler Gefäße, verschiebt sich mit fortschreitender Reifung des Organs in Richtung des für die adulte Niere typischen Expressionsortes, dem vaskulären Pol der Glomeruli. Bislang ist nicht geklärt, welche Mechanismen die Rekrutierung von reninbildenden Zellen in der sich entwickelnden Niere steuern. Denkbar sind die Regulatoren der adulten Reningenexpression, aber auch ontogenetische Differenzierungsfaktoren.

A. Da die bisherigen Informationen über die entwicklungsabhängige Reninexpression auf exemplarischen Darstellungen bestimmter Entwicklungsstadien beruht, soll zunächst mit Hilfe von 3-D Rekonstruktionsmethoden die zeitlich-räumliche Entwicklung der renalen Reninexpression vom Embryonal- zum Adultstadium nachvollzogen werden, um eine bessere Vorstellung über die Abläufe zu erhalten.

B. Als maßgeblicher molekularer Stimulator der Reninexpression der adulten Niere ist der cAMP-Signalweg etabliert. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob die cAMP-Signalkaskade für das Anschalten der Reninexpression während der Nierenentwicklung relevant ist. Als Modell hierfür soll eine Maus verwendet werden, bei der die α -Untereinheit des Adenylatzyklase-stimulierenden G-Proteins (Gs) gewebsspezifisch deletiert ist. Dazu soll mit Hilfe des Cre/loxP-Systems das Gs_{α} -Protein in den Zellen deletiert werden, in welchen der Reninpromotor aktiv ist. In diesen Mäusen soll dann das räumliche und zeitliche Entwicklungsexpressionsmuster von Renin charakterisiert und mit dem von Wildtypmäusen verglichen werden.

C. Dieses Mausmodell könnte weiterhin Aufschluss darüber liefern, ob die ontogenetische Verteilung reninbildender Zellen von Faktoren abhängt, die wesentlich über die Aktivierung der Adenylatzyklase wirken. Sollte sich bestätigen, dass die rezeptorvermittelte Adenylatzyklaseaktivierung an der Entwicklung der Reninexpression beteiligt ist, soll untersucht werden, welcher Rezeptor auf Reninzellen hauptsächlich als Induktor des cAMP-Signalweges in Betracht kommen könnte. Da das sympathische Nervensystem in der adulten Niere einen etablierten systemischen Stimulator des Reninsystems darstellt, und die renale Innervierung über β -Adreno-

zeptoren direkt an der reninbildenden Zelle wirkt, soll die Entwicklung der Renin-expression zunächst in β_1/β_2 -Adrenozeptor defizienten Mäusen analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material**3.1.1. Geräte**

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets	
TRITC-Filter: Anregung 533-558nm Emission 570-640nm	Filter set 43, Zeiss, Jena
Cy2-Filter: Anregung 450-490nm Emission 500-550nm	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
Cy5-Filter: Anregung 625-655nm Emission 665-715nm	Filter set 50, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
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
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore, Schwalbach
PCR-Geräte	Thermocycler, OmniGene, MWG, Ebersberg Primus 96, Peqlab, Erlangen Lightcycler LC480, Roche, Mannheim

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
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
Vakuumentrifuge	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

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Niedrigsalzfutter 0,02% NaCl	Ssniff, Soest
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 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

3.1.3. Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Frankfurt am Main
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt

Produkt	Hersteller
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/ μ l	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x bzw. Colorless, 5x	Promega, Mannheim
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/ μ l	Invitrogen, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nuclease freies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0,5 μ g/ μ l	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

Produkt	Hersteller
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Sevofluran SEVOrane	Abbott, Wiesbaden
SYBR [®] Green PCR Kit	Roche, Mannheim
TRIzol [®] -Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.4. Primer

Die Primer für quantitative PCR (qPCR) und Genotypisierung (GT) 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.

	Name	Sequenz	Produkt
qPCR	GAPDH-S	5'-ATG CCA TCA CTG CCA CCC AGA AG-3'	
qPCR	GAPDH_AS	5'-ACT TGG CAG GTT TCT CCA GGC GG-3'	
qPCR	Renin-S	5'-ATG AAG GGG GTG TCT GTG GGG TC-3'	
qPCR	Renin-AS	5'-ATG CGG GGA GGG TGG GCA CCT G-3'	
GT	Gsα-S (P1)	5'-GAG AGC GAG AGG AAG ACA GC-3'	WT 327bp
GT	Gsα-AS (P2)	5'-TCG GGC CTC TGG CGG AGC TT-3'	Flox 391bp
GT	Gsα-AS (P3)	5'-AGC CCT ACT CTG TCG CAG TC-3'	
GT	Cre-S	5'-ATG CTT CTG TCC GTT TGC CG-3'	271bp
GT	Cre-AS	5'-CCT GTT TTG CAC GTT CAC CG-3'	585bp
GT	Ren1^d-S	5'-GAA GGA GAG AGC AAA AGG TAA GAG-3'	
GT	Ren1^d-AS	5'-GTA GTA GAA GGG GGA GTT GTG-3'	

	Name	Sequenz	Produkt
GT	Adrb1-WT-S	5'-GTA ACG TGC TGG TGA TCG TG-3'	183bp
GT	Adrb1-WT-AS	5'-AAG TCC AGA GCT CGC AGA AG-3'	
GT	Adrb1-MUT-S	5'-CTC GGC TAC GGA GGA GAA G-3'	350
GT	Adrb1-NEO-AS	5'-CAC GAG ACT AGT GAG ACG TG-3'	
GT	Adrb2-S	5'-ACC AAG AAT AAG GCC CGA GT-3'	WT 225bp
GT	Adrb2-AS	5'-CCG GGA ATA GAC AAA GAC CA-3'	
GT	Adrb2-NEO-AS	5'-CAC GAG ACT AGT GAG ACG TG-3'	KO 410bp

3.1.5. Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
chicken anti- Renin -IgG	polyklonal	Davids Biotech, Regensburg	1:200
mouse anti- Glattmuskelaktin -IgG	polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg	1:50
rabbit anti- Tyrosinhydroxylase -IgG	polyklonal	Millipore, Schwalbach	1:100

Sekundärantikörper	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
donkey anti-chicken -IgY	Rhodamin-(TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-chicken -IgY	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-mouse -IgG	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-mouse -IgG	Cy5	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-rabbit -IgG	Rhodamin-(TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400

3.1.6. 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	3%

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%

Molekularbiologie**Agarosegel**

TBE	
Agarose	2%

NaOH für gDNA-Extraktion

NaOH	25 mM
------	-------

Tris HCl für gDNA-Extraktion

Tris HCl	1 M, pH 8
----------	-----------

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

DEPC in H ₂ O	1/1000 V
schütteln, üN geöffnet untem Abzug stehen lassen	dann autoklavieren

3.1.7. Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office 2007* geschrieben. Für die Bearbeitung der Serienbilder wurde *Adobe Photoshop 10* und *ImageJ* (Wayne Rasband. NIH. USA) verwendet. Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 5* erstellt. Bei der Literaturrecherche half *PubMed* von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Die Mikroskopie erfolgte mit *AxioVision Rel.4.5.* von Zeiss und die 3D-Rekonstruktion mit *Amira 4.1* visualization software (Visage Imaging., USA).

3.2. Methoden

3.2.1. Versuchstiere

Für die durchgeführte Untersuchung der Entwicklungsstadien wurden unbehandelte, terminlich verpaarte Mäuse verschiedener Genotypen verwendet. Um das entsprechende Stadium genau festlegen zu können, wurden die Mäuse exakt für 24h zusammengesetzt und das Auseinandersetzen des Zuchtpaares als Embryonaltag 1 gewertet.

Nach Betäubung mit Sevofluran und Genickbruch wurden die Nieren von Föten am 16. und 18. Embryonaltag, von Neugeborenen am 1. Tag nach der Geburt und von adulten Tieren ca. 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 Schockfrosten in N₂, bis zur RNA-Isolierung bei -80°C aufbewahrt wurde.

Alle Versuchstiere wurden im Einklang mit dem ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research" behandelt. Es wurde stets auf für Nager optimale Haltungparameter geachtet (Temperatur 23°C ± 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%, Hell-Dunkelintervall 12h, Futter und Wasser ad libitum).

Folgende Tierstämme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tierstamm	genetischer Hintergrund	Herkunft
C57/Bl6	C57/Bl6	Charles River, Sulzfeld
Ren1 ^d /+ x Cre x Gs _α (E1 fl/fl)	129SvJ x C57/Bl6	freundlich überlassen von J. Schnermann (NIH, USA)
Ren1 ^d /+ x Gs _α (E1 fl/fl)	129SvJ x C57/Bl6	
β ₁ /β ₂ Adr-/-	FVB x C57/Bl6 x 129SvJ	Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA
β ₁ /β ₂ Adr+/+	FVB x C57/Bl6 x 129SvJ	

Niedrigsalz-Enalaprilbehandlung

Zur Stimulation des adulten RAAS wurden die Versuchstiere 7 Tage lang ausschließlich mit Niedrigsalzfutter (0,02% NaCl) ernährt. Nach 3 Tagen wurde das Trinkwasser durch eine Lösung des ACE-Inhibitors Enalapril (0,1mg/ml entsprechend 10mg/kg_{BW} x d) ersetzt und bis zum Versuchsende beibehalten.

3.2.2. Histologische Methoden

3.2.2.1. Fixierung des Nierengewebes

Fixierung mit Methyl-Carnoy-Lösung

Die Nieren von embryonalen und postpartalen Mäusen wurden sofort nach der Entnahme in Methyl-Carnoy-Lösung überführt und mindestens 24h bei 4°C fixiert.

Retrograde arterielle Perfusion

Die Fixierung der Nieren der adulten Mäuse erfolgte durch retrograde arterielle Perfusion mit 3% 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 Darstellung der Bauchaorta wurde die Aorta unterhalb des Abganges der Arteriae renales 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 den 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 3% Paraformaldehyd in PBS mit konstantem Fluss von 40ml/3min. Die herausgenommenen perfundierten Nieren wurden bis zur Paraffineinbettung in 70% Methanol bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2.2. Einbettung in Paraffin

Nach vorangegangener Fixierung erfolgte eine schrittweise Dehydrierung des Nierengewebes in Gewebe-Einbettkassetten durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration:

- 2x30min 70% Methanol (RT)
- 2x30min 80% Methanol (RT)
- 2x30min 90% Methanol (RT)
- 2x30min 100% Methanol (RT)
- 2x30min 100% Isopropanol (RT)
- 1x30min 100% Isopropanol (45°C)
- Isopropanol/Paraffin (1:1)-Gemisch (55°C)
- 2x mindestens 24h Paraffin (60°C)
- Einbettung in mit 60°C warmen Paraffin gefüllten Silikon-Kautschuk-Einbettformen und Aushärten bei RT

3.2.2.3. Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung

Die eingebetteten Präparate wurden auf einen Holzblock geklebt und mit einem Rotationsmikrotom 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 einige Stunden getrocknet.

Die Entparaffinierung erfolgte wie folgt:

- 2x15min 100% Xylol
- 3x5min 100% Isopropanol
- 2x5min 100% Methanol

3.2.2.4. 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.

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.

Protokoll

- 3x5min waschen der Präparate in PBS-Puffer auf dem Schüttler
- 20min blockieren mit 3% H₂O₂ in Methanol
- 30min blockieren mit 10% HS und 1% BSA in PBS bei RT (Abschwächung unspezifischer Bindungen)
- Inkubation der 1. AK üN bei 4°C in einer geschlossenen, feuchten Kammer (Verdünnung der 1. AK in Blockierlösung)
- am folgenden Tag: 3x5min waschen der Schnitte in PBS mit 1% BSA
- Inkubation der 2. AK 2h bei RT im Dunkeln (Verdünnung der 2. AK in PBS/1%BSA)
- 3x5min waschen der Präparate in PBS im Dunkeln
- eindeckeln mit Glycergel

3.2.3. Dreidimensionale Rekonstruktion

3.2.3.1. Akquisition und Digitalisierung

Zur 3D-Rekonstruktion dienten Paraffinserienschnitte von embryonalen, postpartalen und adulten Nieren, welche, wie oben beschrieben, angefertigt und gegen Renin und Glattnuskelaktin doppelimmunfluoreszent gefärbt wurden. Die Digitalisierung der Serienschnitte erfolgte mittels eines Axiovert 200M Mikroskops mit motorisierter Objektauflage, einer Schwarz-weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) und der Software *AxioVision Rel.4.5.* von Zeiss.

AxioVision Rel.4.5

Die auf den Objektträger aufgebrauchten und gefärbten Schnitte wurden mit 100 facher Vergrößerung aufgenommen. 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. Entsprechend sah man mit den Rhodamin-(TRITC)-Filter und einer Anregungswellenlänge von 533-558nm das Fluoreszenzsignal von Renin mit einer Emission von 570-640nm in rot.

- Einstellen der Belichtungszeit
- Übersicht aller Schnitte auf einem Objektträger erstellen
- Aufnehmen der Schnitte
- Bearbeiten der Bilder:

STITCHING

KACHELBILDER KONVERTIEREN

- Speichern der Overlay-Bilder im RGB-Farbraum als *.zvi

Für die weitere Bearbeitung der Daten ist eine Konvertierung in 8 Bit notwendig. Um einen Qualitätsverlust zu vermeiden, wurde das Grafikformat TIFF verwendet.

- Bild öffnen
- Datei => Exportieren=> *.tif
- Stapelverarbeitung

3.2.3.2. Datenaufbereitung mittels ImageJ

Bildstapelgenerierung

Da die Größe der einzelnen Mosaikaufnahmen in Länge und Breite nicht konstant ist, aber gleiche Abmessungen eine wichtige Voraussetzung sind, um die Daten in die Rekonstruktionssoftware portieren zu können, werden die RGB-Bilder zunächst mittels der Graphiksoftware *ImageJ* zu einem Bildstapel (Stack) zusammengefasst:

- alle Serienbilder öffnen
- PLUGINS
- STACKS
- STACK BUILDER

Dabei erhielt man durch Anfügen schwarzer Ränder an die kleineren Bilder einen Stack aller Nierenschnitte mit exakt gleich großen Bildern, der als IMAGE SEQUENCE gespeichert wurde.

3.2.3.3. 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, musste zunächst die Pixelgröße in μm berücksichtigt werden. Dies ist ein Objektiv- und Kamera-abhängige Wert (bei einer Verwendung des 10x Objektives: $1\text{Pixel}=1\text{x}1\mu\text{m}$). Bezogen auf die maximalen Abmessungen des Bildstapels (Länge x und Breite y) und die Gesamtzahl der Schnitte und der Schnittdicke (z) wurde die BOUNDINGBOX definiert, welche die maximalen Abmessungen des Datensatzes in jeder Ebene beschreibt. Da fortan mit dreidimensionalen Daten gearbeitet wurde, wurde der Begriff Pixel durch den Begriff Voxel ersetzt, der der Geometrie des Raumes entsprechend eine quaderförmige Zelle darstellt. Die 3. Dimension entspricht der Schnittdicke. Ein Voxel hat somit z.B. $1\text{x}1\text{x}5\mu\text{m}$.

Farbkanaltrennung

Um es der Rekonstruktionssoftware zu ermöglichen die Fluoreszenzmarkierungen anhand der Grauwerte der Voxel von jedem aufgenommenen Bild zu erkennen, wurden der nun gleichgroße RGB-Bildstapel wieder in seine einzelnen monochromen Kanäle aufgetrennt, um später eine separate Datensegmentierung durchführen zu können:

- COMPUTE
- CHANNEL WORKS
- INPUT 1 CHANNEL 1, speichern als Aktin-Stapel
- INPUT 1 CHANNEL 2; speichern als Renin-Stapel

Alignierung

Da die histologischen Serienschnitte variabel auf den Objektträgern angeordnet waren, mussten der Aktin- und Renin-Stapel aligniert werden, d.h. über Rotations- und Verschiebungsbewegungen wurden jeweils zwei aufeinander folgende Schnitte zur Deckung gebracht. Angewendet auf alle Schnitte entsteht eine vollständig ausgerichtete Niere. Zuerst werden die Aktin-Daten aligniert, da aufgrund zahlreicherer Immunreaktionen eine bessere Alignierung möglich ist. Die Renin-Daten können dann unter Verwendung des Aktin-Stapels als Referenz auf dieselben Positionen gedreht werden, um Deckungsgleichheit zu erreichen.

- COMPUTE
- ALIGN SLICES
- EDIT
- Schnitte nun alignen
- RESAMPLE

Datensegmentierung

Bei der Datensegmentierung (Labeln) werden Strukturen von Interesse durch verschiedene Verfahren markiert. Dieser Schritt entspricht dem zeitintensivsten Teil der Rekonstruktion. Dabei mussten die Markierungen einem definierten Material zugeordnet werden, um später daraus die Oberfläche für dieses Objekt berechnen zu können.

- LABELLING
- LABEL FIELD

Für das Labeln der Immunreaktionen stehen verschiedene Segmentierungstools zur Auswahl:

- BRUSH: Fluoreszenzsignale können im Freihandmodus umfahren werden.
- 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.

Weitere wichtige Werkzeuge sind:

- FILL HOLES: entfernt Löcher in Materialien
- REMOVE ISLANDS: um kleine Material-Inseln (Artefakte) automatisch entfernen zu lassen
- SMOOTH LABELS: wenn die Ränder der Materialien zu kantig erscheinen und eine Glättung erwünscht ist.
- 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.
- INTERPOLATE: eine fehlende Struktur lässt sich durch Selektion auf dem Schnitt vor und nach dem Fehler durch eine Interpolation berechnen.

Sämtliche Segmentierungsfunktionen lassen sich dabei sowohl auf alle Schnitte als auch nur auf den aktuellen Schnitt anwenden. Die markierten Strukturen wurden dann einem Material zugeordnet, aus dem später die Oberfläche berechnet werden konnte. Ziel der Segmentierung war es aus den Aktin-Daten anhand der Fluoreszenzsignale die Gefäße zu erzeugen. Aus den Renin-Daten wurden die reninpositiven Zellen markiert. Die Strukturen der Kapsel und der Glomeruli konnten aufgrund der Eigenfluoreszenz der Präparate erkannt und gelabelt werden.

Oberflächengenerierung

Die erstellten Label-Dateien dienen als Grundlage für die Berechnung der 3D-Modelle. Aus jedem Material wurde eine separate Oberfläche generiert und räumlich dargestellt:

- SURFACE GEN
- Anhängen von SURFACEVIEW zur Darstellung der Oberfläche

Die 3D-Modelle konnten dann auf vielfältige Weise unter PROPERTIES bearbeitet werden, wie z.B.:

- SURFACE-EDITOR: um überflüssige Ausschnitte zu entfernen
- SIMPLIFIER: Reduktion der Polygonzahl, und somit der Datenmenge
- PARAMETER-EDITOR: um die Farbe oder Skalierung der 3D-Modelle zu ändern

Außerdem kann die Oberfläche geglättet werden:

- COMPUTE
- SMOOTH SURFACE

Es bestand nun die Möglichkeit das Objekt zu rotieren und räumlich zu analysieren. Die Darstellungsform konnte unter SURFACE VIEW z.B. in transparent geändert werden: Darüber hinaus konnten 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.

3.2.4. Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1. Isolierung von Total-RNA aus Nieren

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem TRIzol-Reagenz nach dem dazugehörigen Protokoll des Herstellers. Die Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Das TRIzol-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinisoithiocyanat. Mit Hilfe von Chloroform wird das Homogenisat in drei Phasen aufgetrennt. Die RNA wird dann mit Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt. Bei sämtlichen Vorgängen wurden zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen 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.

Kurzprotokoll zur RNA-Isolation mit TRIzol-Reagenz

- 1ml TRIzol-Reagenz für ½ adulte Mausniere bzw. entsprechend weniger für embryonale und postpartale Nieren in Sastedt-Tubes auf Eis vorlegen
- Nieren direkt aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen überführen und ca. 30s homogenisieren

- Mix in 2ml Eppis überführen, 5min bei RT stehen lassen (Proteine denaturieren, lösen sich in Phenol)
- 1/5 Vol. (für ½ adulte Niere also 200µl) Chloroform zugeben, schütteln (nicht vortexen)
- 20min bei 4°C bei 12000rpm zentrifugieren
- ca. 500µl wässrigen Überstand in 1,5ml Eppi überführen, dabei auf keinen Fall Interphase mitnehmen (unten rote Phenolphase, dazwischen Interphase mit hydrophilen Proteinen)
- wässrige Phase 1:1 (500µl) mit Isopropanol mischen, kräftig schütteln
- 10min bei RT RNA ausfällen
- 10min bei 4°C bei 12000rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 1ml 75% Ethanol aufnehmen
- 5min bei 4°C bei 7500rpm zentrifugieren, Überstand abkippen
- Pellet 10min bei RT trocknen und je nach Größe in 50-300µl RNase-freiem Wasser lösen
- max. 2min bei 65°C in den Schüttler resuspendieren, bei -80°C lagern

Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels eines Photometers bei 260nm und 280nm bestimmt. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260nm und 280nm wurde die Qualität der isolierten RNA ermittelt. Für die Versuche wurde nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0 verwendet.

3.2.4.2. cDNA-Synthese

Mittels reverser Transkription (RT) ist es möglich, die isolierte RNA in copy DNA (cDNA) zu übersetzen. In dieser Form sind die Informationen, die ursprünglich auf der RNA gespeichert waren stabiler konserviert und lassen sich mit der PCR-Technik analysieren. Als Primer wurden Oligo(dT)₁₅-Ketten verwendet, um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren.

10µl Ansatz	
1µg	Gesamt-RNA
1µl	Oligo-(dT) ₁₅ Primer (0,5µg/µl)
add	DEPC-H ₂ O
	5min auf 65°C erhitzt, anschließend sofort auf Eis stellen

Zu dem Reaktionsgemisch (10µl) wurde nun folgender Mix zugegeben:

Mix	
1µl	M-MLV Reverse Transkriptase (100U)
4µl	dNTPs (2,5mM)
4µl	Puffer (5x first strand buffer)
3µl	DEPC-H ₂ O

Die cDNA-Synthese erfolgte dann 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 20µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.2.4.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde mit dem Lightcycler 480 SYBR Green Master PCR Kit von Roche an einem Roche Lightcycler 480 durchgeführt.

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.

10µl Reaktionsansatz	
5µl	Lightcycler 480® SYBR Green Master
0,5µl	sense Primer (10pmol/µl)
0,5µl	antisense Primer (10pmol/µl)
3µl	dd H ₂ O
1µl	cDNA

Amplifizierungsprotokoll			
Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	95°C	15min	Aktivierung
40	95°C	15s	Denaturierung
	58°C	20s	Annealing
	72°C	20s	Elongation

Am Ende jedes 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.

3.2.4.4. Genotypisierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden mittels PCR geotypisiert. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte nach der NaOH-Methode.

Protokoll zur gDNA-Extraktion

- abschneiden von 2mm Mausschwanz und im 1,5ml Cup versetzen mit 100µl 25mM NaOH
- Inkubation bei 96°C für 1h im Thermocycler
- gut vortexen, um den Schwanz aufzulösen und Zugabe von 10µl Tris HCl, pH8
- 6min zentrifugieren bei 10000rpm
- einsetzen von 2µl des Überstandes (gDNA) in die Genotypisierungs-PCR

20µl PCR-Reaktionsansatz	
1µl	sense Primer (10pmol/µl)
1µl	antisense Primer (10pmol/µl)
2,5µl	dNTPs (2,5mM)
4µl	Puffer (GoTaq buffer green)
0,3µl	GoTaq
9,2µl	dd H ₂ O
2µl	gDNA

Amplifizierungsprotokoll			
Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94°C	2min	Aktivierung
35	94°C	30s	Denaturierung
	variabel	1min	Annealing
	72°C	1min	Elongation
1	72°C	2min	Elongation
1	4°C	∞	Store

Die Annealing-Temperatur war für die verschiedenen PCRs wie folgt:

PCR	Annealing-Temperatur
alle Gsα-PCRs	58°C
Adrb1-WT	67°C
Adrb1-MUT	60°C
Adrb2-WT-MUT	65°C

Die PCR-Ansätze wurden dann auf ein Agarosegel (2%) aufgetragen. Durch horizontale Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente nach der Größe aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V.

4. Ergebnisse

4.1. Die Entwicklung der Reninexpression in der normalen Mausniere

Zur Untersuchung der Ontogenese reninbildender Zellen wurde im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit das zeitlich-räumliche Muster der Reninexpression während der Entwicklung in der normalen, genetisch nicht modifizierten Niere bestimmt. Hierzu wurden Serienfolgeschnitte von Mausnieren des Embryonaltages 13 (E13) bis zum postpartalen Tag 10 (pp10) sowie der adulten Niere angefertigt. Die Expression von Renin und Glattmuskelaktin als Marker für den arteriellen Gefäßbaum, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Aus diesen Folgeschnitten wurde mit Hilfe des 3D-Rekonstruktionsprogramms Amira die Entwicklung des Gefäßsystems und der reninbildenden Zellen zeitlich-räumlich dargestellt.

Immunreaktivität für Renin war dabei erstmals in metanephridischem Gewebe in Assoziation mit Blutgefäßen am E15 nachweisbar. Wie in Abbildung 6c zu sehen ist, erscheinen vereinzelte positive Signale in der Media der distalen Bereiche der Arteriae arcuatae. Obwohl vereinzelte reninpositive Bereiche in den arcuaten Seitenästen zu finden sind, sind diese Gefäßabschnitte sowie die afferenten Arteriolen der bereits angelegten juxtamedullären Glomeruli zu diesem Zeitpunkt normalerweise reninfrei. Mit fortschreitender Entwicklung breitet sich die Reninexpression zwischen dem E16 und E17 einerseits retrograd in die proximalen Abschnitte der arcuaten Hauptstämme und andererseits distal in die neu angelegten arcuaten Seitenäste aus (Abb. 6d, e). Die Reninverteilung entlang der Gefäße verläuft dabei stets in einem diskontinuierlichen Muster. Die Heterogenität der Expression setzt sich auch weiter in den Interlobulararterien, die aus den arcuaten Seitenästen hervorgehen, fort (Abb. 6f, g). Daneben findet man Renin in juxtamedullären afferenten Arteriolen, die sich bereits neben den arcuaten Seitenästen auch am arcuaten Hauptstamm bilden. Nachdem sich die Reninexpression um E17 zeitweise nahezu über den gesamten arteriellen Gefäßbaum erstreckt, nimmt sie kurz vor der Geburt am E18 in den großen arcuaten Hauptstämmen orthograd von proximal nach distal ab (Abb. 6g, h). Die Mehrzahl der afferenten Arteriolen exprimiert Renin nun entweder in ihrer ganzen Länge oder bereits in juxtaglomerulärer Position.

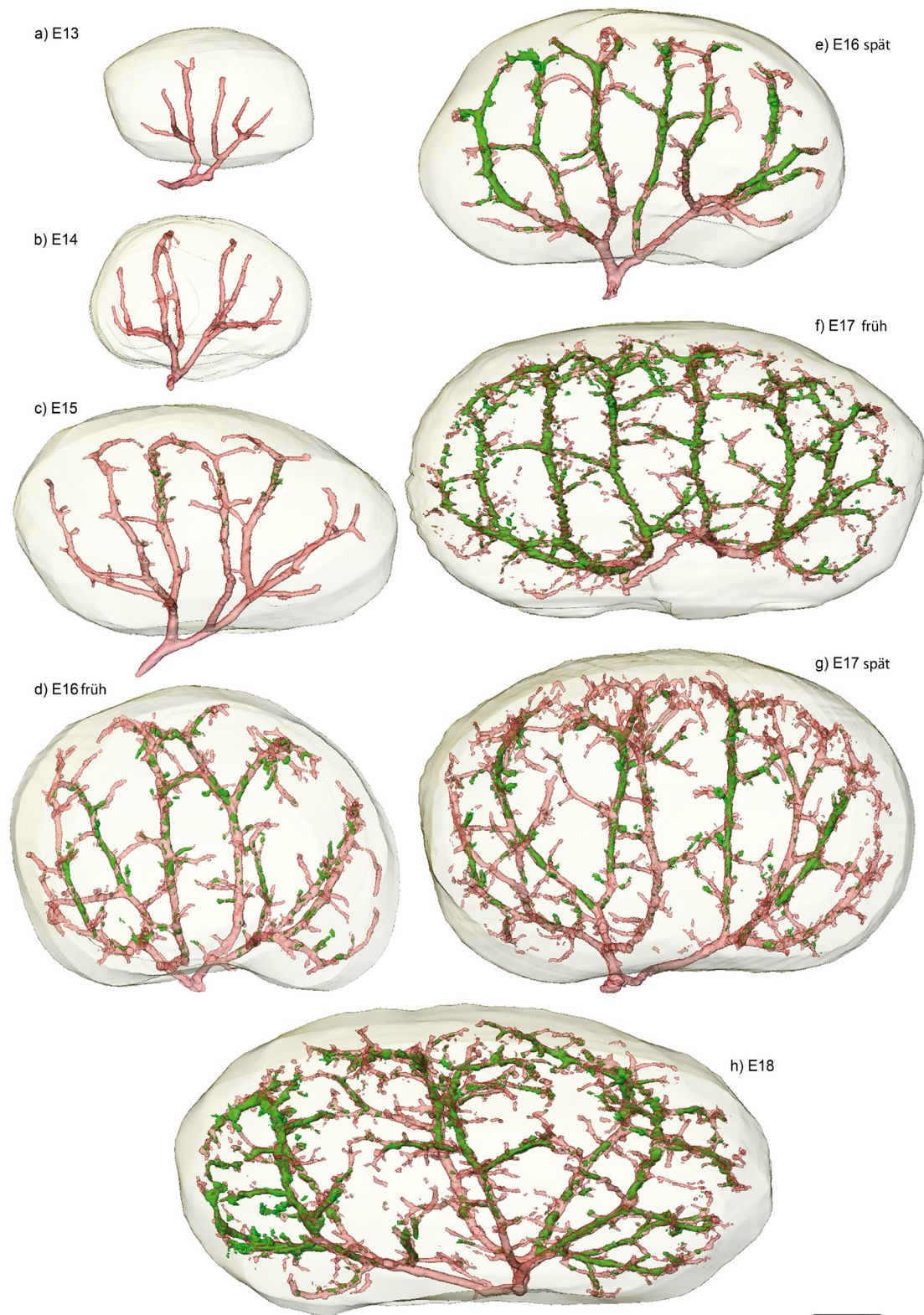


Abb. 6 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in der sich entwickelnden Mausniere. Balken=300µm. (a) E13, (b) E14, (c) E15, (d) früher E16, (e) später E16 (f) früher E17, (g) später E17 und (h) E18. (Sauter et al., 2008)

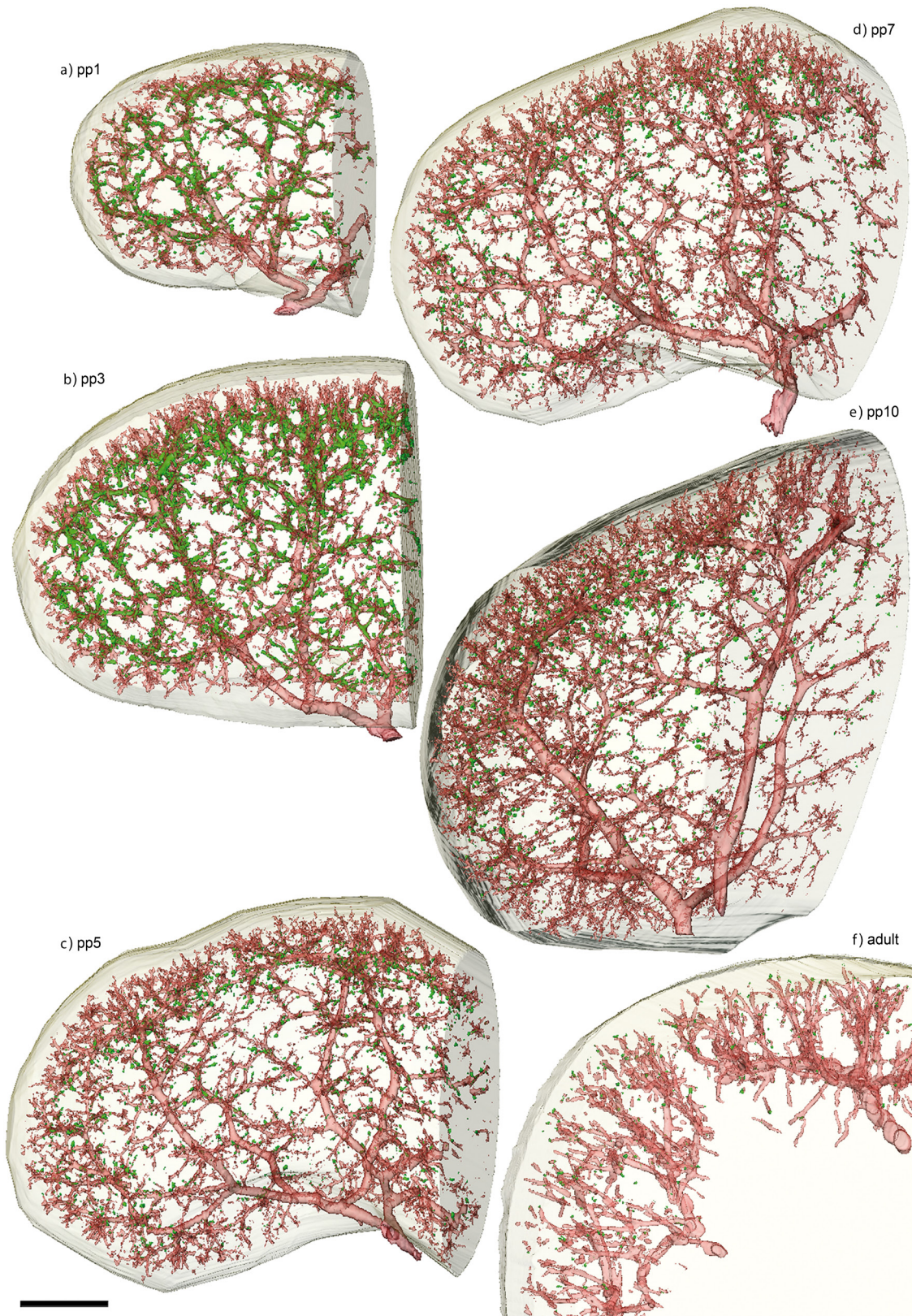


Abb. 7 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in der sich entwickelnden Mausniere. Balken=500μm. (a) pp 1, (b) pp3, (c) pp5, (d) pp7, (e) pp10 und (f) pp90 (Adult). (Sauter et al., 2008).

Einen Tag nach der Geburt (pp1) ist in den arcuaten Hauptstämmen nur noch eine lückenhafte Reninexpression vorhanden (Abb. 7a). Sie befindet sich nun primär in den dickeren arcuaten Seitenästen und den juxtamedullären afferenten Arteriolen der bogenförmigen Arcuatae-Abschnitte. Aber auch die neu entstehenden juxtamedullären Interlobulararterien zeigen reninbildende Zellen. Mit fortschreitender Reifung des Organs zieht sich die Reninexpression zwischen pp3 und pp7 aus den proximalen Bereichen der arcuaten Seitenäste zurück. Im Gegensatz zu den juxtamedullären Interlobulararterien sind die neuen kortikoradialen Interlobulararterien sowie die gesamte subkapsuläre Zone stets reninfrei (Abb. 7a-d). Der sukzessive Rückzug der Immunreaktivität lässt sich bis zum 10. Tag post partum verfolgen. Sie ist dann nur noch in afferenten Arteriolen, in juxtaglomerulärer Position, zu finden. Ab pp10 wird Renin auch in der subkapsulären Zone exprimiert (Abb. 7e-f). Dabei zeigen generell alle Glomeruli reninpositive Zellen (Abb. 7f).

4.2. Untersuchungen im Gs_{α} -Knockout

4.2.1. 3D-Modelle der Reninverteilung während der Nierenentwicklung

Der cAMP-Signalweg gilt auf molekularer Ebene als etablierter Stimulator des Reninsystems in der adulten Niere. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die cAMP-Signalkaskade einen Effekt auf das Anschalten der Reninexpression während der Nephrogenese hat. Ein geeignetes Tiermodell findet sich in der gewebsspezifischen Gs_{α} -Knockoutmaus. Das Modell setzt am heterotrimeren stimulierenden G-Protein Gs an, dessen α -Untereinheit mit Hilfe des Cre/loxP-Systems in reninbildenden Zellen deletiert ist. Die Cre-Rekombinase steht dafür unter der Kontrolle des murinen Reninpromotors, wodurch Gs_{α} allen Zellen deletiert wird, in denen der Reninpromotor aktiv ist. Entsprechend den Untersuchungen an der normalen Niere wurde nun auch die zeitlich-räumliche Entwicklung der Reninexpression in der reninzellspezifischen Gs_{α} -Knockoutmaus betrachtet. Dazu wurden diejenigen Stadien verwendet, welche die wesentlichen Veränderungen der Gefäßbaumentwicklung und der Reninexpression repräsentieren, d.h. E16, E18, pp1 und Adult des Knockouts und des entsprechenden Wildtyps.

Embryonaltag 16

Im Wildtyp ist am 16. Tag der Embryonalentwicklung die Arteria renalis in zwei Interlobararterien gegabelt. Diese zweigen sich in die bogenförmigen Hauptäste der Arteriae arcuatae auf. Zu diesem Zeitpunkt sind an diesen arcuaten Hauptstäben bereits mehrere Abzweigungen zu sehen. Die kurzen Gefäße, die aus den konkaven Seiten der Hauptäste herauswachsen, stellen die afferenten Arteriolen erster juxtamedullärer Glomeruli dar. Auf der konvexen Seite entspringen meist rechtwinklig arcuate Seitenäste, von denen einerseits die kortikalen Interlobulararterien abgehen oder sich andererseits afferente Arteriolen bilden (Abb. 8). In diesem Stadium sind im Erscheinungsbild der renalen Gefäßbäume von Wildtyp und $G_{s\alpha}$ -Knockout keine größeren Unterschiede zu erkennen. Trotzdem ist eine geringfügig niedrigere Anzahl an Verzweigungen und eine leichte Verkürzung der afferenten Arteriolen in den Nieren mit der JG-zellspezifischen $G_{s\alpha}$ -Defizienz zu sehen (Abb. 8, 10).

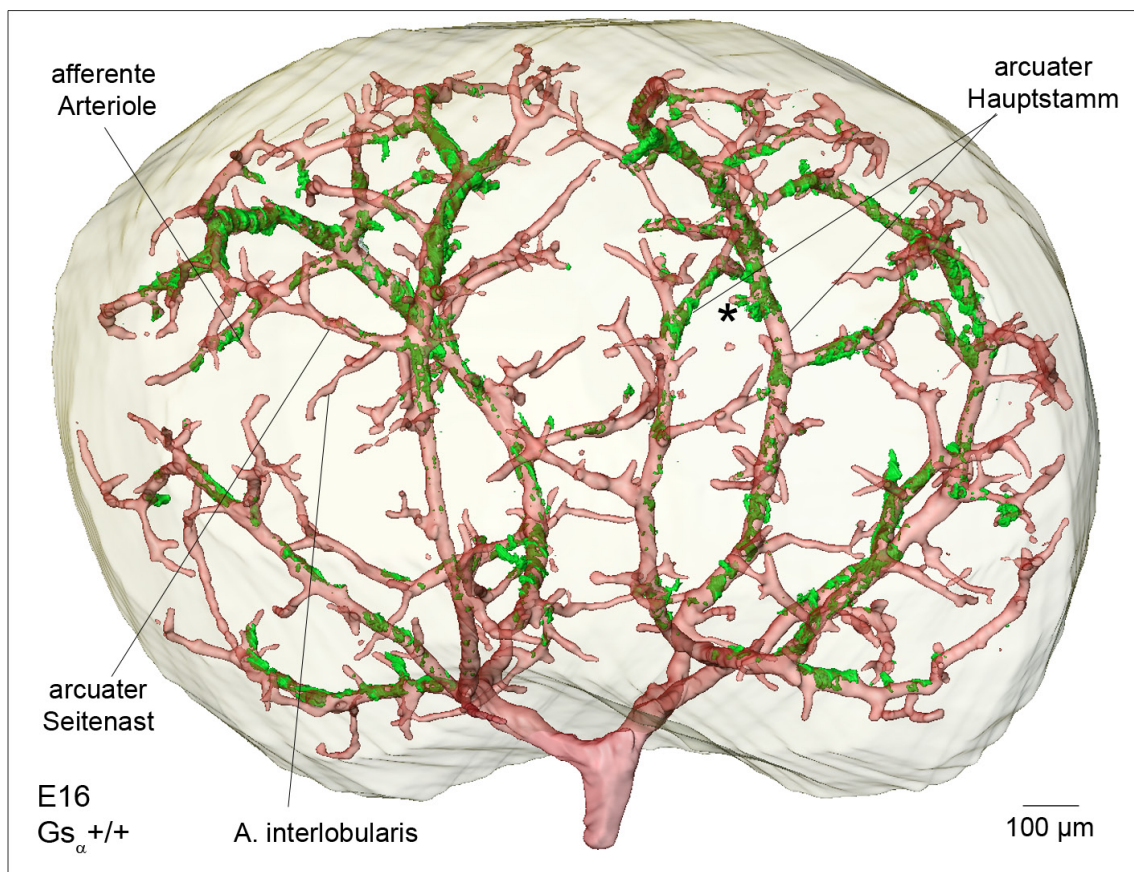


Abb. 8– 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im $G_{s\alpha}$ -Wildtyp am E16 im gesamten Organ.

Im Wildtyp findet man Reninexpression entlang der arcuaten Hauptäste, jedoch nicht kontinuierlich, sondern unterbrochen durch reninfreie Bereiche (Abb. 8). Auch in den von den arcuaten Hauptästen abzweigenden Seitenästen ist die Expression von Renin diskontinuierlich. Diese Heterogenität ist ebenfalls in den von den Seitenästen abzweigenden Interlobulararterien zu beobachten (Abb. 9). Außerdem sind in einigen juxtamedullären afferenten Arteriolen, welche direkt vom arcuaten Hauptstamm abgehen, reninbildende Zellen vorhanden (siehe Stern, Abb. 8).

Gs_{α} -Knockoutnieren zeigen in diesem Stadium nahezu keine Reninexpression. Nur sehr vereinzelt findet man reninbildende Zellen in den von den arcuaten Hauptstämmen abzweigenden afferenten Arteriolen (Abb. 11).

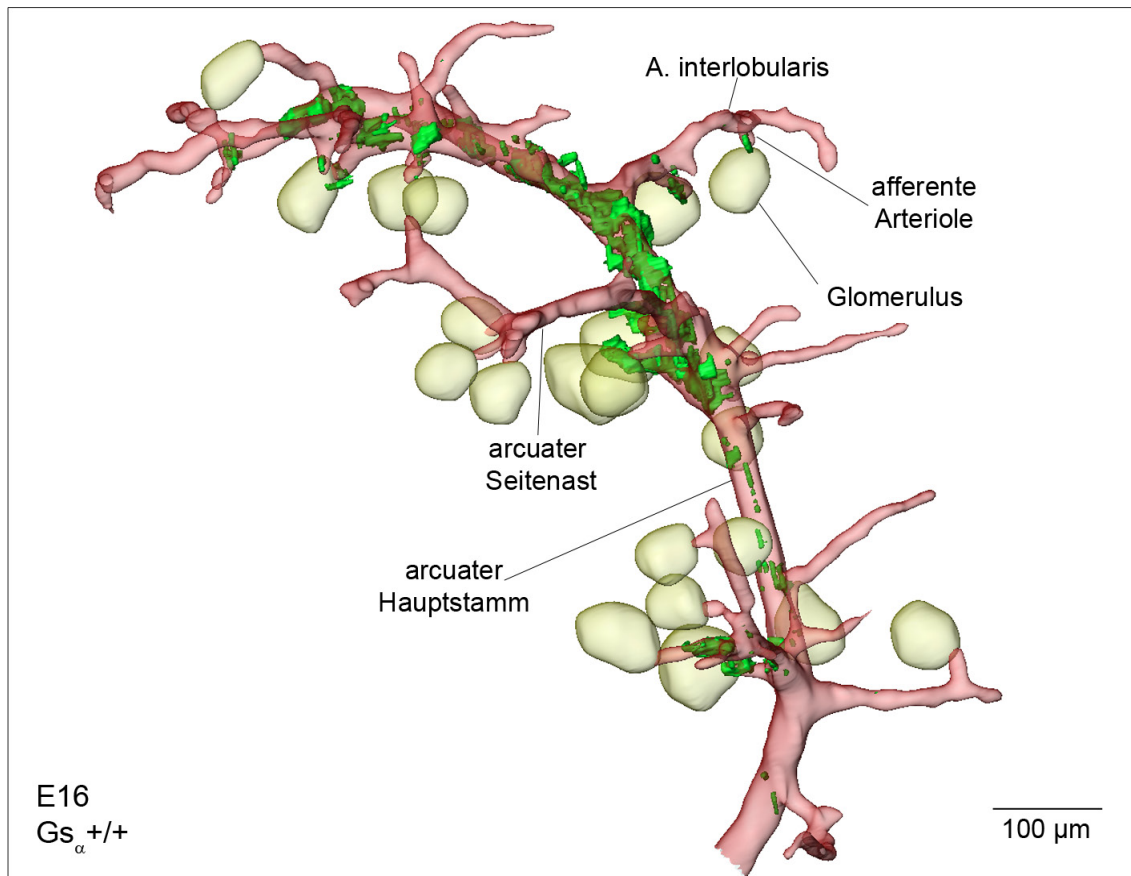


Abb. 9 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Wildtyp am E16 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

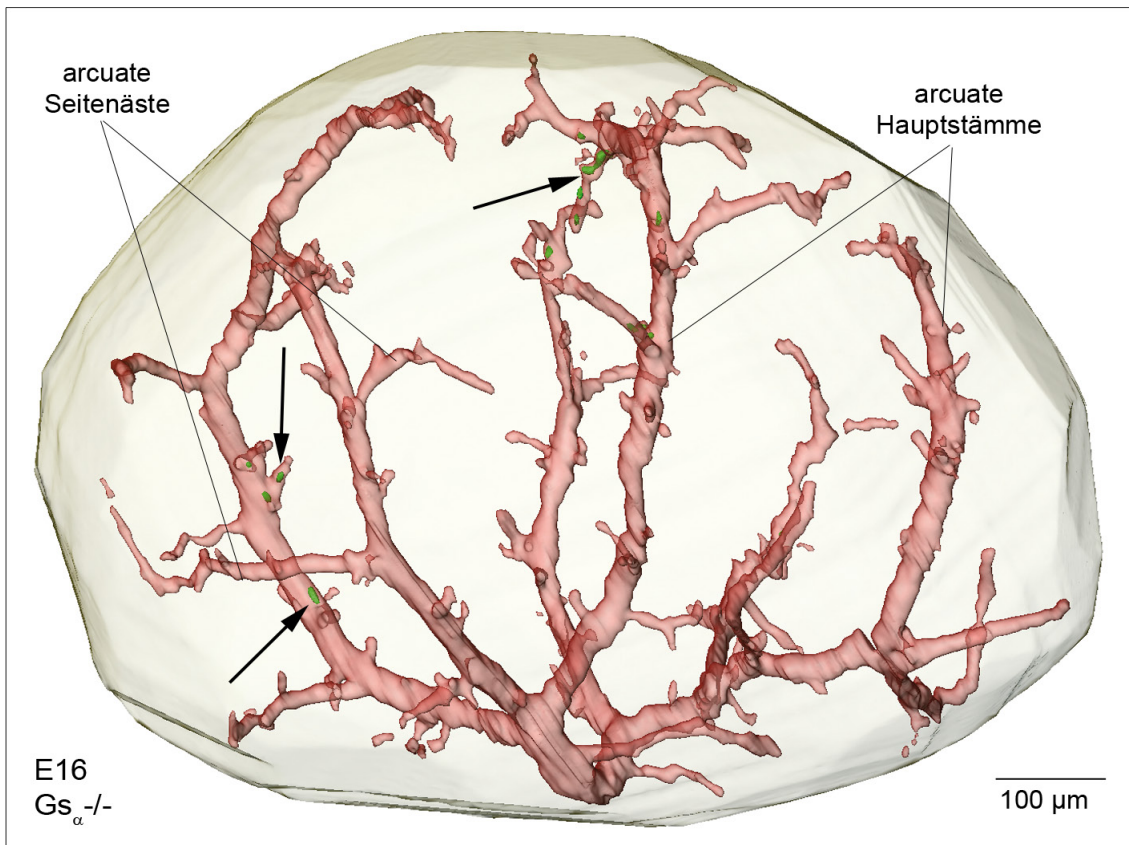


Abb. 10 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Knockout am E16 im gesamten Organ. Pfeile zeigen Reninexpression.

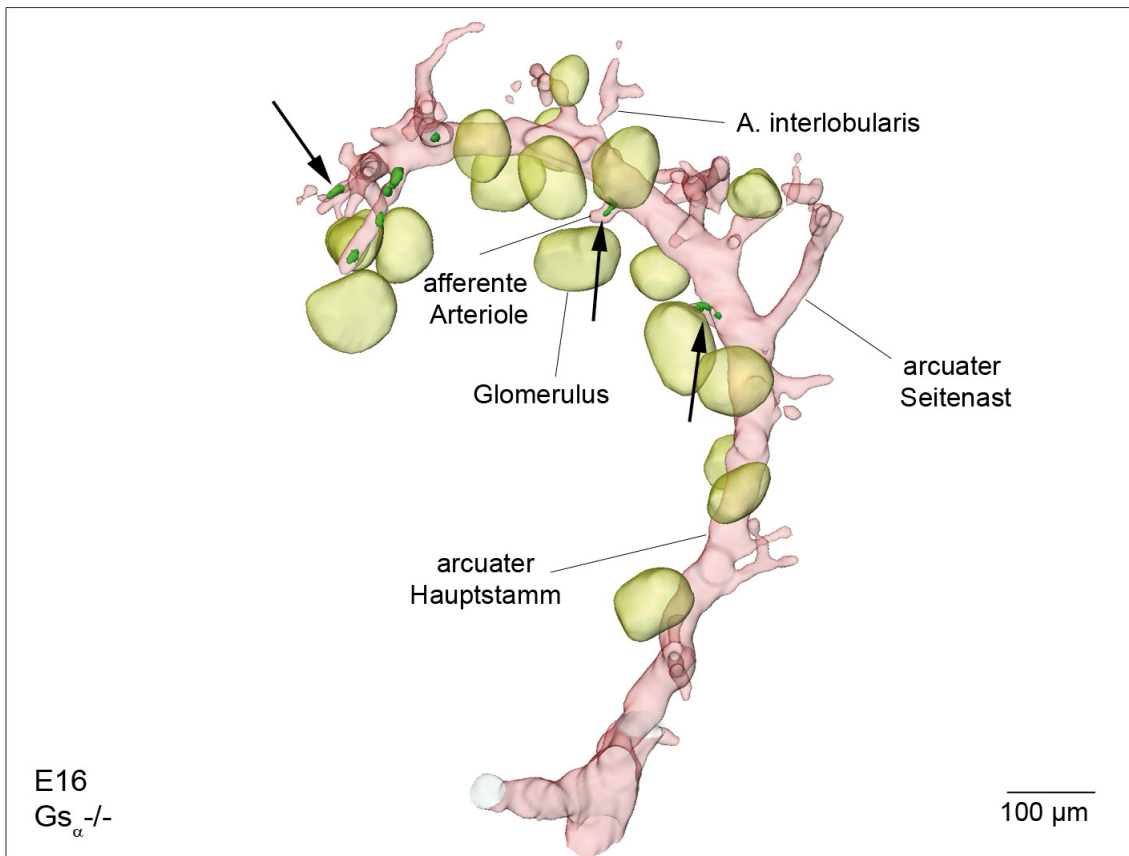


Abb. 11 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Knockout am E16 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Embryonaltag 18

Am Embryonaltag 18 ist die Ausbildung und Elongation der Seitenäste, die dem arcuaten Hauptstamm entspringen, deutlich vorangeschritten und der Verzweigungsgrad hat exponentiell zugenommen (Abb. 12). Die von diesen Seitenästen abgehenden Interlobulararterien sind klar zu erkennen. Es fallen verschiedene Typen afferenter Arteriolen auf. Zum einen sprießen sie aus dem arcuaten Hauptast (I), zum anderen aus den arcuaten Seitenästen (II). Wiederum andere gehen von den sich entwickelnden Interlobulararterien (III) ab.

Die Reninexpression verschiebt sich in der Wildtypniere von den proximalen in die distalen Bereiche des präglomerulären Gefäßbaums, wobei ein stark lückenhaftes Expressionsmuster zu sehen ist (Abb. 12, 13). Der Gs_{α} -Knockout hingegen ist in diesem Stadium der Entwicklung beinahe reninfrei. Nur sehr vereinzelt sind reninhaltige Zellen zu finden, dann hauptsächlich in den afferenten Arteriolen (Abb. 14, 15).

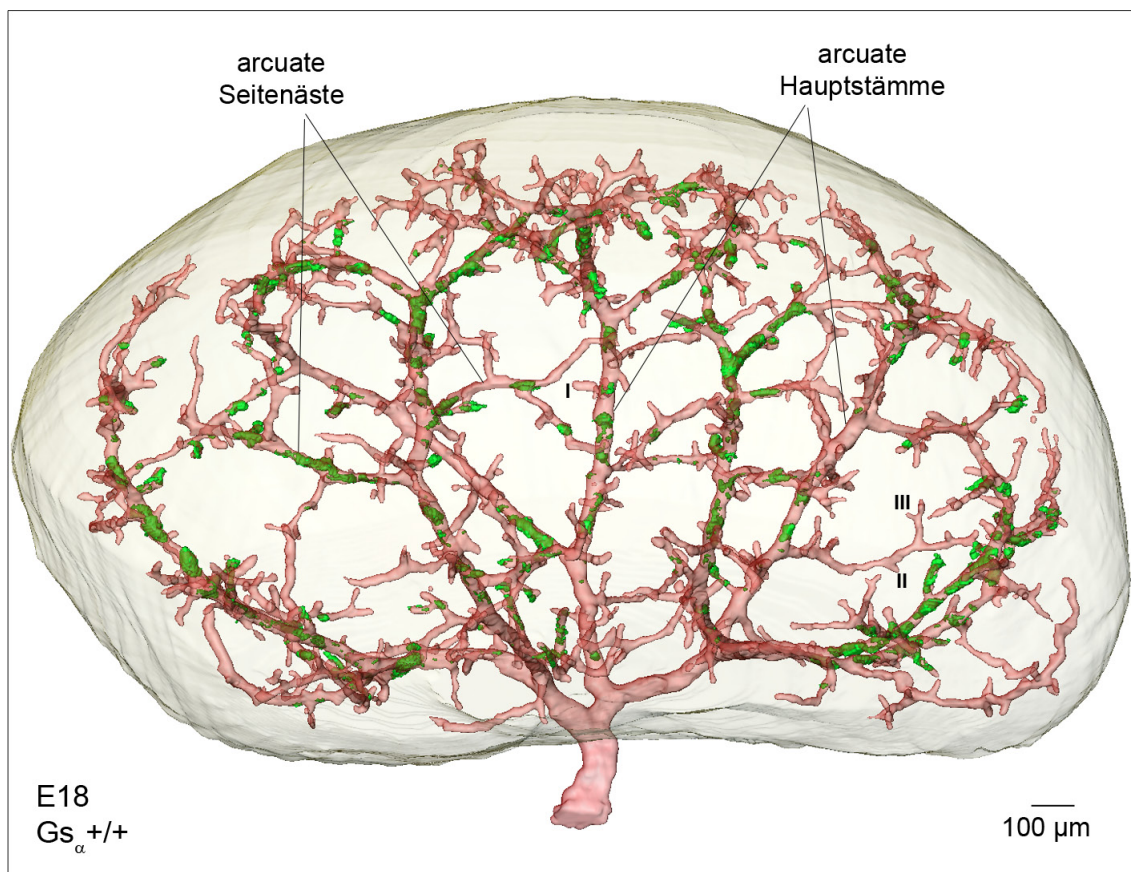


Abb. 12 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Wildtyp am E18 im gesamten Organ. I-III zeigen verschiedene Typen afferenter Arteriolen.

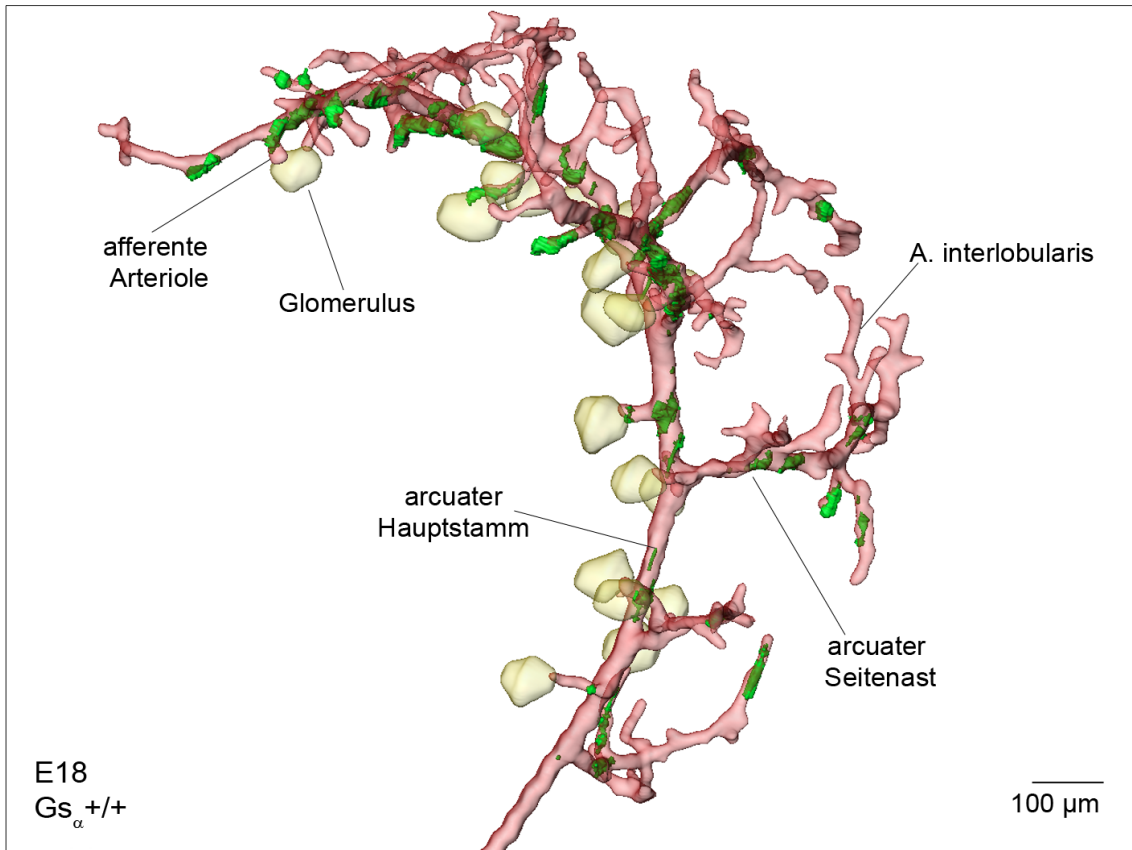


Abb. 13 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs $_{\alpha}$ -Wildtyp am E18 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

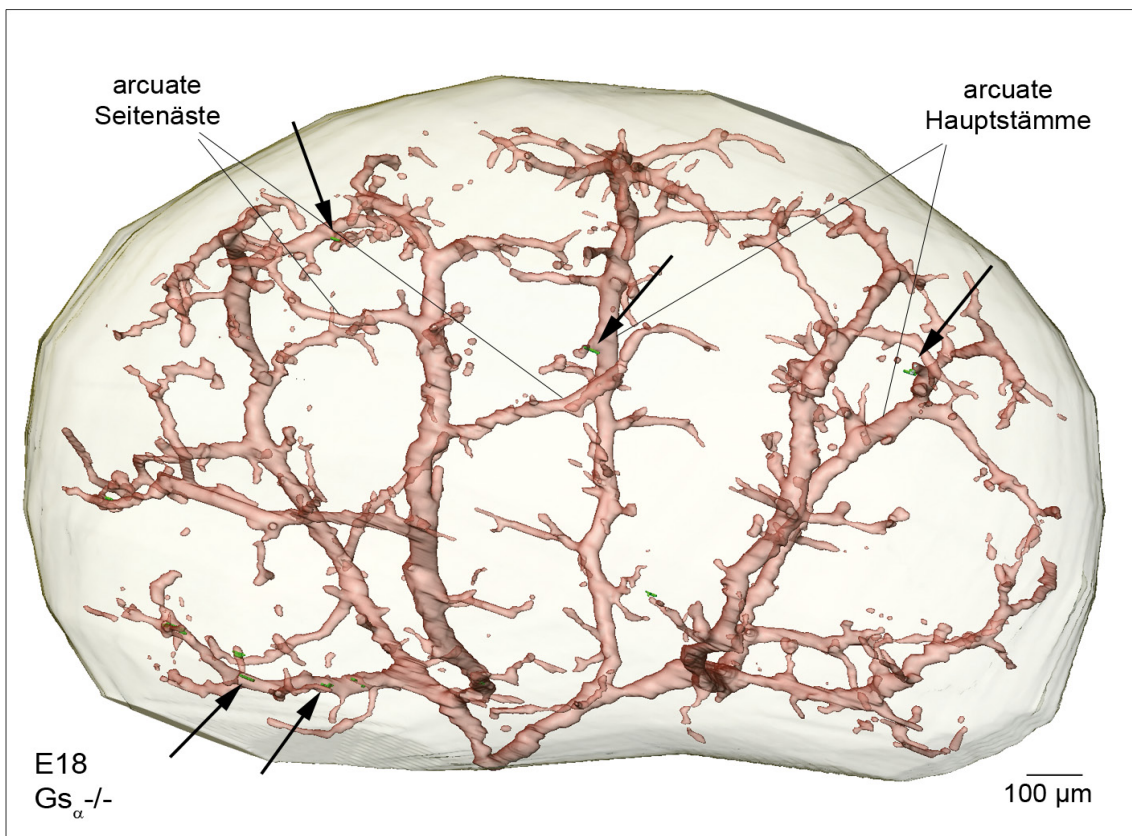


Abb. 14 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs $_{\alpha}$ -Knockout am E18 im gesamten Organ.

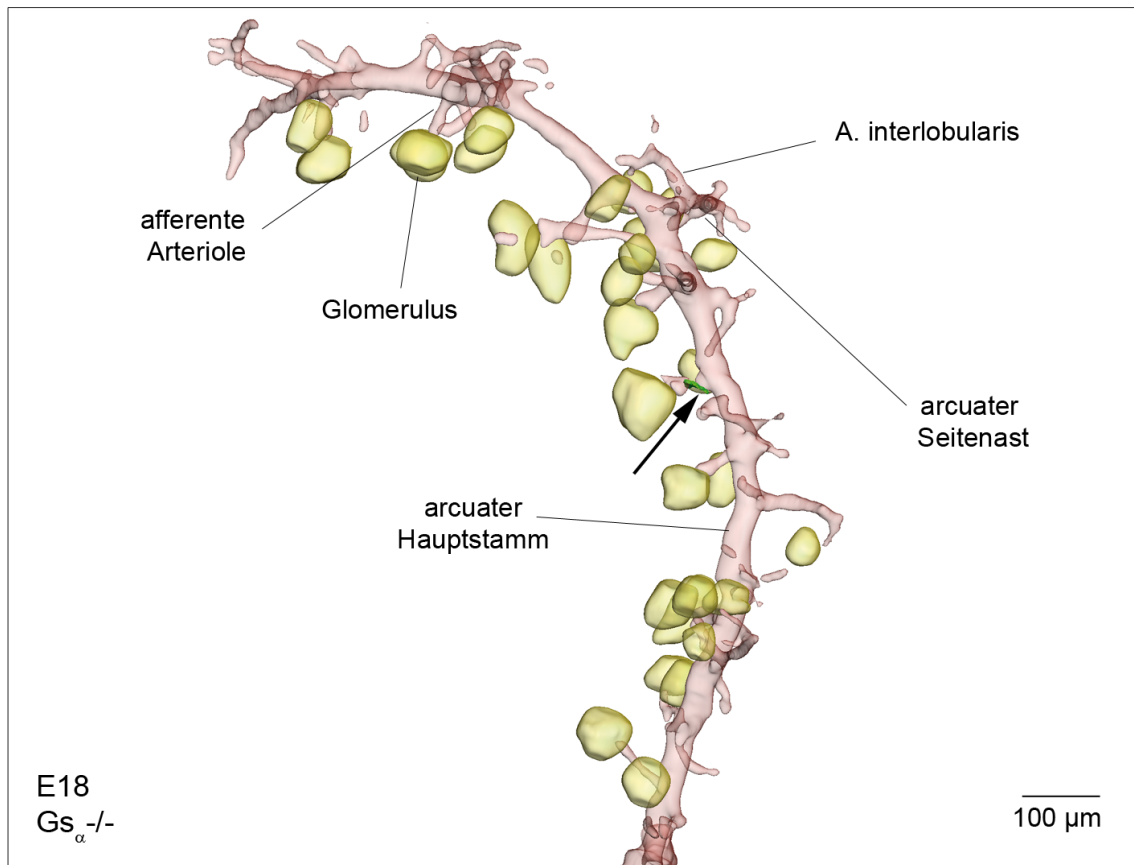


Abb. 15 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Knockout am E18 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Postpartaler Tag 1 (pp1):

Bis zum ersten Tag post partum (pp1) haben sich die arcuaten Seitenäste im Verzweigungsgrad und der Gefäßlänge deutlich weiterentwickelt. Die Anzahl an juxtamedullären afferenten Arteriolen ist sowohl in der normalen als auch in der Gs_{α} -Knockoutniere gestiegen (Abb. 16, 18). Zu diesem Zeitpunkt sind zahlreiche weitere Abzweigungen von den arcuaten Seitenästen zu sehen, die eine beginnende Ausbildung von Aa. interlobulares in der subkapsulären Zone anzeigen (Abb. 17, 19). Parallel zur Organentwicklung ist ein weiteres Wachstum der radial kortikalen Interlobulararterien und der zugehörigen afferenten Arteriolen zu beobachten, bis schließlich die typische radiale Struktur erreicht ist.

Im Wildtyp ist die Reninexpression am ersten Tag nach der Geburt aus den proximalen Abschnitten der arcuaten Hauptstämme weitgehend verschwunden. Der größte Teil der reninbildenden Zellen findet sich nun in den arcuaten Seitenästen, den Interlobulararterien und in den afferenten Arteriolen (Abb. 17). Die Expression folgt

dabei einem diskontinuierlichen Muster. In Gs_{α} -defizientem Gewebe konnte auch am pp1 nahezu keine Immunoreaktivität für Renin nachgewiesen werden (Abb. 19).

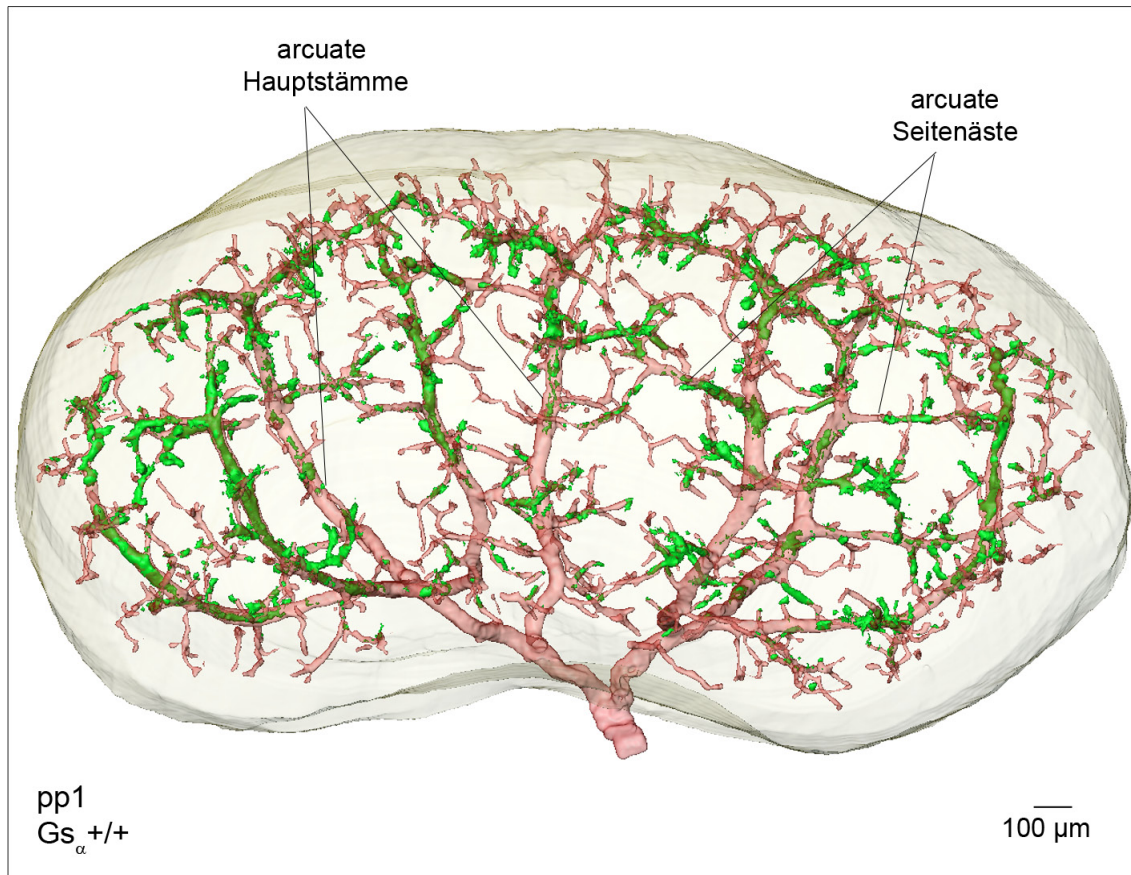


Abb. 16– 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Wildtyp am pp1 im gesamten Organ.

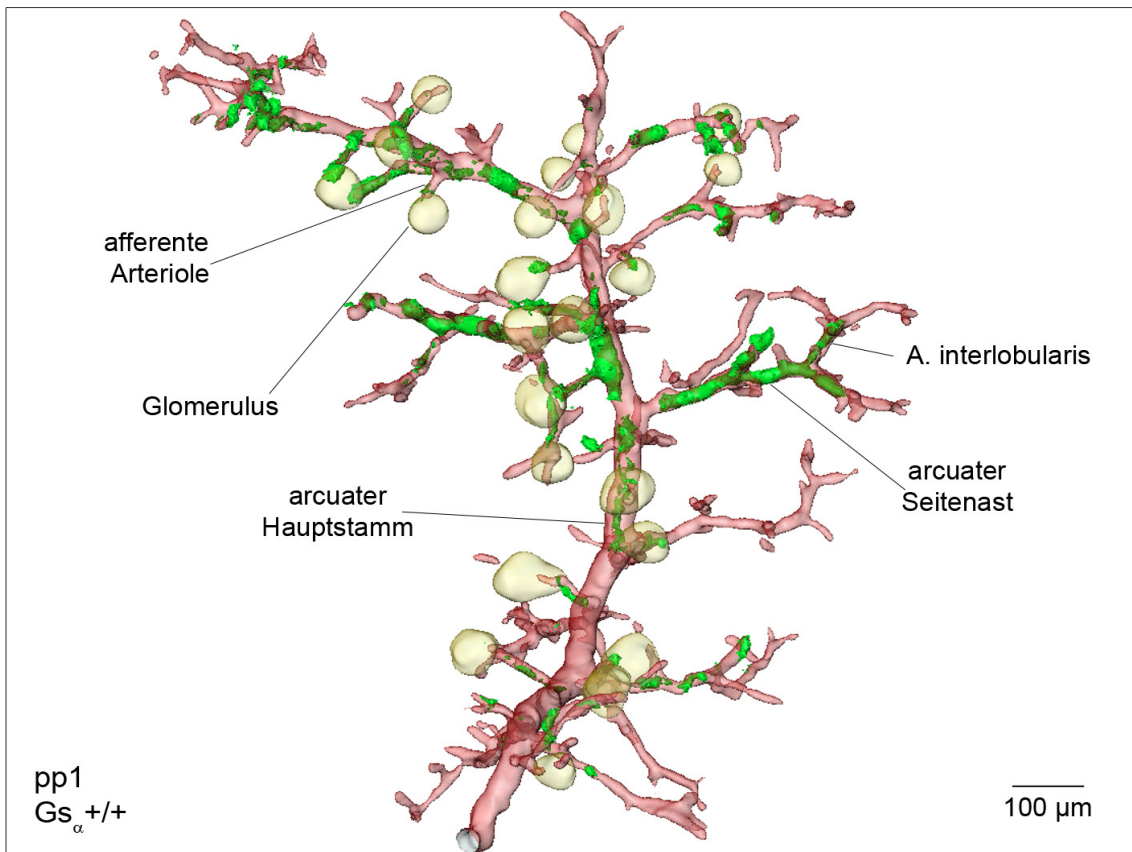


Abb. 17 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_α-Wildtyp am pp1 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

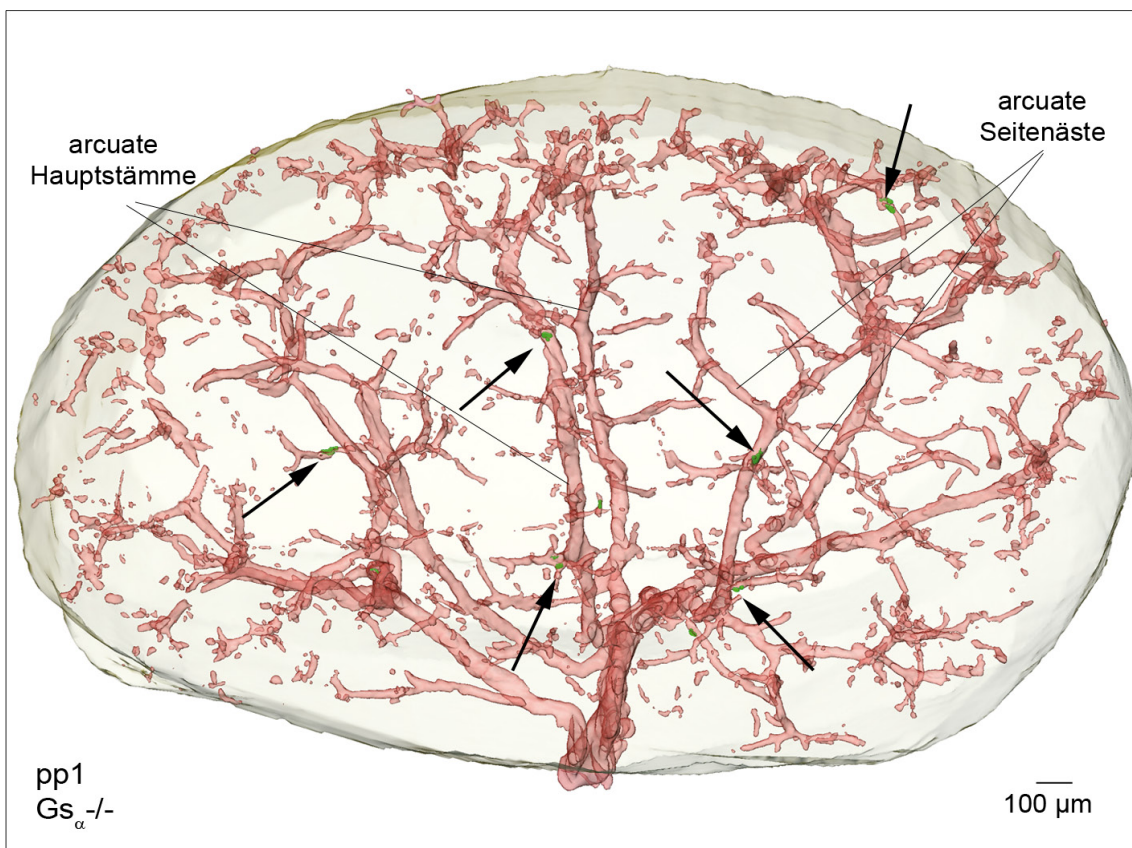


Abb. 18 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_α-Knockout am pp1 im gesamten Organ.

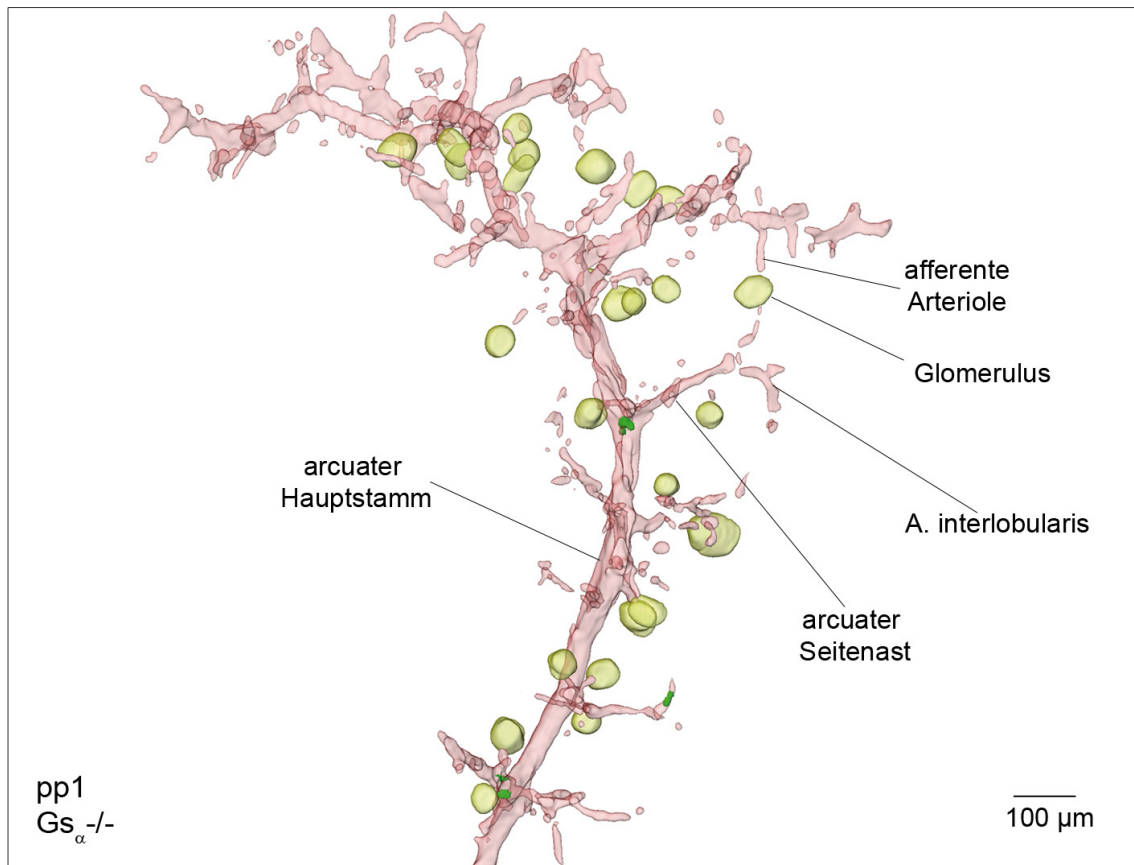


Abb. 19 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Knockout am pp1 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Adultzustand:

Im adulten Wildtyp konnte die klassische Lokalisation der Reninexpression gezeigt werden. Dabei ist die Reninbildung eng auf die terminalen Bereiche der afferenten Arteriolen beschränkt (Abb. 20). Auch im adulten Zustand waren RC- Gs_{α} -/- Nieren nahezu frei von Renin (Abb. 21). Neben der erwähnten Verkürzung zeigen adulte RC- Gs_{α} -/- Nieren eine leicht reduzierte Anzahl kortikaler afferenter Arteriolen, obwohl die generelle Architektur des präglomerulären arteriellen Gefäßbaums der des Wildtyps entspricht. In allen untersuchten Entwicklungsstadien wurde Reninimmunreaktivität ausschließlich in Assoziation mit Blutgefäßen gefunden.

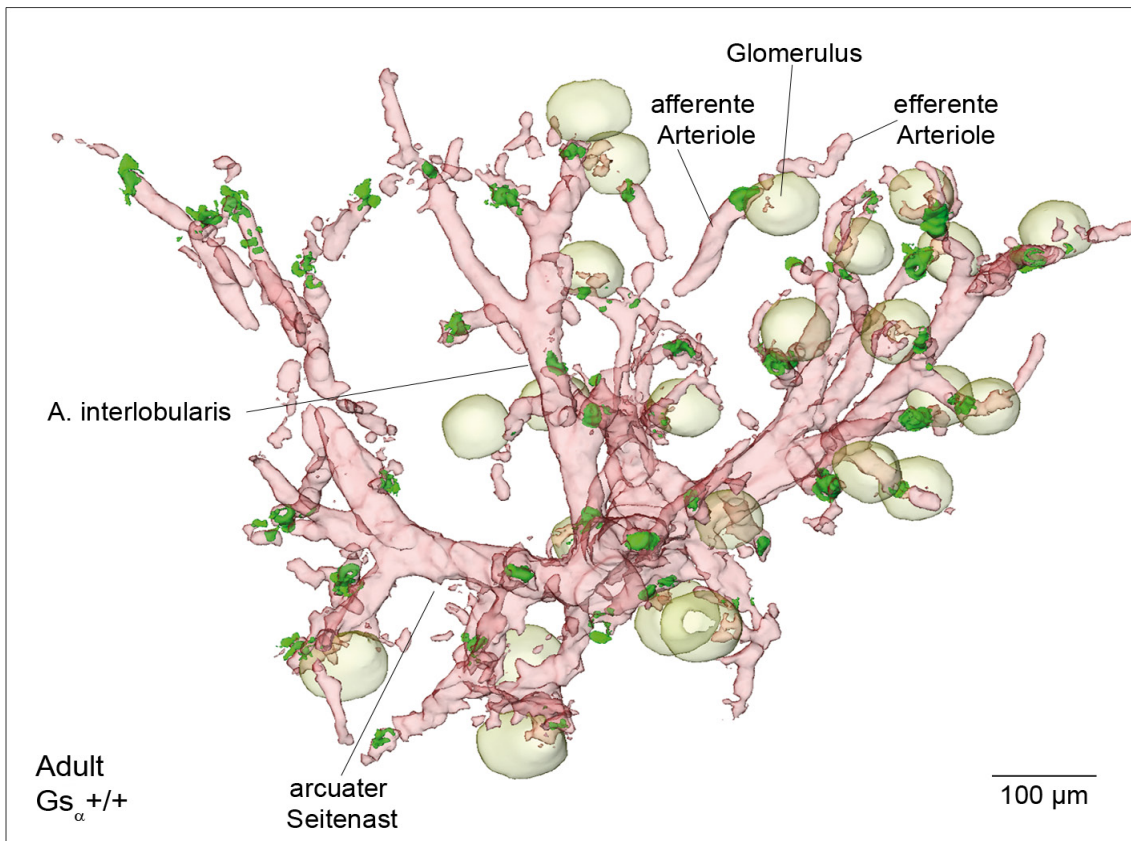


Abb. 20 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im adulten $G_{s\alpha}^{+/+}$ -Wildtyp in einem isolierten arcuaten Seitenast.

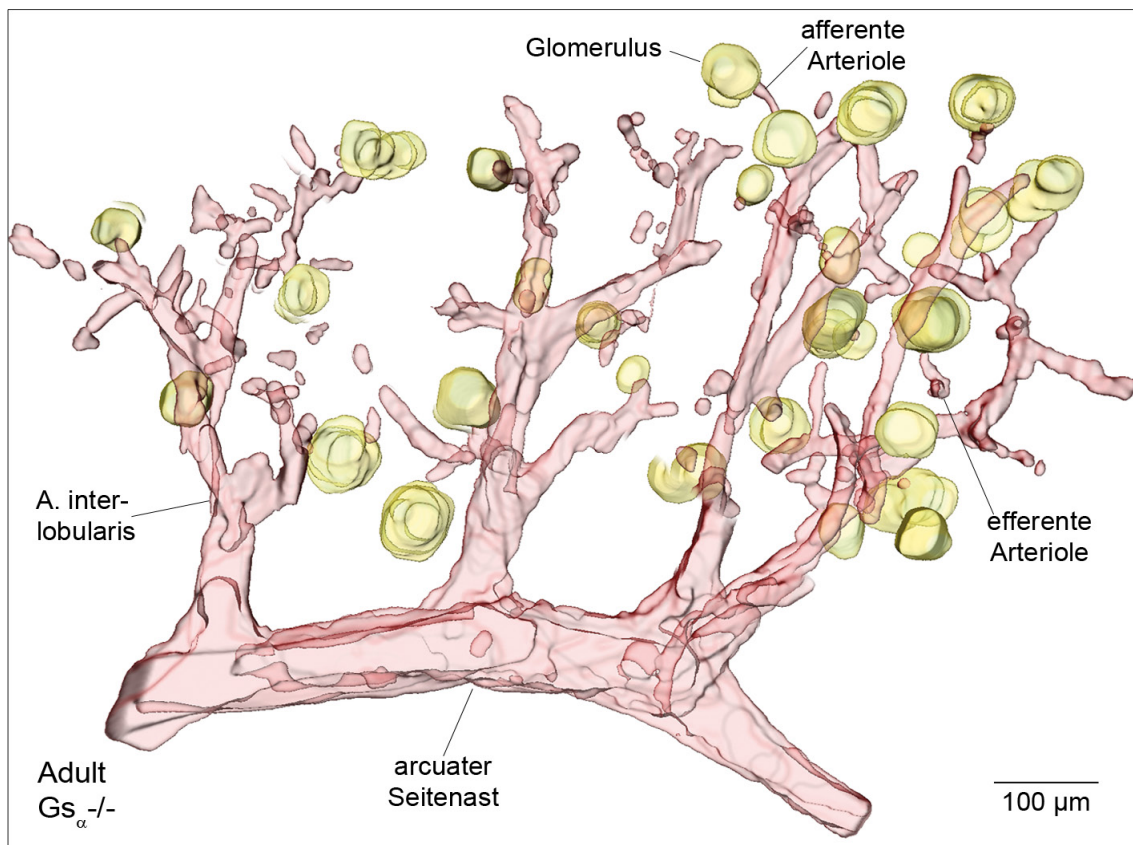


Abb. 21 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im adulten $G_{s\alpha}^{-/-}$ -Knockout in einem isolierten arcuaten Seitenast.

4.2.2. Statistische Untersuchung zur Architektur des Gefäßsystems

Zur Bestätigung der in den einzelnen 3D-Rekonstruktionen gezeigten Unterschiede der Architektur des Gefäßsystems während der gesamten Nierenentwicklung wurde die Länge afferenter Arteriolen in den Modellen der Wildtyp- und RC-Gs α -Knockoutnieren vermessen.

Während man keine gravierenden Unterschiede in der Architektur des arteriellen Gefäßsystems zwischen Wildtyp- und Gs α -Knockoutmäusen findet, ist dennoch in allen untersuchten Stadien der Verzweigungsgrad und die Länge der afferenten Arteriolen im Gs α -Knockout etwas verringert (Abb. 22).

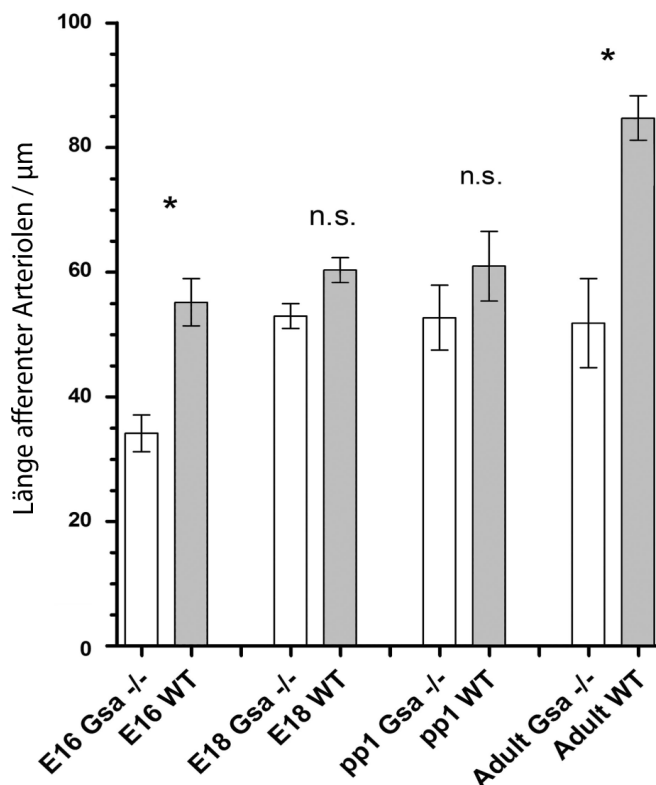


Abb. 22 - Länge afferenter Arteriolen in RC-Gs α -/- und WT-Nieren. Pro Genotyp und Stadium wurden 40-50 Arteriolen gemessen. Dargestellt ist die mittlere Länge \pm SEM. n.s. = nicht signifikant; * = $P < 0,05$. (Neubauer et al., 2009)

4.2.3. Histologische Betrachtung

Außerdem wurden zur Verdeutlichung der 3D-Modelle exemplarisch die Besonderheiten der Reninexpression während der Nierenentwicklung in beiden Genotypen anhand histologischer Immunfluoreszenzdoppelfärbungen dargestellt.

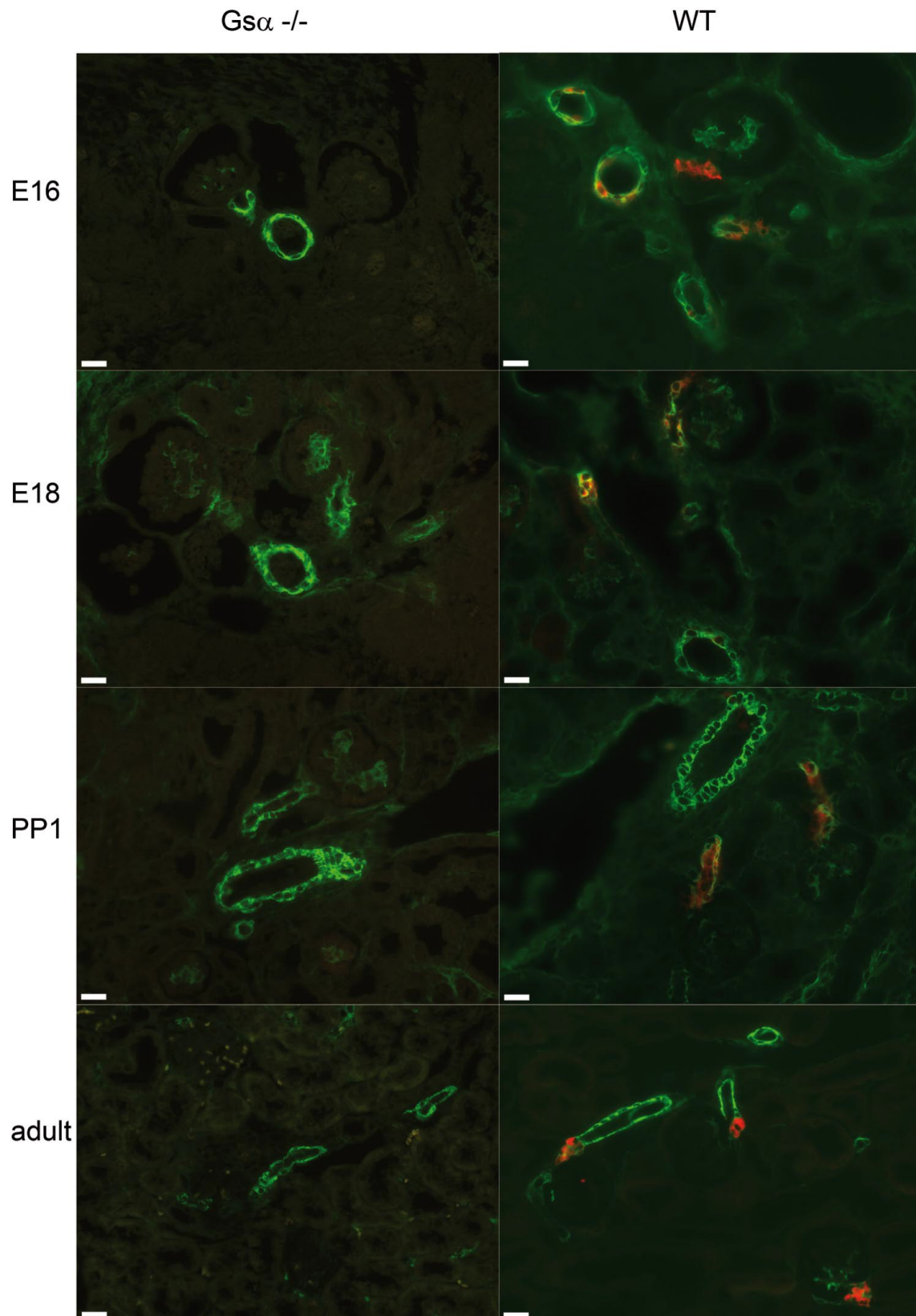


Abb. 23 - Immunfluoreszenz-doppelfärbung an Paraffinschnitten der Stadien E16, E18, pp1 und Adult. Links sind Aufnahmen von $Gs\alpha$ -Knockoutstadien abgebildet, rechts WT-Aufnahmen. Immunreaktionen für Glattmuskelaktin sind in grün und für Renin rot dargestellt. Gelbe Bereiche zeigen die Kolo­kalisierung beider Proteine. Vergrößerung 400x. Die Maßstabsbalken entsprechen 20µm. (Neubauer et al., 2009)

Die abgebildeten Paraffinschnitte (Abb. 23) zeigen Reninimmunreaktivität (hier rot dargestellt) in Wildtypmäusen am E16 und E18, sowohl in größeren Gefäßen als auch in afferenten Arteriolen (hier grün dargestellt) sowie postpartal und im adulten Zustand nur in afferenten Arteriolen, während die $Gs_{\alpha}/-$ Nieren in jedem Stadium reninfrei sind.

Zusammengefasst startet die intrarenale Reningenexpression in Wildtypmäusen im frühen metanephridischen Stadium mit einzelnen reninexprimierenden Zellen in den distalen Bereichen arcuater Arterien. Von diesem Startpunkt breitet sie sich entlang der arcuaten Seitenäste, aber auch zu den proximalen Bereichen Aa. arcuatae aus. Während diese in den Wildtypnieren zeitweise komplett mit reninbildenden Zellen bedeckt zu sein scheinen, ist in $RC-Gs_{\alpha}/-$ Nieren in diesen Gefäßabschnitten zu keinem Zeitpunkt der Nierenentwicklung eine Reninexpression zu sehen. Vereinzelt reninpositive Zellen konnten in abzweigenden afferenten Arteriolen beobachtet werden.

4.3. Untersuchungen im β_1/β_2 -Adrenozeptor-Knockout

4.3.1. 3D-Modelle der Reninverteilung während der Nierenentwicklung

Nachdem sich gezeigt hat, dass die Reninexpression während der Entwicklung ohne rezeptorvermittelte Aktivierung der Adenylatzyklen faktisch zum Erliegen kommt, gilt es zu klären, welcher oder welche Gs-gekoppelten Rezeptoren als Induktor des cAMP-Signalwegs an dieser Stelle in Betracht kommen. Neben dem Prostaglandin-signalweg, mit den EP_2 , EP_4 - und IP-Rezeptoren stellt das sympathische Nervensystem in der adulten Niere einen wichtigen Gs-abhängigen Stimulator des RAAS dar. Nachdem COX-2 in der embryonalen Niere nur schwach exprimiert wird, die renale sympathische Innervierung über β_1 -Adrenozeptoren aber direkt an der reninbildenden Zelle erfolgt, wurde die Entwicklung der Reninexpression an Mäusen mit doppelter Deletion für den β_1 - und den β_2 -Adrenozeptor analysiert. Der Doppelknockout wurde zur Vermeidung einer möglichen kompensatorischen Hochregulation des β_2 -Rezeptors

herangezogen. Die Durchführung der Versuche erfolgte nach der bereits beschriebenen Vorgehensweise.

Embryonaltag 16

Wie bereits beschrieben ist am E16 die A. renalis in zwei Interlobararterien aufgeteilt, von denen bogenförmig die arcuaten Hauptstämme abgehen. Von diesen Hauptstämmen zweigen arcuate Seitenäste und afferente Arteriolen ab. Aus den arcuaten Seitenästen entspringen erste Interlobulararterien und ebenfalls afferente Arteriolen. Desweiteren bilden sich aus den Interlobulararterien afferente Arteriolen. Zwischen Wildtyp und β_1/β_2 -Rezeptor defizienten Tieren können keine augenscheinlichen Veränderungen in der Struktur des präglomerulären arteriellen Gefäßbaumes festgestellt werden (Abb. 24, 26).

Die Reninexpression im Wildtyp kann in den Gefäßwänden der arcuaten Hauptstämme und zum Teil in den arcuaten Seitenästen in einem diskontinuierlichen Muster beobachtet werden (Abb. 25).

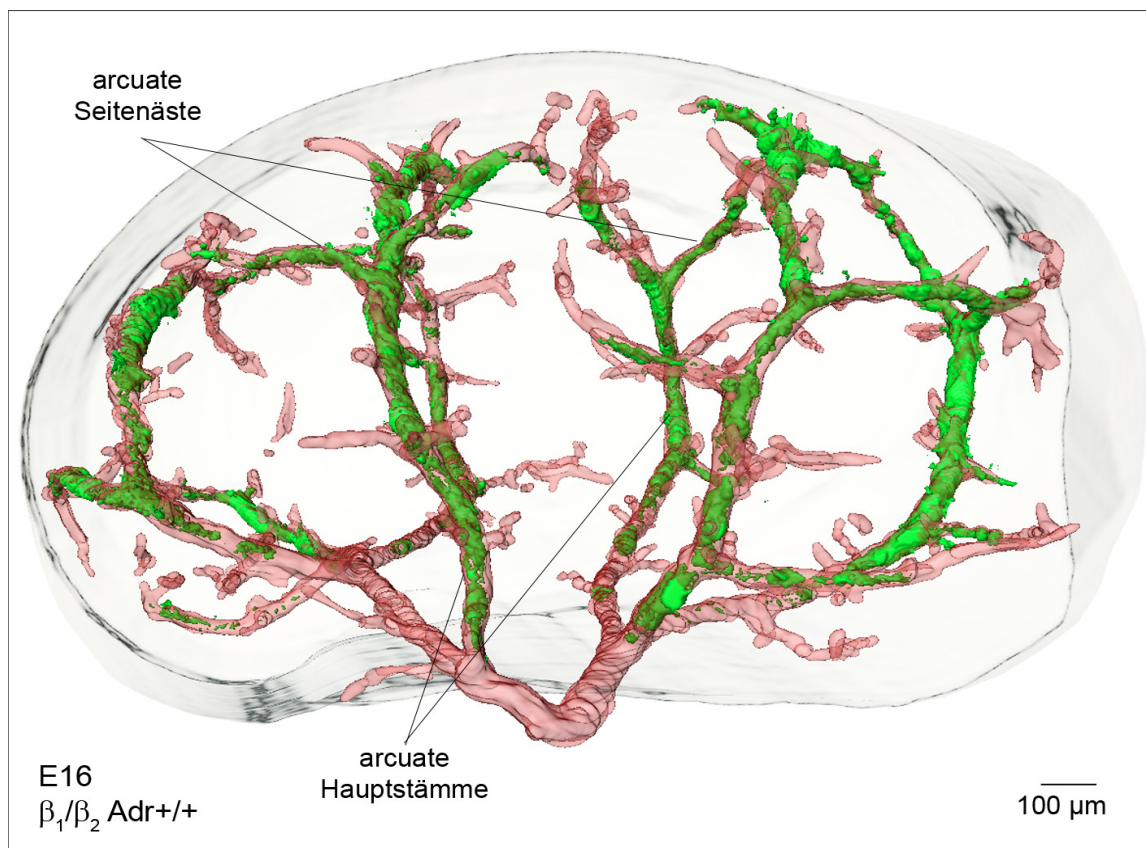


Abb. 24 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am E16 im gesamten Organ.

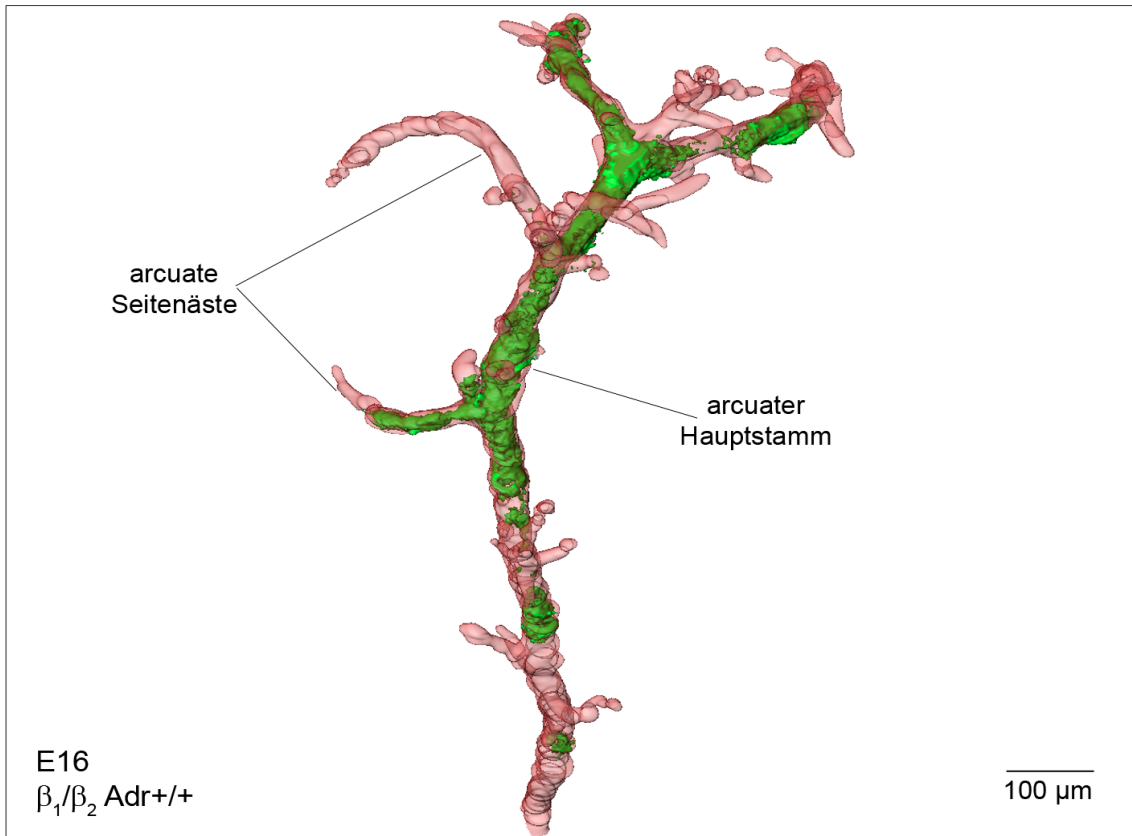


Abb. 25 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am E16 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

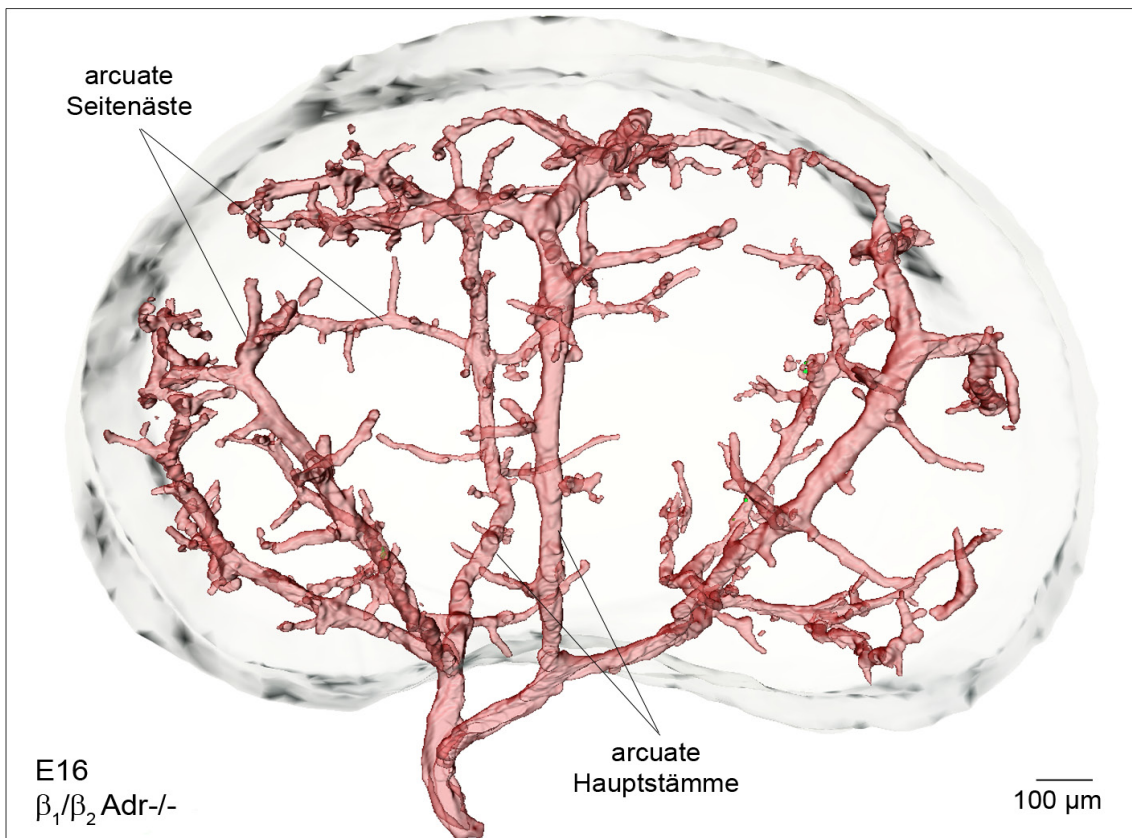


Abb. 26 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am E16 im gesamten Organ.

Nieren von β_1/β_2 -Doppelknockoutmäusen zeigen in diesem frühen Stadium noch keine Reninexpression (Abb. 27). Sowohl die bereits fertig entwickelten größeren Gefäße, wie die A. renalis, die beiden Interlobulararterien oder die arcuaten Hauptäste als auch die sich noch entwickelnden Gefäßabschnitte, wie die arcuaten Seitenäste sind alle reninfrei.

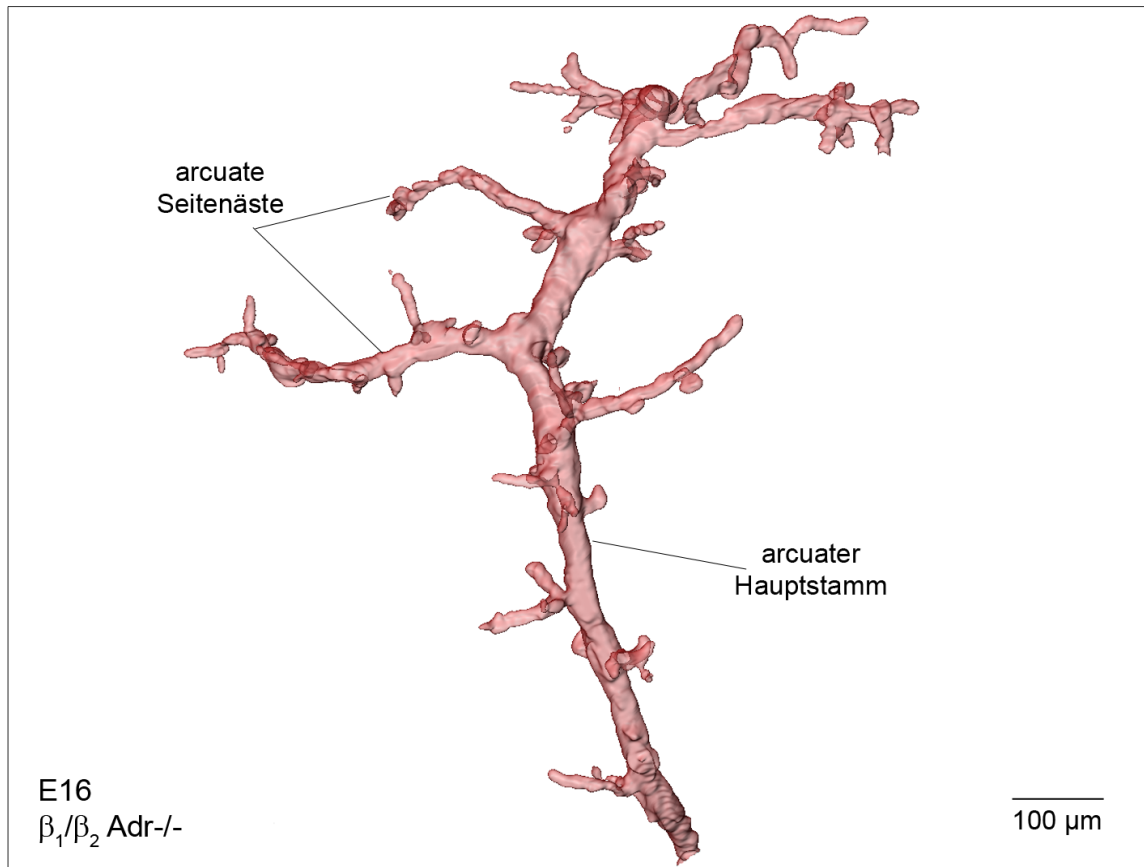


Abb. 27 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am E16 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Embryonaltag 18:

Zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung ist ein hoher Verzweigungsgrad des Gefäßsystems zu verzeichnen. Besonders die arcuaten Seitenäste und Interlobulararterien haben an Anzahl und Länge zugenommen. Der Bauplan ist im Wildtyp und β_1/β_2 -Doppelknockout ähnlich (Abb. 28, 30).

In den proximalen Gefäßabschnitten des Wildtyps ist die Reninexpression weitgehend verschwunden (Abb. 28). In diesem Stadium sind reninbildende Zellen in vielen, aber nicht allen arcuaten Seitenästen, neu aussprossenden Interlobulararterien und afferenten Arteriolen vorzufinden (Abb. 29).

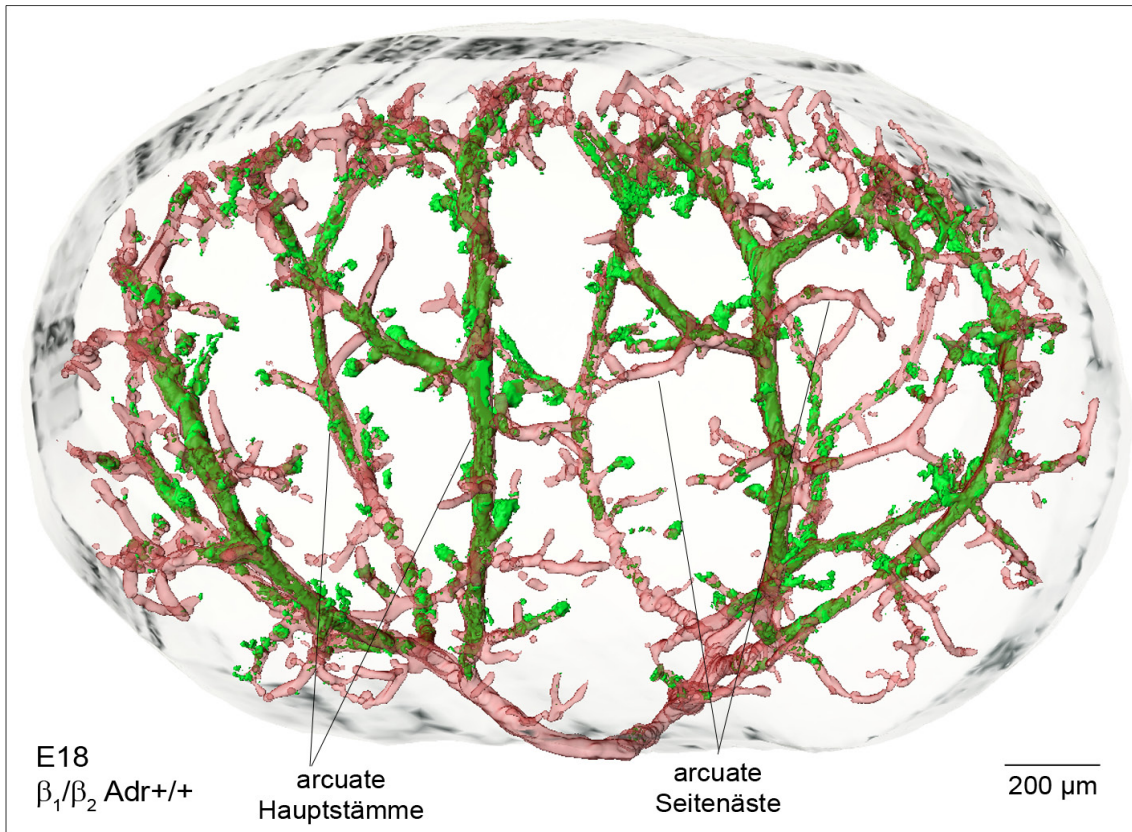


Abb. 28 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am E18 im gesamten Organ.

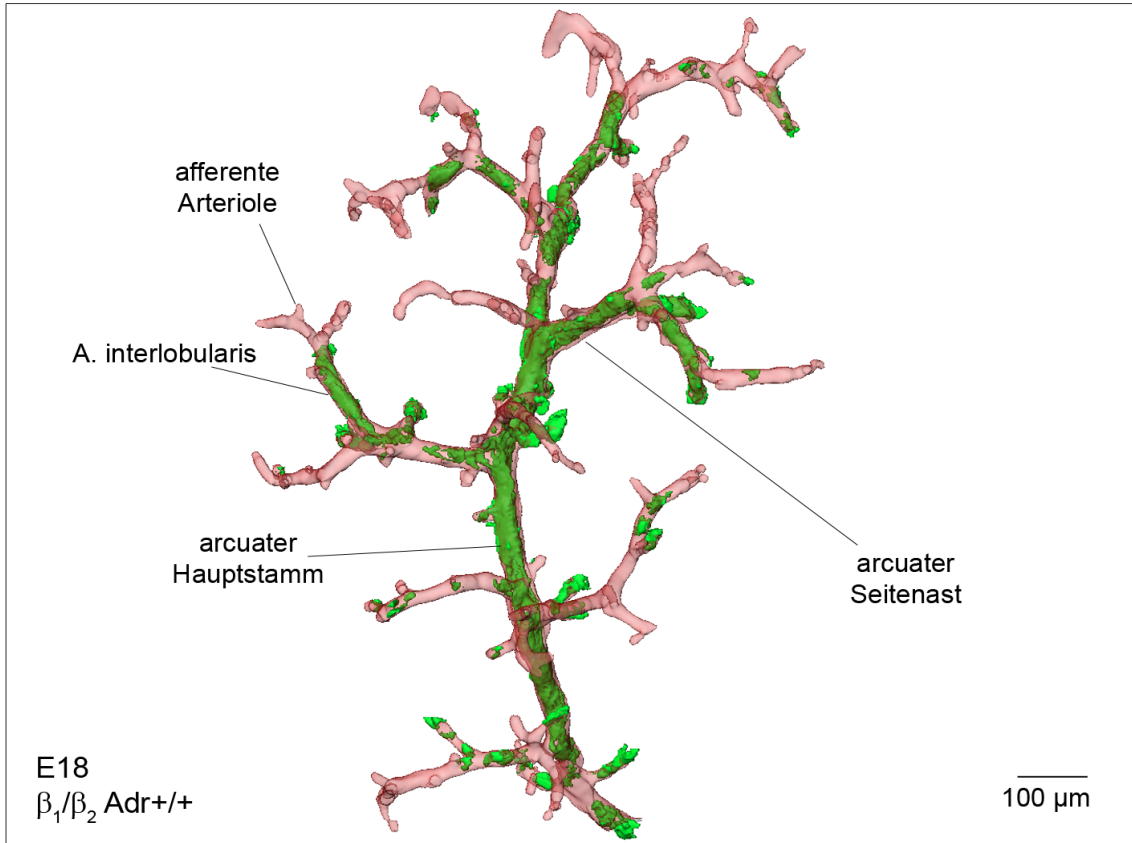


Abb. 29 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am E18 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

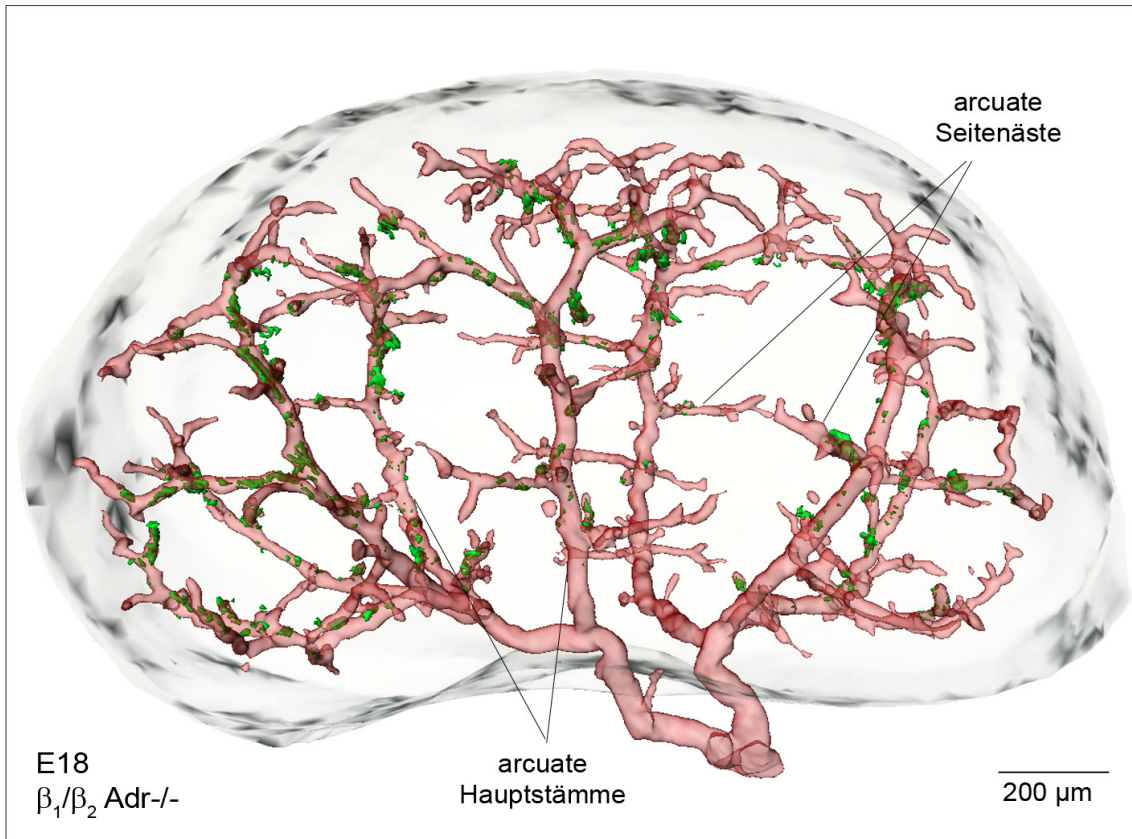


Abb. 30 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am E18 im gesamten Organ.

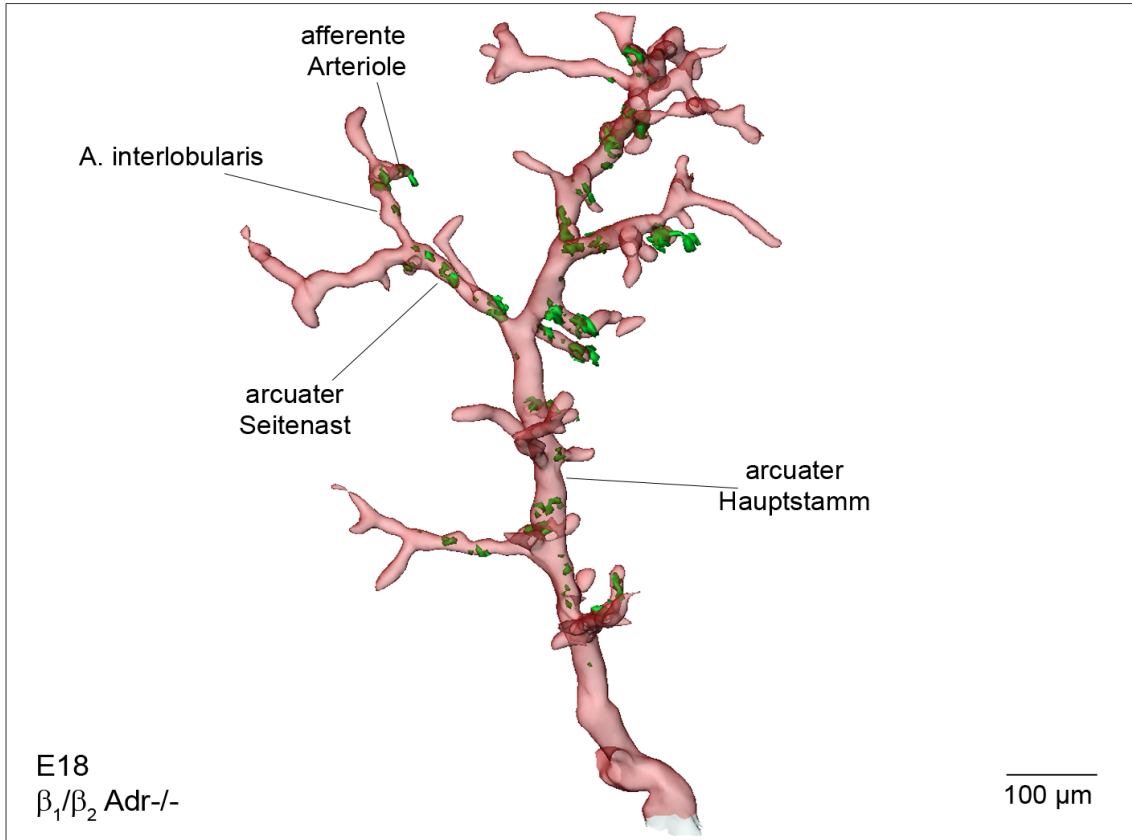


Abb. 31 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am E18 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

In β_1/β_2 Adr $^{-/-}$ Mäusen sind Reninsignale am E18 nachweisbar. Die Expression ist aber im Vergleich zum Wildtyp hinsichtlich ihres Ausmaßes deutlich limitiert und beschränkt sich in erster Linie auf die kleineren Gefäße, obwohl vereinzelte Zellen auch in den arcuaten Haupt- und Seitenästen zu finden sind (Abb. 31).

Postpartaler Tag 1 (pp1):

Bis zum postpartalen Tag 1 setzt sich die bereits beschriebene Aussprossung und Verzweigung der einzelnen Gefäßabschnitte im Wildtyp (Abb. 32) und Knockout (Abb. 33) gleichermaßen fort. Die Reninproduktion ist beim Wildtyp einen Tag nach der Geburt im proximalen Bereich der arcuaten Hauptstämme eingestellt. In dieser Entwicklungsphase findet sich der überwiegende Teil der Reninexpression im Bereich des sich entwickelnden distalen vaskulären Systems, wobei Renin ungleichmäßig und zum Teil am juxtaglomerulären Pol exprimiert wird.

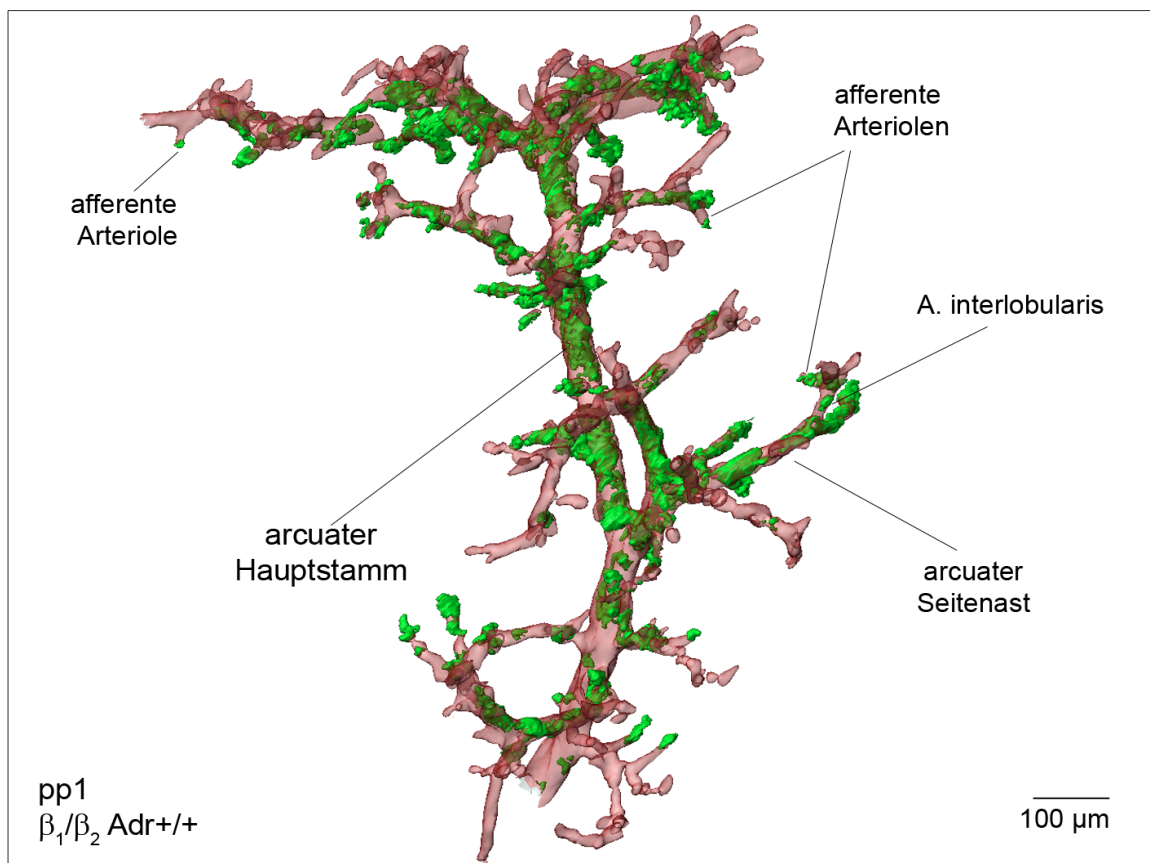


Abb. 32 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am pp1 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Die reninproduzierenden Zellen sind im β_1/β_2 Adr-/- zwar normal, also analog zu Wildtypmäusen verteilt, es sind insgesamt aber deutlich weniger enthalten.

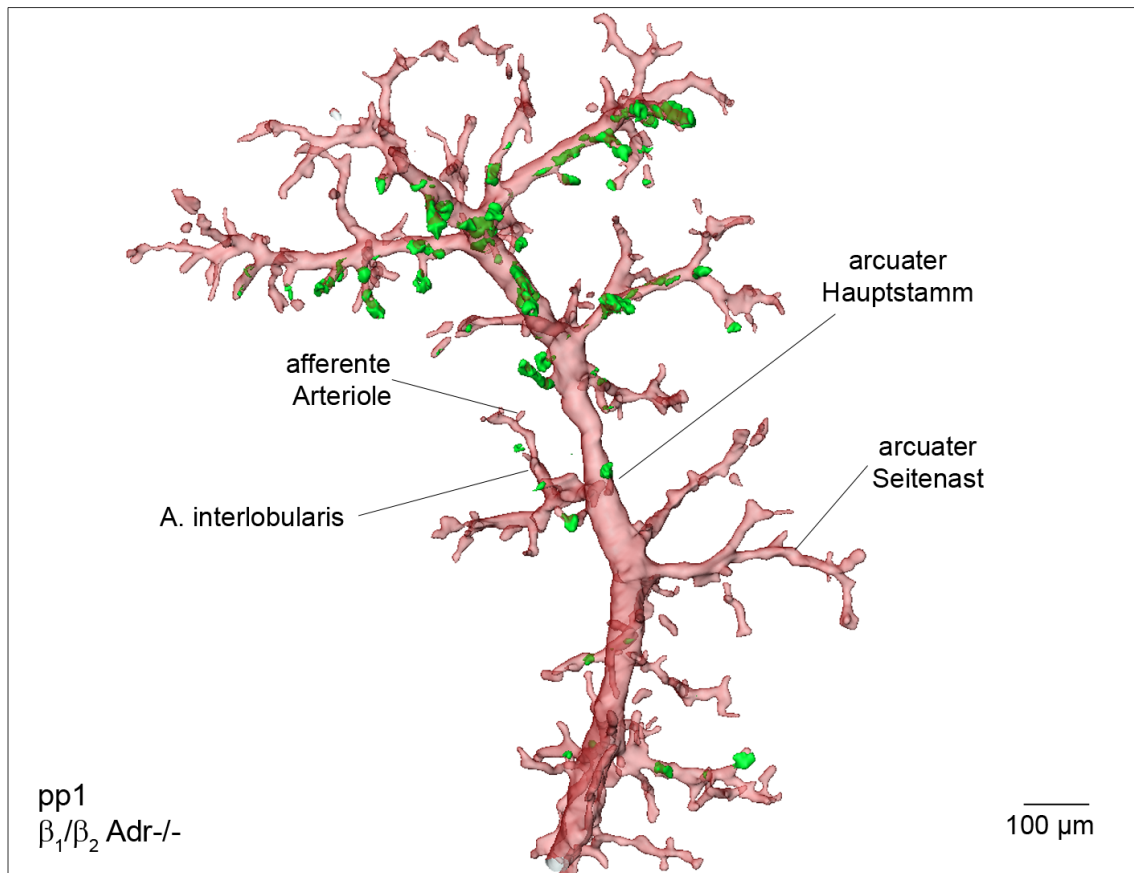


Abb. 33 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am pp1 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Adultzustand:

Im adulten Zustand sind reninbildende Zellen ausschließlich an der klassischen juxtaglomerulären Position, nahe dem vaskulären Pol der Glomeruli, nachzuweisen. Dabei weisen nahezu alle juxtaglomerulären Apparate Reninexpression auf (Abb. 34, 35). An freien Gefäßendigungen (siehe Stern) und in efferenten Arteriolen wurde kein Renin gefunden. Wildtypnieren und Nieren mit β_1/β_2 -Rezeptordefizienz zeigen in Bezug auf die Lokalisation der reninbildenden Zellen keine Unterschiede.

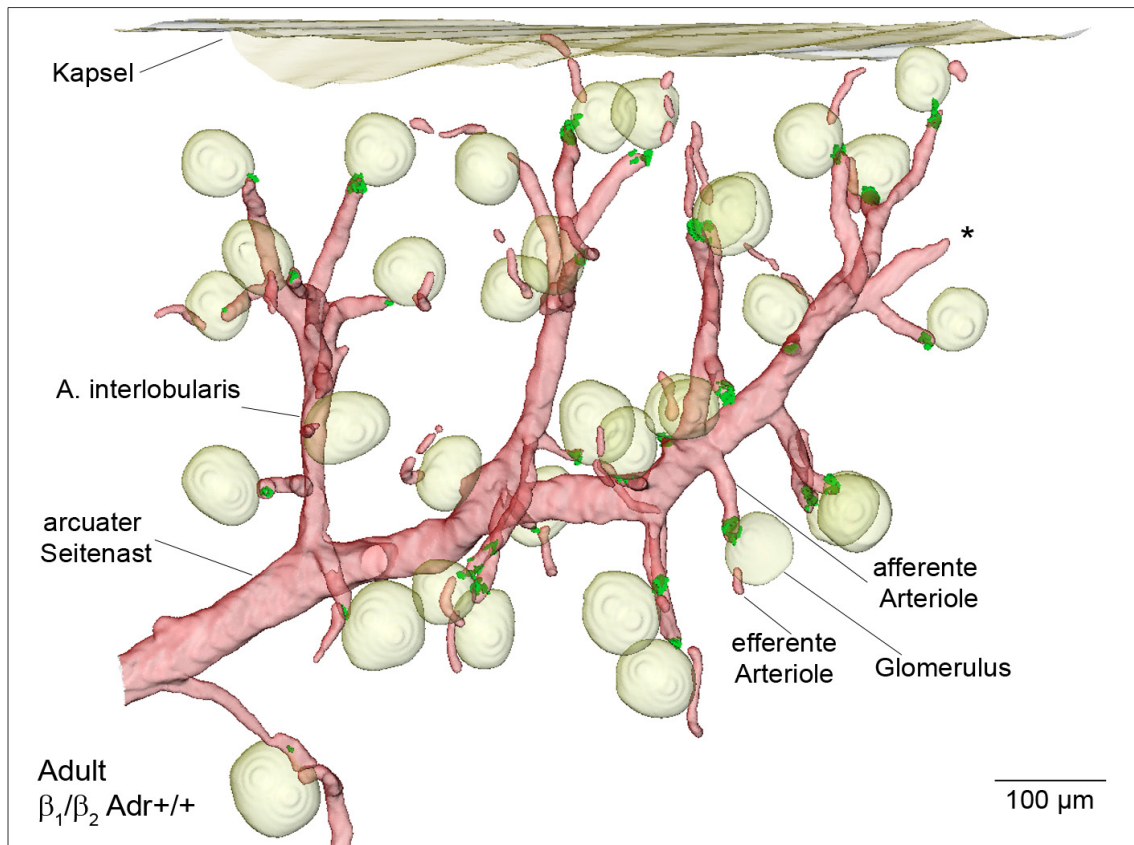


Abb. 34 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im adulten β_1/β_2 -Wildtyp in einem isolierten arcuaten Seitenast.

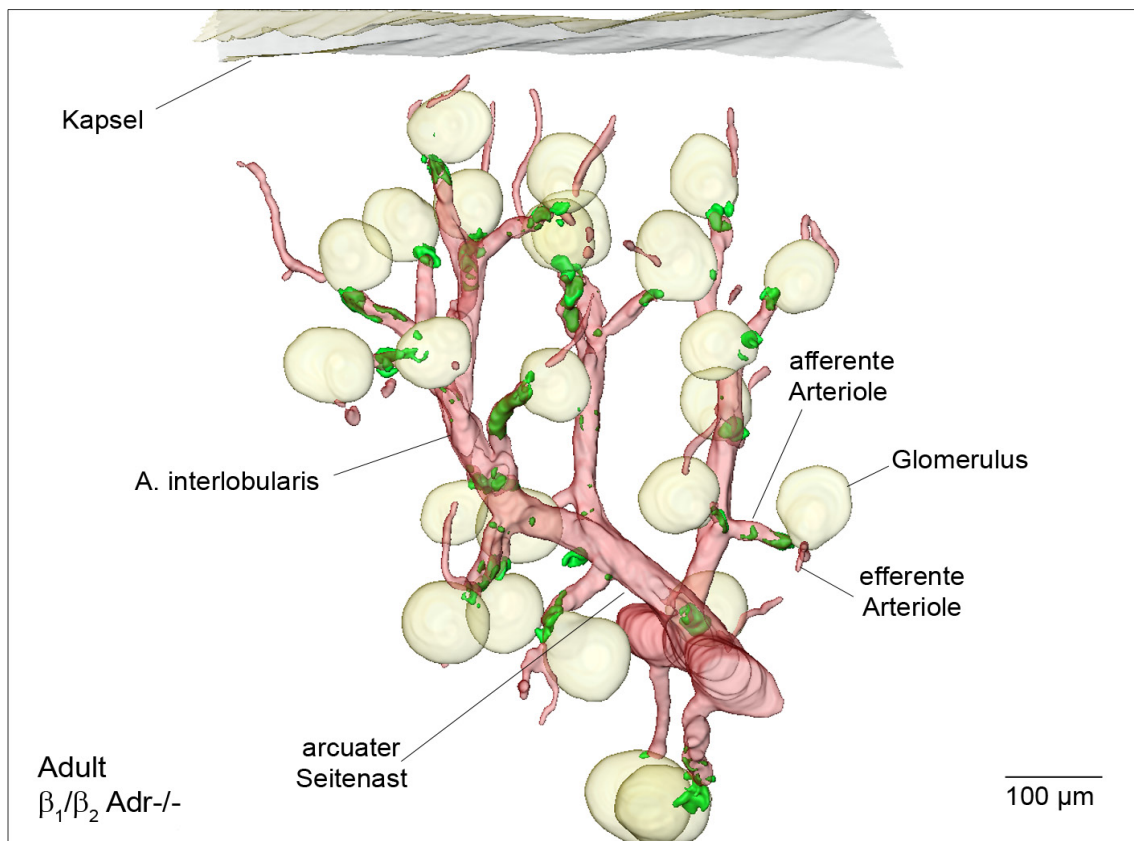


Abb. 35 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im adulten β_1/β_2 -Knockout in einem isolierten arcuaten Seitenast.

In der Architektur des präglomerulären arteriellen Gefäßbaums konnten in keinem der untersuchten Stadien offensichtliche Unterschiede gezeigt werden. Es gab keine erkennbaren strukturellen oder numerischen Veränderungen zwischen den Gefäßbäumen.

4.3.2. Entwicklung der Renin-mRNA Abundanz

Um die bereits gezeigten Unterschiede in der Entwicklung der Reninproduktion von β -Rezeptor defizienten Tieren und Wildtypmäusen zu quantifizieren, wurde die Abundanz der Renin-mRNA ermittelt. Für die Bestimmung wurden Gesamtnieren beider Genotypen der Stadien E15 bis pp10 sowie Adult herangezogen.

Am ersten Messpunkt, dem E15, kann die Renin-mRNA Abundanz in Wildtypnieren im Gegensatz zum Knockout bereits nachgewiesen werden. Sie steigt während der fötalen Nierenentwicklung steil an und erreicht ihren maximalen Wert zum Zeitpunkt der Geburt. Postpartal geht der relative Renin-mRNA Gehalt in ein Plateau über und sinkt kontinuierlich bis zum niedrigsten Wert im adulten Zustand. Im Gegensatz dazu steigt der Renin-mRNA Gehalt in β_1/β_2 Adr-/- Nieren vom E17 bis pp10 kontinuierlich an und sinkt bis zum Adultzustand langsam wieder ab (Abb. 36 oben). In allen Stadien zeigen die Knockoutmäuse niedrigere mRNA-Level als die zugehörigen Wildtypen (Abb. 36 unten). Die Differenz der beiden Kurven zeigt zum Zeitpunkt der Geburt ein Maximum, nimmt aber postpartal mit zunehmendem Lebensalter der Tiere ab. Schließlich sind in adulten Tieren beider Genotypen die Renin-mRNA-Level nahezu gleich.

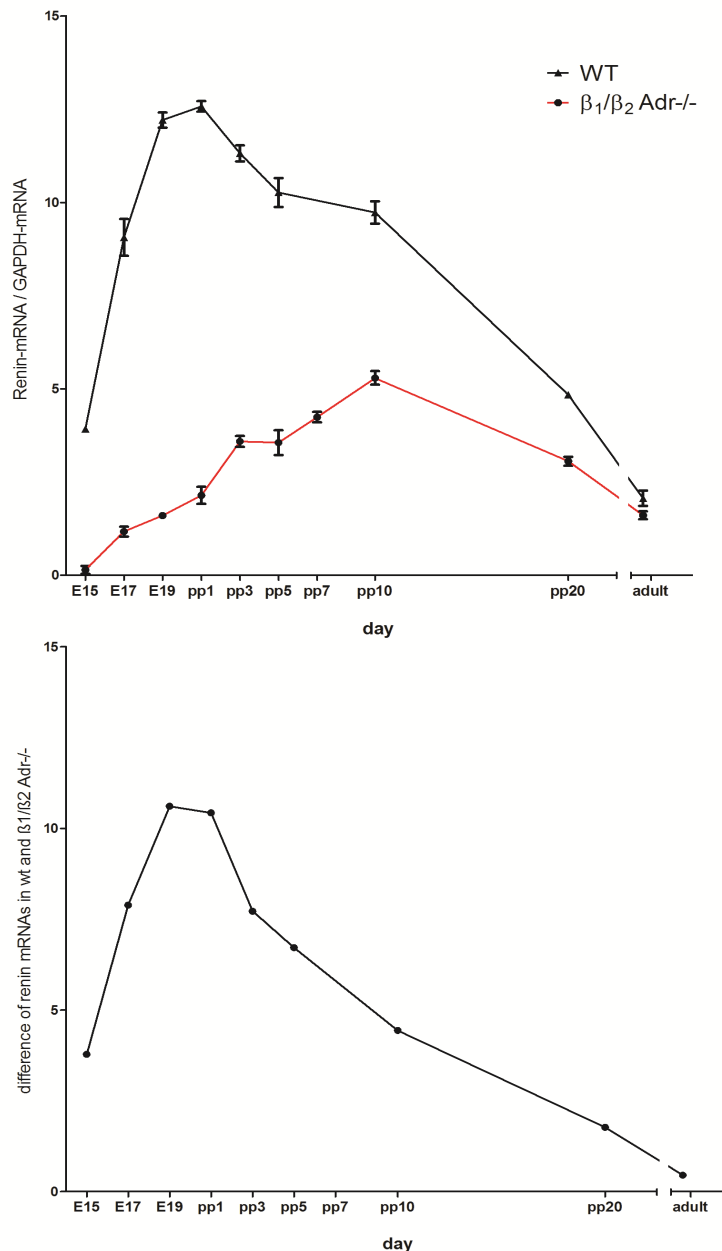


Abb. 36 – oben: Zeitgang der renalen Renin-mRNA in β_1/β_2 Adr $^{-/-}$ und Wildtypmäusen während der Nierenentwicklung. Die Darstellung basiert auf Mittelwerten von 5-7 Nieren pro Stadium und Genotyp \pm SEM. unten: Differenz WT minus β_1/β_2 Adr $^{-/-}$ mRNA. (Neubauer et al., 2009)

4.3.3. Rekrutierung reninbildender Zellen in der adulten Niere

Sympathische Nerven gelten als Kardinalstimulatoren für das Reninsystem. Entsprechend stellte sich die Frage, ob die renale Innervierung über β_1 -Rezeptoren die Rekrutierung reninbildender Zellen in der adulten Niere beeinflussen kann. Die Anwendung von chronischen Stimulationsmanövern, wie Nidrigsalzdiät in Kombi-

nation mit dem ACE-Inhibitor Enalapril, in β_1/β_2 -Doppelknockoutmäusen sollte die Rolle des Sympathikus in diesem Zusammenhang konkretisieren.

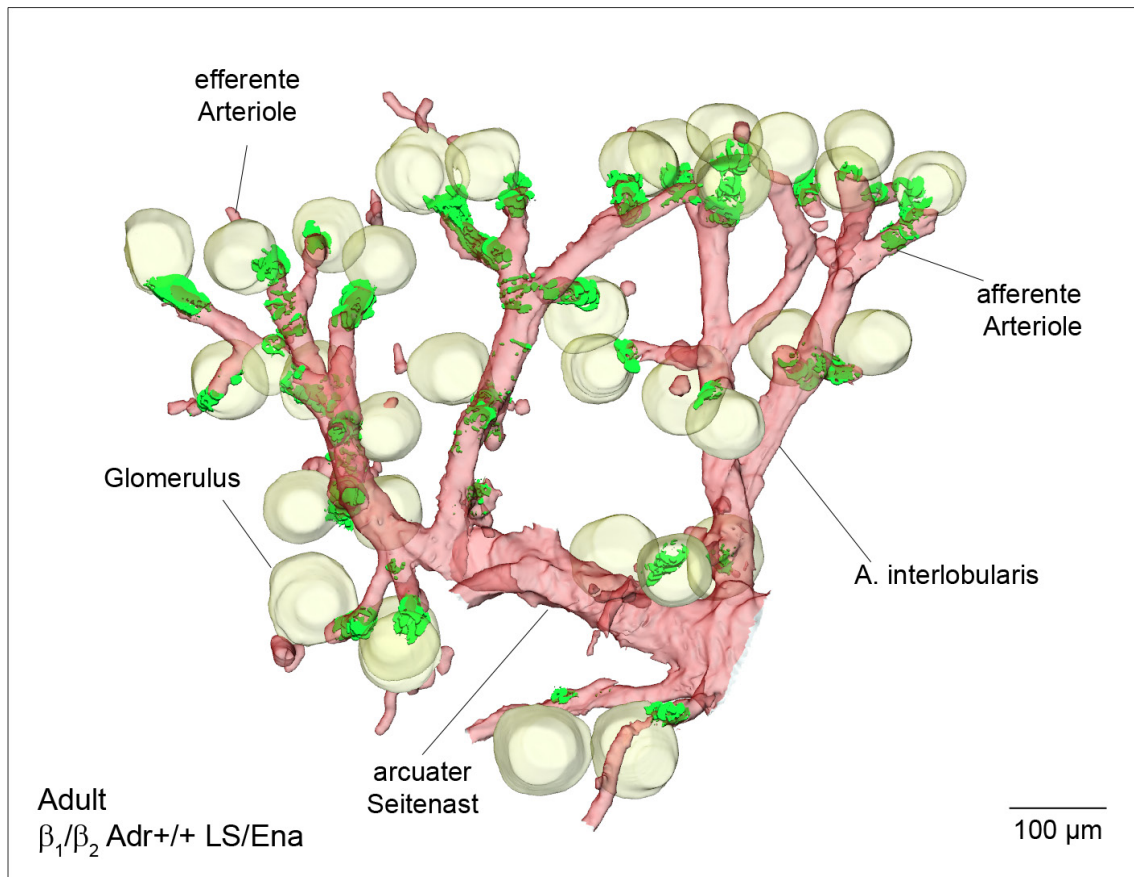


Abb. 37 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität in einem Niedrigsalz/Enalapril stimulierten adulten Wildtyp.

In analoger Vorgehensweise zu den ontogenetischen Betrachtungen sollte das Reninverteilungsmuster nach chronischer Stimulation in der adulten Niere der Wildtyp- und der β_1/β_2 -defizienten Maus untersucht werden. Wie in Abbildung 37 zu sehen, erfolgt im Wildtyp eine Rekrutierung der Reninzellen beginnend von den terminalen Gefäßenden der Glomeruli in einem diskontinuierlichen Muster. In einigen afferenten Arteriolen wird Renin auf der gesamten Länge exprimiert.

In β_1/β_2 -defizienten Mäusen konnte ebenfalls eine retrograde Reninsynthese entlang der Wand der präglomerulären Gefäße beobachtet werden, die mit einer Erhöhung der Anzahl reninbildender Zellen einhergeht (Abb. 38). Auch findet man keinen Unterschied in der Position der Reninzellen zwischen β_1/β_2 -Doppelknockout und Wildtyp.

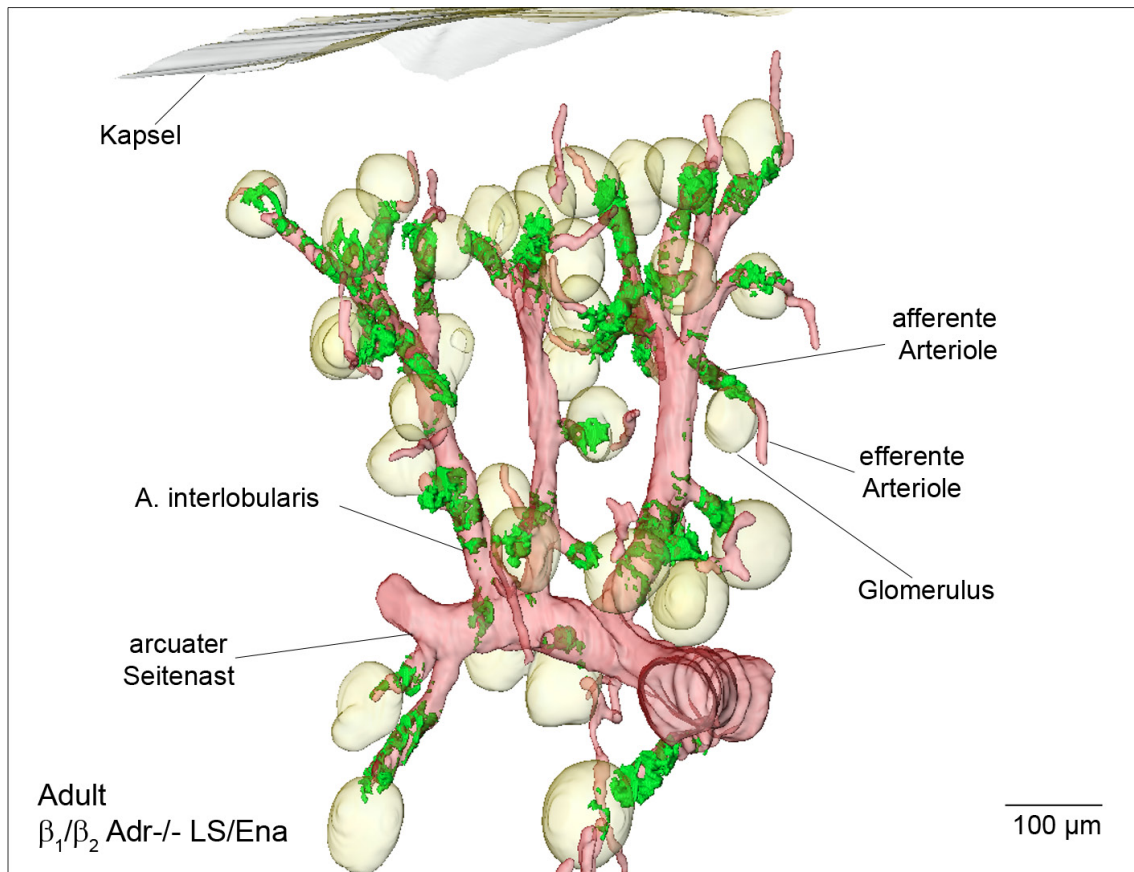


Abb. 38 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität in einem Nierensalz/Enalapril stimulierten adulten β_1/β_2 -Knockout.

4.3.4. Immunhistochemischer Nachweis der Innervierung reninbildender Zellen

Da ein direkter Nachweis von β_1 -Adrenozeptoren mangels verfügbarer Antikörper nicht möglich war, wurde die Tyrosinhydroxylase (TH) als Schlüsselenzym der Noradrenalin synthese zum Nachweis der sympathischen Innervierung renin-exprimierender Zellen herangezogen. Es wurden in Wildtypnieren Immunfluoreszenz-tripelfärbungen der Tyrosinhydroxylase (rot), Renin (grün) und Glattmuskelaktin (blau) durchgeführt. Abbildung 39 zeigt in allen untersuchten Stadien der Nierenentwicklung eine perivaskuläre Expression der TH. Bereits in den frühen fötalen Stadien E16 und E18 stehen reninbildende Zellen in der Media größerer renaler Gefäße in engem Kontakt mit den sympathischen Nervenfasern (siehe Pfeile). Auch die in afferenten Arteriolen lokalisierten reninbildenden Zellen des postpartalen und adulten Entwicklungszustands weisen diese benachbarte Lokalisation auf.

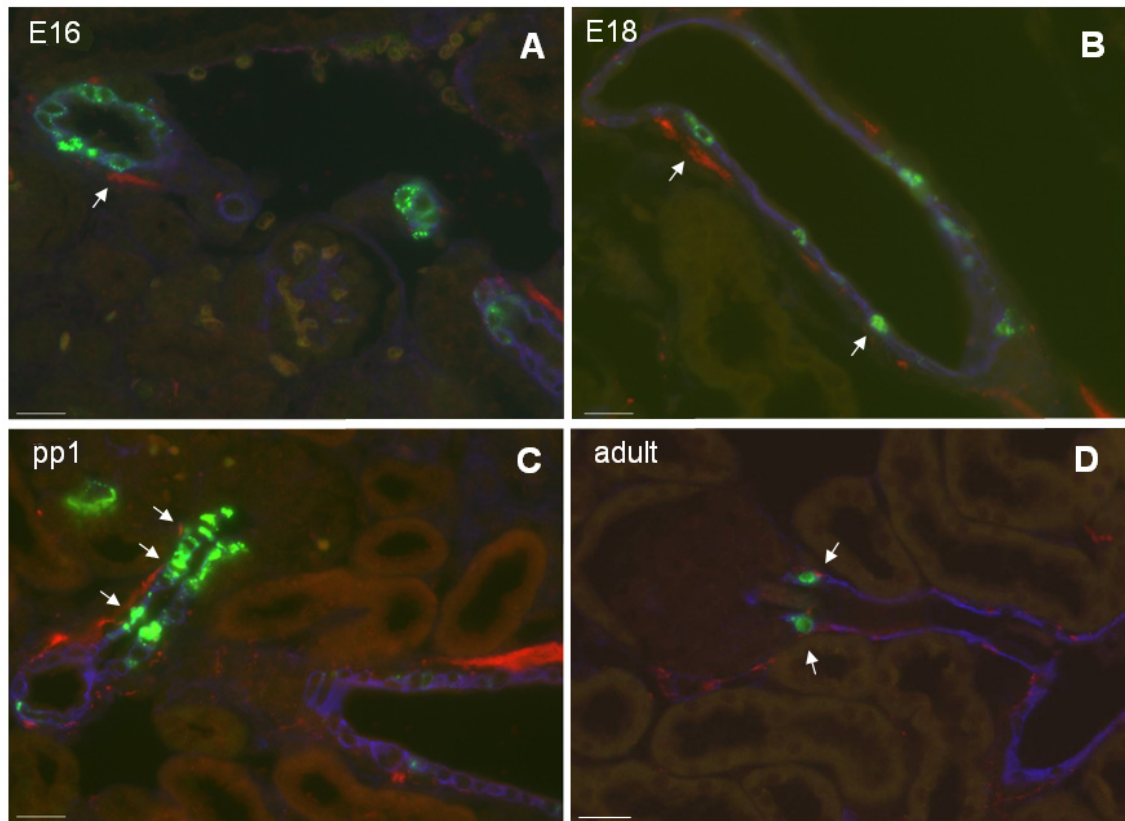


Abb. 39 - Immunfluoreszenztripelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren der Stadien E16, E18, pp1 und Adult. Immunreaktionen der Tyrosinhydroxylase sind rot, Renin grün und Glattmuskelaktin blau dargestellt. Vergrößerung 400x. Die Maßstabsbalken entsprechen 20µm.

5. Diskussion

5.1. Die ontogenetische Reninexpression der Mausniere

Die Herkunft der reninbildenden Zellen und das ontogenetische Expressionsmuster von Renin war in der Vergangenheit Ziel diverser Studien. In verschiedenen Ursprungshypothesen wurde diskutiert, ob sich Reninzellen als eigenständige Zellpopulation entwickeln (Sequeira-Lopez et al., 2001), ob sie ohne nierenspezifischen Induktor in der Gefäßwand entstehen (Fuchs et al., 2002), oder ob sie zusammen mit den Glattmuskelzellen aus einem gemeinsamen Vorläuferzelltyp hervorgehen (Sequeira-Lopez et al., 2001 und 2004). Das Expressionsmuster wurde basierend auf der Extrapolation histologischer Befunde 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) aber auch in Maus (Minuth et al., 1981; Jones et al., 1990) und Ratte (Richoux et al., 1987) beschrieben. Allerdings lieferte die Literatur bislang ein eher uneinheitliches Bild bezüglich des Ursprungs der Reninexpression. So wurde die initiale Expression in der Ratte einerseits am E17 in der A. renalis (Pupilli et al., 1990) beobachtet, eine andere Gruppe zeigte aber am E15 in der Gonadenarterie Renin extrarenaler Herkunft (Richoux et al., 1987). Allen Arbeiten gemeinsam ist aber der Bericht von einer Verlagerung der renalen Reninexpression während des fötalen und des frühen postnatalen Lebens von den großen Arterien über die kleinen hin zur klassischen juxtaglomerulären Position im adulten Zustand (Gomez et al., 1986 und 1989; Minuth et al., 1981). Dieses zentrifugale Ausbreitungsmuster wurde auch auf mRNA-Ebene durch in situ Hybridisierungen bestätigt (Gomez et al., 1989). Zur exakten Visualisierung der ontogenetischen Reninverteilung in der Maus wurde in dieser Arbeit die computergestützte dreidimensionale Rekonstruktion aus histologischen Schnittserien eingesetzt. Die Färbung der Folgeschnitte basiert auf etablierten Antikörpern für Renin und den arteriellen Gefäßmarker α -Glattmuskelaktin (Machura et al., 2009). Das so gewonnene Wissen aus der Wildtypentwicklung soll als Basis für die Untersuchung verschiedener Knockoutmodelle dienen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen erste punktuelle Reninexpression in distalen arcuaten Hauptstämmen (vgl. Abb. 6c). Beobachtungen von Gomez et al.

(1989) über die initiale Reninexpression in der A. renalis konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Von diesem Startpunkt breitet sich Renin zunächst retrograd zum Ursprung der arcuaten Hauptstämme, dann aber über die gesamte Länge, inklusiv der transversalen Seitenäste aus. (vgl. Abb. 6c-h) In der Folge zieht sich die Expression über die Aa. interlobulares auf die klassische juxtaglomeruläre Position der Vasa afferentia zurück (vgl. Abb. 7a-f). Auffällig ist dabei das diskontinuierliche Muster der Reninproduktion entlang der renalen Gefäße. Diese deutliche Heterogenität wird durch Reddi et al. (1998) bestätigt. Die zentrifugale Ausbreitung der Reninexpression (Gomez et al., 1989) konnte hier ebenso belegt werden, wie die Befunde von Jones et al. (1990) und Kon et al. (1998), dass Renin erstmalig am E15 erscheint. Bei derartigen Zeitangaben sollte aber immer berücksichtigt werden, dass der Zeitpunkt der Gestation des Muttertieres nur schwer zu bestimmen ist und eventuell deshalb in der Literatur verschiedene Werte zu finden sind. Auch eine unterschiedliche intrauterine Versorgung der Föten innerhalb eines Wurfs könnte zu Abweichungen in der Größe oder leicht verzögerten Reifungsprozessen führen.

Konträr zu anderen Berichten (Liu und Ballermann, 1998; Richoux et al., 1987; Sequeira Lopez et al., 2004) konnten wir die Reninexpression ausschließlich mit glattem Muskel-aktin positiven, also arteriellen Gefäßen assoziiert beobachten.

5.2. Die Reninentwicklung in Abwesenheit rezeptoraktivierter cAMP-Produktion

Es gilt als gesichert, dass der second messenger cAMP auf zellulärer Ebene den wichtigsten Regulator der renalen gefäßassoziierten Reninexpression im adulten Individuum darstellt (Hackenthal und Taugner, 1986). Die Höhe der intrazellulären cAMP-Spiegel hängt dabei generell von dem Zusammenspiel aus cAMP produzierenden Adenylatzyklen und cAMP hydrolysierenden Phosphodiesterasen ab. Obwohl noch nicht alle Details der Signalkaskade aufgeklärt sind, die zu einer regulierten Reninfreisetzung führen, wurde gezeigt, dass diverse Elemente der positiven Reninregulation eine Aktivitätssteigerung der Adenylatzyklen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren bewirken. Die Kopplung mit dem stimulierenden G-Protein G_s wurde zum Beispiel für die auf JG-Zellen exprimierte Rezeptoren für

Prostaglandin E_2 (Friis et al., 2005) oder den β_1 -adrenergen Rezeptoren des sympathischen Nervensystems nachgewiesen. Vor kurzem zeigten Chen et al. (2007) an der adulten $G_{s\alpha}$ -Knockoutmaus eine Verminderung der Renin mRNA um 75% gegenüber dem Wildtyp. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die cAMP-Signalkaskade für das Anschalten der Reninexpression während der Nierenentwicklung relevant ist. Als geeignetes Tiermodell wurde die JG-zellspezifische $G_{s\alpha}$ -Knockoutmaus gewählt. Alle untersuchten Tiere waren vom Genotyp RCFF, das heißt, die Mäuse trugen ein Ren-1^d Allel (R), ein Allel für die Cre-Rekombinase (C) und zwei gefloxt Allele für $G_{s\alpha}$ (FF). Somit wird bei der Aktivierung des Ren-1^d Promotors von einem Allel Renin exprimiert und vom anderen die Cre-Rekombinase, die das loxP flankierte erste Exon des $G_{s\alpha}$ kodierenden Gnas-Gens ausschneidet (Chen et al. 2007). $G_{s\alpha}$ ist nur eines von verschiedenen Produkten des Gnas-Gens, aber die Mutation von E1 zerstört $G_{s\alpha}$, ohne die anderen Spliceformen zu beeinträchtigen (Chen et al., 2005; Sakamoto et al., 2005). Für die Experimente wurden Knockout- und Wildtypiere der Stadien E16, E18, pp1 und Adult gewählt. Die Auswahl der Stadien erfolgte anhand von Erfahrungswerten, in denen während der Nephrogenese die deutlichsten Änderungen der Reninexpression auftreten (Sauter et al., 2008).

Die Ergebnisse der Studie zeigen zunächst, dass die reninzellspezifische Deletion von $G_{s\alpha}$, dem Bindeglied zwischen Membranrezeptoren und Aktivierung der Adenylatzyklaseaktivität mit einem nahezu vollständigen Verlust der Reninexpression in allen Stadien der wachsenden und auch in der adulten Mausniere einhergeht. Die cAMP/PKA Signalkaskade scheint also von entscheidender Relevanz für das initiale Auftreten der Reninexpression in den großen renalen Gefäßen zu sein. Es ist außerdem vorstellbar, dass der Signalweg für die typische Verlagerung der Reninproduktion zu den juxtaglomerulären Bereichen der afferenten Arteriolen verantwortlich ist. Unsere Ergebnisse zeigen zwar, dass extrazelluläre Liganden, deren Signalweg das Gs-Protein beinhaltet, für das charakteristische zeitlich-räumliche Verteilungsmuster der Reninexpression während der Nephrogenese verantwortlich sind, aber die Natur dieser Liganden ist bislang ungeklärt. Wie erwähnt, zeigen Katecholamine einen deutlichen Effekt auf die Produktion und Sekretion des Renins unter Einbezug der Gs-gekoppelten β_1 -Adrenozeptoren der JG-Zellen (Churchill et al., 1983; Holmer et al., 1997; Kim et al.,

2007). Eine Studie von Liu et al. (2005) belegt, dass β -adrenerge Rezeptoren in der wachsenden Niere bereits früh exprimiert werden. Eine andere denkbare Möglichkeit den cAMP/PKA-Signalweg zu stimulieren, bezieht die Produkte der Cyclooxygenase 2 (COX-2) ein. Das signalling über die ebenfalls Gs-gekoppelten EP₂-, EP₄- und Prostacyclinrezeptoren der JG-Zellen stellt in der adulten Niere einen weiteren wichtigen Regulator der Reninproduktion dar (Cheng et al., 2001; Harding et al., 2001; Kim et al., 2007). Im ausgewachsenen Tier werden stimulierende Effekte, wie eine niedrige Salzbelastung des distalen Tubulus, als Folge verminderter oraler Salzaufnahme oder reduzierten Perfusionsdrucks von Macula Densa Zellen vermittelt (Komhoff et al., 2000). Die Zellen entlassen basolateral COX-2 abhängige Prostanoiden (Peti-Peterdi et al., 2003) und aktivieren so die Gs-gekoppelten Rezeptoren der JG-Zellen. Dieser Mechanismus ist aber zur initialen Aktivierung der Reninexpression während der Nierenentwicklung weniger wahrscheinlich, da Messungen zeigen, dass die renale COX-2 Expression embryonal sehr niedrig ist und erst postpartal sprunghaft ansteigt (Zhang et al. 1997, Stubbe et al. 2003).

Ein weiterer Faktor, der die embryonale Reninexpression in dem gewählten Versuchsmodell möglicherweise beeinflusst ist die heterozygote Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen Reninpromotors und der damit einhergehende Verlust eines Ren1^d-Allels. Die Charakterisierung der verschiedenen Genotypen ergab aber, dass die Plasmapreninspiegel von Ren/Ren und Ren/Cre-Tieren nahezu gleich sind und lediglich im Cre/Cre-Typus, der einen homozygoten Reninknockout darstellt, signifikant abfällt (Chen et al., 2007). Die Gs_α-Knockoutmaus besitzt neben der Ren/Cre-Kombination auch zwei Kopien des Ren2-Allels. Allerdings wurde in der Literatur gezeigt, dass sogar in Mausstämmen ohne die Ren2 Genverdoppelung das Fehlen eines Ren1^c-Allels keine phänotypischen Auswirkungen hat (Sequeira et al., 2001). Zusätzlich wiesen Chen et al. (2007) nach, dass die heterozygote Ren1^d getriebene Expression der Cre-Rekombinase genügend enzymatische Aktivität generiert, die geflochten Gs_α-Allele auszuschneiden.

Die reninzellspezifische Deletion von Gs_α hat schwere Auswirkungen auf die Reninexpression und deren zeitlich-räumlichen Verlauf. Neben dem nahezu vollständigen Verlust von Renin in allen Stadien der Gs_α-Knockouttiere, weisen diese Nieren im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte Anzahl und eine Verkürzung

afferenter Arteriolen auf. Diese Beobachtung ist konform mit Studien, die eine Assoziation der embryonalen Reninverteilung mit dem Verzweigungsgrad des renalen Gefäßbaums belegen (Reddi et al., 1998). Darüber hinaus ist die Rolle des Reninsystems für die Nierenentwicklung unbestritten. So wurde in verschiedenen pharmakologischen Studien und an Knockoutmodellen belegt, dass die RAAS-Kaskade außer zur Vaskularisierung der Niere auch zu einer korrekten Ausprägung der Nierenmorphologie beiträgt. Die pharmakologische Unterbrechung des RAAS, beispielsweise durch AT₁-Antagonisten oder ACE-Inhibitoren während der neonatalen Entwicklungsphase führt persistent zu einer drastisch reduzierten Zahl an Glomeruli und einer deutlichen Atrophie des Nierenbeckens und der tubulären Strukturen (Tufro-McReddie et al., 1995; Gomez und Norwood, 1995). Aus diesen Schäden resultiert neben einem Konzentrationsdefekt auch eine Hypertonie im adulten Tier (Woods et al., 1998). An Tiermodellen mit unterbrochener RAAS-Kaskade (Atg^{-/-}, ACE^{-/-}) wurden die selben Veränderungen beschrieben (Nagata et al., 1996; Esther et al., 1996; Tsuchida et al., 1998; Oliverio et al., 1998; Matsusaka et al., 2002). Diese strukturellen Anomalitäten entstehen postpartal, einem Zeitraum in dem das Gefäßsystem der Mausniere stark wächst (Machura et al., 2009). Die Gs_α-Knockoutmaus erweist sich in dieser Hinsicht als praktisch unauffällig. Der Grund dafür könnte zum einen in der niedrigen, aber dennoch vorhandenen Restexpression des Renins liegen, von der Chen et al. (2007) berichteten (vgl. Abb. 11, 15). Zum anderen bleibt zu bedenken, dass die RC-Gs_α^{-/-} Maus das konstitutiv exprimierte Ren-2 Gen trägt. Somit ist in den Tieren stets ein Rest an zirkulierendem (Pro)-Renin vorhanden. Ebenso würde eine mögliche renale, aber extravaskuläre Reninexpression im proximalen Tubulus oder dem Sammelrohr (Taugner et al., 1979 und 1982) zu der beobachteten Abschwächung des Phänotyps beitragen. Auch die von Johannessen et al. (1990) beschriebene extrarenale Reninexpression muss in Betracht gezogen werden. So konnte sogar in bilateral nephrektomierten Tieren eine messbare Menge an Renin detektiert werden.

Die Abwesenheit von Renin in der Zeitspanne, in der im Wildtyp die erste Reninexpression gezeigt werden kann (vgl. Abb. 10), deutet darauf hin, dass ein Gs-Protein abhängiger Mechanismus entweder für die Aktivierung des Renin Promotors, zumindest aber für die Aufrechterhaltung der Promotoraktivität während der Embryogenese verantwortlich ist. Es ist vorstellbar, dass der Reninpromotor, der

Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren trägt, cAMP-unabhängig aktiviert wird. So konnte gezeigt werden, dass für die homöotischen Faktoren HOX und PBX Consensusmotife im Reninpromotor existieren. Die Mutation dieser Bindestellen führt in Ren-GFP Reportermäusen zu einem Totalverlust der renalen Reninexpression aller Entwicklungsstadien. Die extrarenale Reninexpression des submandibulären Gewebes bleibt dabei unverändert, was darauf hinweist, dass HOX/PBX einen Einfluss auf die Zellspezifität der Reninexpression ausübt (Glenn et al., 2008). Auch CBF1, der nukleäre Effektor der Notch-Signalkaskade bindet an ein DNA-Motif des proximalen Reninpromotors und wurde kürzlich als Interaktionspartner von HOX/PBX identifiziert (Pan et al., 2005). Sowohl das Notch-System als auch die HOX-Proteine sind für ihre Beteiligung an der Steuerung verschiedenster Gene während der Morphogenese bekannt (Wehner und Gehring, 2007). Auch für den während der Entwicklung aktiven Transkriptionsfaktor Ets-1 ist die Interaktion mit dem Reninpromotor belegt (Pan et al., 2005).

Eine solche cAMP-unabhängige Initiierung der Reninexpression würde in den RC-Gs $_{\alpha}$ -/- Tieren zur Cre-Expression führen und hätte so das Abschalten der cAMP-Signalkette durch die Gs $_{\alpha}$ -Deletion zur Folge. In diesem Fall wäre cAMP zwar essentiell für die Aufrechterhaltung, nicht aber für den Start der Reninexpression.

Ein anderer denkbarer Weg wäre, dass die cAMP/PKA-Kaskade neben dem Erhalt tatsächlich auch den Start der Reninexpression über das cAMP response element des Promotors regelt. Eine funktionelle CRE-Sequenz konnte in der Literatur in allen bislang untersuchten Spezies nachgewiesen werden (Klar et al., 2002; Shi et al., 1999). Diese Hypothese unterliegt allerdings der Einschränkung, dass ein Anstieg des cAMP-Spiegels in den zukünftigen reninbildenden Zellen benötigt würde, um die Expression der Cre-Rekombinase bzw. des Renins anzustoßen. Die Voraussetzung dafür wäre die Aktivierung der Adenylatzyklen, was aber ohne das stimulierende Gs-Protein kaum funktionieren sollte. Chen et al. (2007) zeigten, dass in JG-Zellpräparationen von RC-Gs $_{\alpha}$ -/- Tieren praktisch keine native Gs $_{\alpha}$ -DNA mehr vorhanden ist. Die dennoch existierende Reninrestexpression in Abwesenheit des G-Proteins deutet also auf eine cAMP-unabhängige Aktivierung des Promotors während des Nierenwachstums hin. Trotzdem könnte sie von einer möglichen unvollständigen Gs $_{\alpha}$ -Deletion stammen. Auch eine gewisse cAMP-Restproduktion durch G-Protein unabhängige Modulation

von Adenylatzyklasten ist nicht vollkommen auszuschließen. So wurde von den Isoformen AC5 und AC6, die beide in JG-Zellen vorhanden sind (Grünberger et al., 2006; Ortiz-Capisano et al., 2007), eine Gs unabhängige Modulation durch Glykosylierung oder der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen berichtet (Beazely und Watts, 2006). Die kaum vorhandene Reninexpression deutet aber in jedem Fall auf eine nahezu komplette Deletion des $G_{s\alpha}$ -Proteins hin. Das bedeutet, die beginnende Reninexpression war immerhin so stark, dass die Cre-Rekombinase in der Lage war die geflochtenen $G_{s\alpha}$ -Allele auszuschneiden.

Insgesamt zeigt die Betrachtung der embryonalen und postpartalen Reninexpression der reninzellspezifischen $G_{s\alpha}$ -Knockoutmaus, dass rezeptorinduziertes cAMP signalling essentiell für die gefäßassoziierte Reninproduktion während der Nierenentwicklung ist. Ob cAMP dabei als fundamentaler Stimulator oder als Verstärker wirkt, konnte mit diesem Versuchsdesign nicht abschließend geklärt werden. Diese Frage, sowie die Natur und das mögliche Zusammenspiel der Faktoren, die den cAMP/PKA-Signalweg in reninbildenden Zellen der Niere steuern, bleibt zu untersuchen.

5.3. Die Reninentwicklung im β_1/β_2 -Adrenozeptor-Knockout

Nachdem die Unverzichtbarkeit der rezeptorvermittelten Adenylatzyklaseaktivierung für die Entwicklung der Reninexpression gezeigt werden konnte, sollte im letzten Teil der vorliegenden Arbeit die Frage geklärt werden, ob das sympathische Nervensystem als Induktor des cAMP-Signalwegs in der Nephrogenese in Betracht kommt. Die renale sympathische Nervenaktivität (RSNA) stellt in der adulten Niere einen etablierten systemischen Stimulator des Reninsystems dar (Churchill et al., 1983). Es ist auch seit langem bekannt, dass JG-Zellen in engem räumlichen Kontakt mit Varikositäten sympathischer Nervenfasern stehen. In einer Verdickung der Nervenzelle befinden sich zahlreiche synaptische Bläschen, die den Neurotransmitter, im Fall des Sympathikus Noradrenalin, in den Extrazellulärraum freisetzen und damit mehr Zielzellen erreichen als bei direkter synaptischer Reizübertragung. Das sezernierte Noradrenalin aktiviert die Gs-gekoppelten β_1 -Adrenozeptoren, deren Expression auf der Oberfläche von JG-Zellen in verschiedenen Studien bestätigt wurde (Hackenthal et al., 1990; Boivin et al.,

2001). Die Aktivierung durch β_1 -Agonisten oder Katecholamine führt über cAMP zu verstärkter Expression und Sekretion von Renin im adulten Individuum (Holmer et al., 1997). Neben den postsynaptischen β_1 -Rezeptoren scheinen auch präsynaptische β_2 -Rezeptoren beteiligt zu sein, welche die Ausschüttung des Neurotransmitters verstärken (DiBona und Kopp, 1997). Messungen an adulten β_1/β_2 -Adrenozeptor-doppelknockoutmäusen ergaben eine verminderte basale Plasmanreninkonzentration. Dennoch bleibt die Regulierbarkeit nach RAAS-Stimulation durch die Gabe von AT_{1} -Antagonisten oder ACE-Inhibitoren prinzipiell erhalten, die absolute Antwort ist aber relativ zur verminderten PRC niedriger (Kim et al., 2007). Wegen dieser Schlüsselstellung der β -adrenergen Rezeptoren für die sympathikusabhängige Reninproduktion im adulten Tier wurde die β_1/β_2 Adr $-/-$ Maus als geeignetes Modellsystem zur Betrachtung der embryonalen und postpartalen Reninexpression ausgewählt. Der Vorzug der β_1/β_2 -Doppelknockoutmaus gegenüber der einfachen β_1 -Knockoutmaus ist darin zu sehen, dass die mögliche Kompensation der β_1 -Rezeptordefizienz durch den β_2 -Rezeptor ausgeschlossen werden kann. Durch die Charakterisierung des zeitlichen und räumlichen Musters in dieser Maus sollte Aufschluss darüber gewonnen werden, ob die RNAse eine entscheidende Rolle in der Determination der Reninexpression während der Nierenentwicklung spielt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zunächst, dass die Deletion von β_1 - und β_2 -Rezeptoren mit einer Reduktion der Reninexpression während aller Entwicklungsstadien einhergeht. Die deutlichsten Veränderungen findet man in der frühen Phase der Reninentwicklung. Während am E16 die reninbildenden Zellen des Wildtyps über die Gefäßwände der größeren renalen Arterien verteilt sind, kann in den β -Rezeptor defizienten Tieren immunhistochemisch praktisch keine Reninproduktion nachgewiesen werden (vgl. Abb. 26). Am E18 konnte im Knockout eine schwache Reninexpression detektiert werden, die größtenteils auf arcuate Seitenäste limitiert war. Betrachtet man das Verteilungsmuster der Reninzellen während der postpartalen Nierenentwicklung, zeigt sich, dass sich die Reninexpression des Knockouts in Ort und Ausmaß dem Wildtyp annähert. Beide Genotypen weisen die Reninimmunoreaktivität dann auch in kleineren Gefäßsegmenten, wie den aussprossenden Interlobulararterien und afferenten Arteriolen auf (vgl. 32, 33). In den 3D-Rekonstruktionen adulter Tiere

sind schließlich keine Unterschiede mehr zu sehen. Die reninpositiven Bereiche sind in der β_1/β_2 -defizienten, genau wie in der Wildtypniere eng auf die terminalen Bereiche afferenter Arteriolen begrenzt (vgl. Abb. 34, 35). Die Signaltransduktion über β -Adrenozeptoren scheint also einen maßgeblichen Einfluss auf die korrekte Lokalisation der initialen Reninexpression in den arcuaten Arterien zu haben, nicht aber im distalen Bereich des arteriellen Gefäßbaums. Die Daten zeigen außerdem, dass die Aktivierung oder auch nur die Anwesenheit β -adrenerger Rezeptoren für die charakteristische Verlagerung der Reninexpression von den großen renalen Arterien zu den juxtaglomerulären Abschnitten des Gefäßbaums während der Nephrogenese nicht benötigt wird. Weiterhin ist die frühe Reninexpression der großen Gefäße scheinbar keine Voraussetzung für die Entwicklung reninproduzierender Zellen der kleinen kortikalen Gefäßsegmente.

Die mit qPCR erstellten Profile der renalen Reninexpression, ermittelt aus mRNA-Präparationen von Gesamtnieren, reflektieren die Beobachtungen aus den 3D-Modellen. Die größte Differenz in der Reninabundanz erscheint auf mRNA-Ebene in der pränatalen Periode (vgl. Abb. 36 unten), passend zur faktischen Abwesenheit von Renin im β_1/β_2 -Adr/- auf der einen, und den komplett mit Reninzellen ausgekleideten Arcuatae auf der anderen Seite (vgl. Abb. 24-31). Auch die Feststellung, dass sich der Unterschied während der postpartalen Nierenreifung dem optischen Eindruck nach angleicht (vgl. Abb. 34, 35), kann am mRNA-Verlauf nachvollzogen werden. So erreichte die adulte β_1/β_2 -Adr/- Maus in unseren Messungen ca. 85% der wildtypischen Reninexpression. Dieses Ergebnis passt zu Berichten von Rohrer et al. (1999), dass der Verlust der β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren die kardiovaskulären Parameter, darunter den Blutdruck nur schwach beeinflusst, solange keine körperliche Anstrengung gefordert wird. Die Reduktion der Renin-mRNA auf 25% vs. WT (adult), von der Kim et al. (2007) berichten, kann in dieser Höhe nicht bestätigt werden.

Insgesamt konnten wir dennoch zeigen, dass die Reninexpression von β_1/β_2 -Adr/- Mäusen gegenüber den Wildtypkontrollen in allen Stadien reduziert ist. Man kann daher davon ausgehen, dass die Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren neben der akuten Antwort des Reninsystems, auf beispielsweise Stress, auch zur basalen Reninexpression der embryonalen, postpartalen und adulten Mausniere beiträgt. Eine

solche tonische Rezeptoraktivierung könnte durch basale Sympathikusaktivität oder durch zirkulierende Katecholamine bedingt sein (Kim et al., 2007). Diese Bewertung auf Basis der β_1/β_2 -Adr-/- Maus ist allerdings kritisch zu betrachten: Die systemische Ablation der β_1 - und β_2 -Rezeptoren verhindert, abgesehen vom atypischen β_3 , jegliches β -adrenerge signalling. Eine mögliche Konsequenz könnte die Hochregulation der Katecholaminsekretion aus der adrenalen Medulla oder des sympathischen Nervensystems sein. Ein solcher Kompensationsversuch könnte zur (Über-)Aktivierung vaskulärer α_1 -Rezeptoren und damit zu Vasokonstriktion führen. In diesem Fall wäre der reduzierte Renin-mRNA-Spiegel die Folge einer druckabhängigen RAAS-Inhibition zur Aufrechterhaltung der Blutdruckhomöostase. Neben diesem hypothetischen hämodynamischen Effekt postulierten Keeton und Campbell (1980), dass die Plasmareninkonzentration durch Gabe von α_1 -Sympathomimetika direkt gesenkt werden kann, was bedeuten würde, dass das α -adrenerge System ebenfalls in Kommunikation mit reninbildenden Zellen steht.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit der Bericht von Kim et al. (2007) bestätigt werden, dass die Fähigkeit zur Rekrutierung reninbildender Zellen nach RAAS-Stimulation durch die kombinierte Gabe von Nidrigsalzdiät und dem ACE-Inhibitor Enalapril erhalten bleibt. An den 3D-Rekonstruktionen stimulierter adulter Nieren von β_1/β_2 -Adr-/- und Wildtypmäusen sind keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation rekrutierter reninbildender Zellen erkennbar (vgl. Abb. 37, 38). Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass die RNSA im adulten Tier keinen Einfluss darauf hat, in welchen Zellen die Reninproduktion aktiviert wird.

Zwar gilt die sympathische Innervierung von JG-Zellen durch β_1 -Adrenozeptoren in der adulten Niere als gesichert (Johns, 1991; Kirby et al., 1994), dennoch ist der direkte immunhistochemische Nachweis mangels geeigneter Antikörper derzeit nicht möglich. Von Boivin et al. (2001) gezeigte Färbungen an der Rattenniere basieren auf einem nicht mehr verfügbaren, von der Arbeitsgruppe selbst generierten Antikörper. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene kommerziell erhältliche Antikörper gegen den β_1 -Rezeptor ohne Erfolg getestet (Daten nicht gezeigt). Als geeigneten Ersatz für die Demonstration renaler sympathischer Nervenaktivität während der Nephrogenese wählten wir daher die Tyrosinhydroxylase (TH). Das Enzym katalysiert die Bildung von

L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) aus L-Tyrosin, dem geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Synthese von Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin (Nagatsu et al., 1964). Die TH-Färbungen an Paraffinschnitten von E16, E18 und pp1 zeigen zunächst ein paralleles Wachstum des renalen Gefäßbaums und der sympathischen Nervenfasern (vgl. Abb. 39). Eine lokale Katecholaminquelle zur Aktivierung der β -Rezeptoren ist während der Entwicklung der Niere also jederzeit vorhanden. Unsere Befunde über die sympathische Innervierung während des Nierenwachstums decken sich mit Studien an der Ratte (Pupilli et al., 1991; Barajas et al., 1991; Barajas und Liu, 1993), dem Schaf (Maretta und Marettova, 1999) und dem Hund (Ferguson et al., 1988). Auch die Ontogenese der humanen RNSA zeigt ein vergleichbares Muster (Tiniakos et al., 2004). Die TH-Renin-Kofärbungen der Wachstumsstadien der Maus führen zu dem Schluss, dass die renale Innervierung der reninpositiven Bereiche sowohl in der embryonalen als auch in der früh postnatalen Entwicklungsphase vorhanden ist. Studien an humanen Föten belegen ebenfalls die räumliche Nähe zwischen TH-positiven Nervenfasern und dem juxtaglomerulären Apparat (Tiniakos et al., 2004). Auch im adulten Zustand konnten wir den erwarteten engen Kontakt zwischen RNSA und den Zellen der afferenten Arteriolen bestätigen. Somit ist die besagte lokale Katecholaminquelle während der gesamten Entwicklungszeit der renalen Reninexpression vorhanden.

Trotz der weithin verbreiteten Akzeptanz der TH als Marker sympathischer Nervenenden erlaubt ihre Expression keine Rückschlüsse bezüglich der Identität der zugehörigen Rezeptoren. Eine präzise Differenzierung hinsichtlich der Lokalisation von β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren auf reninbildenden Zellen während der Embryonalentwicklung ist mit den derzeit verfügbaren Methoden nicht möglich. Aus diesem Grund konnte kein direkter Beweis für die Beobachtung erbracht werden, dass die Deletion der β -adrenergen Rezeptoren in großen renalen Gefäßen erheblich schwerere Auswirkungen auf die Reninexpression hat als in den kleinen. Ein wahrscheinlicher Grund für dieses Phänomen könnte eine differentielle Expression der β -Adrenozeptoren während der Nephrogenese sein.

Im Gegensatz zur gestörten Reninexpression während der Entwicklung zeigen die wachsenden präglomerulären Gefäßbäume der β_1/β_2 -Adr/- Maus keine strukturellen Auffälligkeiten. Anders als in der RC-Gs $_{\alpha}$ /- Maus konnte weder die Verkürzung noch

die Reduzierung afferenter Arteriolen beobachtet werden. Die mangelnde Relevanz β -adrenergen signalings für die korrekte Ausbildung des Gefäßbaums deutet darauf hin, dass die vaskulären Missbildungen in Abwesenheit rezeptorvermittelter cAMP-Produktion von anderen Gs-gekoppelten Rezeptoren als den β -Adrenozeptoren abhängen.

Der Vergleich der ontogenetischen Reninexpression von β_1/β_2 -Adr $-/-$ und RC-Gs $_{\alpha}$ $-/-$ Mäusen deutet ebenfalls darauf hin, dass weitere Faktoren involviert sind, die den cAMP/PKA-Signalweg benutzen. Die fehlende Aktivierung von β -Rezeptoren reicht in der späten Entwicklung bei weitem nicht aus, um den Reninknockout-Phänotyp der Gs $_{\alpha}$ -Maus zu erklären. Es scheint dennoch vorstellbar, dass die Reninexpression der frühen Entwicklungsphase (E16-pp1), also in den großen Gefäßen eher Sympathikus gesteuert ist, und dass später in den kleinen kortikalen Gefäßabschnitten andere Gs-gekoppelte Rezeptoren die Aufgabe als primärer Induktor übernehmen. Als Partner in einer solchen Kombination kommen erneut die bereits erwähnten Prostaglandinrezeptoren in Frage, vor allem wenn man bedenkt, dass die relative COX-2 Expression der Niere während der frühen postpartalen Entwicklungsphase stark ansteigt und bis zum Adultstadium langsam absinkt (Stubbe et al., 2003), also dem Zeitraum in dem sich die Differenz der Reninexpression zwischen β_1/β_2 -Adr $-/-$ und Wildtyp angleicht.

Einen weiteren Regulator der ontogenetischen Reninexpression könnte die Dopaminsignalkette darstellen. Es ist bekannt, dass Dopamin die Reninsynthese in der adulten Maus über den auf JG-Zellen exprimierten Gs-gekoppelten Rezeptor Drd1a positiv reguliert (Kurtz et al., 1988; Yamaguchi et al., 1997). Dopamin wird neben Noradrenalin von den renalen sympathischen Nerven, aber auch von intrarenalen Quellen freigesetzt. Die genaue Funktion der COX-2- und Dopaminrezeptoren während der Reninentwicklung gilt es also in der Zukunft zu erforschen.

6. Literaturverzeichnis

- Albinus M, Finkbeiner E, Sosath B, Osswald H (1998): Isolated superfused juxtaglomerular cells from rat kidney: a model for study of renin secretion. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 2):F991-7
- Angus JA, Cocks TM and Satoh K (1986): The β -adrenoceptors on endothelial cells. *Fed Proc* 45:2355–2359
- Ardailou R (1999): Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol.* 10 Suppl 11:S30-9
- Bader M, Ganten D (2000): Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med.* 78(3):130-9
- Barajas L (1979): Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol* 236, 240-246
- Barajas L, Salido E (1986): Juxtaglomerular apparatus and the renin-angiotensin system. *Lab Invest* 54(4):361-364
- Barajas L, Liu L, Powers K (1992): Anatomy of the renal innervations: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Can J Physiol Pharmacol* 70:735-749
- Beavo JA (1995): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 1995 Oct;75(4):725-48
- Beazely MA, Watts VJ (2006): Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: a progress report. *Eur J Pharmacol* 535:1–12
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Greger R, Schutz G (2000): Mineralocorticoid receptor knockout mice: lessons on Na^+ metabolism. *Kidney Int* 57:1295-1298
- Boivin V, Jahns R, Gambaryan S, Ness W, Boege F, and Lohse MJ (2001): Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int* 59:515-531
- Briggs, JP, Schubert G, Schnermann J: (1984): Quantitative characterization of the tubuloglomerular feedback response: effect of growth. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 247:F808-F815
- Carbone GM, Sheikh AU, Rogers S, et al (1993): Developmental changes in renin gene expression in ovine kidney cortex. *Am J Physiol* 264:R591-R596

Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ (1997): Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100:1566-1574

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

Castrop H, Klar J, Wagner C, Höcherl K, Kurtz A (2003): General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F518-F524

Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, Mizel D, Hansen P, Theilig F, Bachmann S, Deng C, Briggs J, Schnermann J. (2004): Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004 Sep;114(5):634-42

Castrop H, Lorenz JN, Hansen PB, Friis U, Mizel D, Oppermann M, Jensen BL, Briggs J, Skott O, Schnermann J. (2005): Contribution of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl-cotransporter (NKCC1/BSC2) to renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol.* Dec; 289(6):F1185-92

Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A, Schnermann J (2004): Permissive role of Nitric Oxide in Macula densa control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:848-57

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

Chao HH, Waheed A, Pohlmann R, Hille A, von Figura K (1990): Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *EMBO J.* Nov;9(11):3507-13

Chen K, Carey LC, Valego NK, Rose JC (2007): Thyroid hormone replacement normalizes renal renin and angiotensin receptor expression in thyroidectomized fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R701-R706

Chen L, Kim SM, Oppermann M, Faulhaber-Walter R, Huang Y, Mizel D, Chen M, Lopez ML, Weinstein LS, Gomez RA, Briggs JP, and Schnermann J (2007): Regulation of renin in mice with Cre recombinase mediated deletion of G protein Gs α in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F27-37

Chen M, Gavrilova O, Liu J, Xie T, Deng C, Nguyen AT, Nackers LM, Lorenzo J, Shen L, Weinstein LS (2005): Alternative Gnas gene products have opposite effects on glucose and lipid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7386–7391

Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, McKanna JA, Harris RC (2001): Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F449–F456

Chiu T, Reid IA. (1996): Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *J Pharmacol Exp Ther.* Aug;278(2):793-9

Chiu YJ, Hu SH, Reid IA (1999): Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 290:16-19

Churchill PC, Churchill MC, McDonald FD (1983): Evidence that beta 1-adrenoceptor activation mediates isoproterenol-stimulated secretion in the rat. *Endocrinology* 113: 687-692

Cohen Y, Rahamimov R, Naveh-Many T, Silver J, Rahamimoff R (1997): Where is the “inverting factor” in hormone secretion from parathyroid cells? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273:E631-E637

Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1984): Neurogenic cholinergic prejunctional inhibition of sympathetic beta adrenergic relaxation in the canine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 229:417–421

Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, Pazmino AK, Griffiths R, Flannery PJ, Spurney RF, Kim HS, Smithies O, Le TH, Coffman TM (2005): Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 115:1092-1099

Davidson HW (1995): Wortmannin causes mistargeting of procathepsin D. evidence for the involvement of a phosphatidylinositol 3-kinase in vesicular transport to lysosomes. *J Cell Biol.* Aug;130(4):797-805

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

Delbridge LM, Morgan TO, Harris PJ (1995): Effects of endothelin-1 on the contractility of cardiomyocytes from the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 22:755-762

Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, et al. (1986): 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

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

DiBona GF, Kopp UC (1997): Neural control of renal function. *Physiol Rev* 77:75-97

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

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

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

Egleme C, Godfraind T and Miller RC (1984): Enhanced responsiveness of isolated rat aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. *Br J Pharmacol* 81:16–18

Faust PL, Chirgwin JM, Kornfeld S (1987): Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *J Cell Biol.* Nov;105(5):1947-55

Flagella M, Clarke LL, Miller ML, et al. (1999): Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J Biol Chem.* Sep 17;274(38):26946-55

Francois H, Coffman TM (2004): Prostanoids and blood pressure: which way is up? *J. Clin. Invest.* 114:757-759

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

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

Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreasen D, Hansen PB, Skott O (2002): Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circulation Research* 90:996-1003

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

Gabel CA, Goldberg DE, Kornfeld S (1983): Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor: evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*. Feb;80(3):775-9

Gaffet P, Jones AT, Clague MJ (1997): Inhibition of calcium-independent mannose 6-phosphate receptor incorporation into trans-Golgi network-derived clathrin-coated vesicles by wortmannin. *J Biol Chem*. Sep 26;272(39):24170-5

Gase JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P (1994): Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridisation study. *Hypertension* 24:531-537

Pan L, Glenn ST, Jones CA, Gross KW (2005): Activation of the rat renin promoter by HOXD10, PBX1b, PREP1, Ets-1, and the intracellular domain of notch. *J Biol Chem* 280: 20860-20866

Glenn ST, Jones CA, Pan L, Gross KW (2008): In vivo analysis of key elements within the renin regulatory region. *Physiol Genomics* 35:243–253

Golin R, Pieruzzi F, Munforti C, Busca G, Di Blasio A, and Zanchetti A (2001): Role of the renal nerves in the control of renin synthesis during different sodium intakes in the rat. *J Hypertens* 19:1271-1277

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

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

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

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

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

Goormaghtigh N (1937): 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.

Grobecker H (1999): Angiotensin-II-Receptor-Antagonisten: Pharmakologie und therapeutische Anwendung. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.

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

Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F (2006): The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. Circ Res 99:1197-1206

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990): Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. Physiol Rev 70:1067-1116

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

Hannaert P, Alvarez-Guerra M, Pirot D, Nazaret C, Garay RP (2002): Rat NKCC2/NKCC1 cotransporter selectivity for loop diuretic drugs. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. Mar;365(3):193-9

Harding P, Carretero OA, Beierwaltes WH (2001): Chronic cyclooxygenase-2 inhibition blunts low sodium-stimulated renin without changing renal haemodynamics. J Hypertens 18:1107-1113

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994): Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. J Clin Invest 94(6):2504-10

He XR, Greenberg SG, Briggs JP, Schnermann J (1995): Effects of furosemid and verapamil on the NaCl dependency of macula densa-mediated renin secretion. Hypertension 26:137-142

Höcherl K, Wolf K, Castrop H, Ittner KP, Bucher M, Kees F, Grobecker HF, Kurtz A (2001): Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT₁ receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. Pflügers Arch 442:821-827

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

Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, Pfeifer M, Krämer BK, Riegger AJ, Kurtz A (1997): Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 15:1471-1479

Holmer S, Rinne B, Eckard KU, Lehir M, Schricker K, Kaissling B, Riegger G, Kurtz A (1994): Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney. *Am J Renal Fluid Electrolyte Physiol* 266:F738-F745

Holmer S, Eckard KU, Lehir M, Schricker K, Riegger G, Kurtz A (1993): Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Eur.J.Physiol.* 425:62-67

Horiuchi M, Pratt RE, Nakamura N, Dzau VJ (1993): Distinct nuclear proteins competing for an overlapping sequence of cyclic adenosine monophosphate and negative regulatory elements regulate tissue-specific mouse renin gene expression. *J Clin Invest* 92: 1805-1811

Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A (1997): Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29(5): 1148-55

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

Johannessen A, Nielsen AH, Poulsen K (1990): Measurement of inactive renin in rat plasma: effect of nephrectomy and sialoadenectomy on the plasma concentration. *J Hypertens* 8:345-349

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

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

Kageyama S, Brown J (1990): Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in rat isolated Glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 168:37-42

Kaplan MR, Plotkin MD, Brown D, Hebert SC, Delpire E (1996): Expression of the mouse Na-K-2Cl cotransporter, mBSC2, in the terminal inner medullary collecting duct, the

glomerular and extraglomerular mesangium, and the glomerular afferent arteriole. *J Clin Invest.* Aug 1;98(3):723-30

Keeton TK, Campbell WB (1980): The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.*32:81-227

Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, Oppermann M, Huang Y, Mizel D, Briggs JP, Schnermann J (2007): Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension* 50:103-109

Kim SM, Chen L, Mizel D, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J (2007): Low plasma renin and reduced renin secretory responses to acute stimuli in conscious COX-2-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F415-F422

Kim SM, Mizel D, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J (2005): Adenosine as a mediator of macula densa-dependent inhibition of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:1016-1023

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

Klar J, Vitzthum H, and Kurtz A (2004): Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F349-355

Klar J, Sandner P, Müller MW, Kurtz A (2002): Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch* 444:335-344

Komhoff M, Jeck ND, Seyberth HW, Grone HJ, Nusing RM, Breyer MD (2000): Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Barter-like syndrome. *Kidney Int* 58:2420-2424

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

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

Kornfeld S. (1992): Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem.* 61:307-30

Kornfeld S, Mellman I (1989): The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol.* 5:483-525

Koster A, Saftig P, Matzner U, von Figura K, Peters C, Pohlmann R (1993): Targeted disruption of the M(r) 46,000 mannose 6-phosphate receptor gene in mice results in misrouting of lysosomal proteins. *EMBO J.* Dec 15;12(13):5219-23

Kurtz A, Schweda F (2006): Osmolarity-induced renin secretion from kidneys: evidence for readily releasable renin pools. *Am J Physiol Renal Physiol.* Apr;290(4):F797-805

Kurtz A, Wagner C (1999): Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol* 202:219-225

Kurtz A, (1997): Membrane and secretory properties of renal juxtaglomerular granular cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24(7):536-40

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

Kurtz A, Penner R (1989): Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3423

Kurtz A, Muff R, Born W, Lundberg JM, Milberg BI, Gnädiger MP, Uehlinger DE, Weidmann P, Hökfelt T, Fischer JA (1988): Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *J. Clin. Invest.* 82:538-543

Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Bauer C (1986): Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4769-4773

Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Buhrle C, Nobiling R, Taugner R, Hackenthal R, Bauer C (1986): Role of protein kinase C in the inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am J Physiol* 250:563-571

Kyle JW, Nolan CM, Oshima A, Sly WS (1988): Expression of human cation-independent mannose 6-phosphate receptor cDNA in receptor-negative mouse P388D1 cells following gene transfer. *J Biol Chem.* Nov 5;263(31):16230-5

Lalli E, and Sassone-Corsi P (1994): Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 269:17359-17362

Lapointe JY, Bell PD, Cardinal J (1990): Direct evidence for apical Na⁺:2Cl⁻:K⁺ cotransport in macula densa cells. *Am J Physiol.* May;258(5 Pt 2):F1466-9

Latta H (1973): 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

Liu J, Chen K, Valego NK, Carey LC, Rose JC (2005): Ontogeny and effects of thyroid hormone on beta1-adrenergic receptor mRNA expression in ovine fetal kidney cortex. *J Soc Gynecol Investig* 12:563–569

Lobel P, Fujimoto K, Ye RD, Griffiths G, Kornfeld S. (1989): Mutations in the cytoplasmic domain of the 275 kd mannose 6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis. *Cell.* Jun 2;57(5):787-96

Ludwig T, Ovitt CE, Bauer U, Hollinshead M, Remmler J, Lobel P, Ruther U, Hoflack B (1993): Targeted disruption of the mouse cation-dependent mannose 6-phosphate receptor results in partial missorting of multiple lysosomal enzymes. *EMBO J.* Dec 15;12(13):5225-35

Makhanova N, Lee G, Takahashi N, Sequeira Lopez ML, Gomez RA, Kim HS, Smithies O (2006): Kidney function in mice lacking aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F61-69

Martineau D, Lamouche S, Briand R, Yamagouchi N (1999): Functional involvement of angiotensin AT₂ receptor in adrenal catecholamine secretion in vivo. *Can J Physiol Pharmacol*, 77:367-374

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

Mercure C, Ramla D, Garcia R, Thibault G, Deschepper CF, Reudelhuber TL (1998): Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS Lett.* Feb 6;422(3):395-9

Meyer JW, Flagella M, Sutliff RL, Lorenz JN, Nieman ML, Weber CS, Paul RJ, Shull GE (2002): Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Nov; 283(5):H1846-55

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

Mizoguchi H, Dzau VJ, Siwek LG, Barger AC (1983): Effect of intrarenal administration of dopamine on renin release in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 244: H39-H45

Moe O, Tejedor A, Campbell WB, Alpern RJ, Henrich WL (1991): Effects of endothelin on in vitro renin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 260:E521-E525

Molenaar P, Malta E, Jones CR, Buxton BR and Summers RJ (1988): Autoradiographic localization and function of beta-adrenoceptors on the human internal mammary artery and saphenous vein. *Br J Pharmacol* 95:225–233

Moosavi SM, Johns EJ (2003): The effect of isoprenaline infusion on renal renin and angiotensinogen gene expression in the anesthetized rat. *Exp Physiol* 88:221-227

Morris BJ (1992): Molecular biology of renin I: gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* 10:209-214

Morris BJ (1996): Hypothesis: an angiotensin converting enzyme genotype, present in one in three caucasians, is associated with increased mortality rate. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 23(1):1-10

Müller MW, Todorov V, Kramer BK, Kurtz A (2002): Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Arch.* 444(4):499-505

Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, Kriz W (1992): Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 42(4): 1017-1019

Naftilan AJ, Oparil S (1978): Inhibition of renin release from rat kidney slices by the angiotensins. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 235:F62-F68

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

Neubauer B, Machura K, Chen M, Weinstein LS, Oppermann M, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA, Schnermann J, Castrop H, Kurtz A, Wagner C (2009): Development of vascular renin expression in the kidney critically depends on the cyclic AMP pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F1006-1012

- Neufeld EF (1991): Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem.* 60:257-80
- Nolan CM, Sly WS (1987): Intracellular traffic of the mannose 6-phosphate receptor and its ligands. *Adv Exp Med Biol.* 225:199-212
- Ogawa K, Yamasato M, and Taniguchi K (1995): Exocytosis of secretory granules in the juxtaglomerular granular cells of kidneys. *Anat. Rec* 243:336- 346
- Oliverio MI, Madsen K, Best CF, Ito M, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1998): Renal growth and development in mice lacking AT_{1A} receptors for angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 274:F43-F50
- Ortiz-Capisano MC, Ortiz PA, Harding P, Garvin JL, Beierwaltes WH (2007): Adenylyl cyclase isoform V mediates renin release from juxtaglomerular cells. *Hypertension* 49: 618-624
- Pan L, Black TA, Shi Q, Jones CA, Petrovic N, Loudon J, Kane C, Sigmund CD, and Gross KW (2001): Critical roles of a cyclic AMP responsive element and an E-box in regulation of mouse renin gene expression. *J Biol Chem* 276:45530-45538
- Park CS, Chang SH, Lee HS, Kim SH, Chang JW, Hong CD (1996): Inhibition of renin secretion by Ca^{2+} through activation of myosin light chain kinase. *Am J Physiol* 271:C242-C247
- Park CS, Lee HS, Chang SH, Honeyman TW, Hong CD (1996): Inhibitory effect of Ca^{2+} on renin secretion elicited by chemiosmotic stimuli through actomyosin mediation. *Am J Physiol* 271:C248-C254
- Peters JS, Clausmeyer S (2002): Intracellular sorting of renin: Cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol* 34:1561-1568
- Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH. (2004): Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol.* Aug;287(2):F329-35
- Peti-Peterdi J, Komlosi P, Fuson AL, Guan Y, Schneider A, Qi Z, Redha R, Rosivall L, Breyer MD, Bell PD (2003): Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE_2 release from macula densa cells. *J Clin Invest* 112:76-82
- Phat VN, Camilleri JP, Bariety J, et al. (1981): Immunohistochemical characterization of renin-containing cells in the human juxtaglomerular apparatus during embryonal and fetal development. *Lab Invest* 45:387-390

Petrovic N, Kane CM, Sigmund CD, Gross KW (1997): Downregulation of renin gene expression by interleukin-1. *Hypertension*. Aug;30(2 Pt 1):230-5

Pfeifer CA, Suzuki F, Jackson EK (1995): Selective A1 adenosine receptor antagonism augments beta-adrenergic-induced renin release in vivo. *Am J Physiol*. Oct;269(4 Pt 2):F469-79

Pfeilschifter J, Kurtz A, Bauer C (1985): Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylgluceryl ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 127(3):903-10

Pietri L, Bloch-Faure M, Belair MF, Sanford LP, Doetschman T, Menard J, Bruneval P, Meneton P (2002): Altered renin synthesis and secretion in the kidneys of heterozygous mice with a null mutation in the TGF-beta(2) gene. *Exp Nephrol*. 10(5-6):374-382

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

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

Reudelhuber TL, Mercure C, Ramla D, Methot D, Postnov AY (1995): Molecular mechanisms of processing and sorting in renin secretion. *Hypertension* (Laragh JH, Brenner, eds) pp.1621-1636, Raven Press, New York

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

Ritthaler T, Scholz H, Ackermann M, Riegger GAJ, Kurtz A, Krämer BK (1995): Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol* 268:39-45

Rohrer DK, Bernstein D, Chruscinski A, Desai KH, Schauble E, Kobilka BK (1998): The developmental and physiological consequences of disrupting genes encoding β_1 and β_2 adrenoceptors. *Adv Pharmacol* 42:499–501

Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK (1999): Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both β_1 and β_2 -adrenergic receptors. *J Biol Chem* 274:16701–16708

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

Ryan MJ, Gross KW, Hajduczuk G (2000): Calcium-dependent activation of phospholipase C by mechanical distension in renin-expressing As4.1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Oct;279(4):E823-9

Sakamoto A, Chen M, Nakamura T, Xie T, Karsenty G, Weinstein LS (2005): Deficiency of the G-protein alpha-subunit Gs alpha in osteoblasts leads to differential effects on trabecular and cortical bone. *J Biol Chem* 280:21369–21375

Saris JJ, Derkx FH, De Bruin RJ, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA, Jan Danser AH (2001): High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Apr;280(4):H1706-15

Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C (2008): Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int* 73:43-51

Schlatter E, Salomonsson M, Persson AE, Greger R (1989): Macula densa cells sense luminal NaCl concentration via furosemide sensitive Na⁺2Cl⁻-K⁺ cotransport. *Pflugers Arch.* Jul;414(3):286-90

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

Scholz H, Kramer BK, Hamann M, Gotz KH, Kurtz A. (1995): Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta Physiol Scand.* Oct;155(2):173-82

Scholz H, Hamann M, Götz KH, and Kurtz A (1994): Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflugers Arch* 428:173-178

Schricker K, Holmer S, Kramer BK, Riegger GA, Kurtz A (1997): The role of angiotensin II in the feedback control of renin gene expression. *Pflugers Arch* 434:166-172

Schweda F, Segerer F, Castrop H, Schnermann J, Kurtz A (2005): Blood Pressure–Dependent Inhibition of Renin Secretion Requires A1 Adenosine Receptors. *Hypertension* 46:780-6

Schweda F, Kammerl M, Wagner C, Kramer BK, Kurtz A (2004): Upregulation of macula densa cyclooxygenase-2 expression is not dependent on glomerular filtration. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 287:95-101

Schweda F, Wagner C, Kramer BK, Schnermann J, Kurtz A. (2003): Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 Adenosine receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. Apr;284(4):F770-7

Schwertschlag U, Hackenthal E (1982): Histamine stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 319:239-242

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

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA (2001): Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 281(2):345-56

Shi Q, Black TA, Gross KW, Sigmund CD (1999): Species-specific differences in positive and negative regulatory elements in the renin gene enhancer. *Circ Res* 85:479-488

Skinner SL, McCubbin JW, and Page IH (1964): Renal baroreceptor control of acute renin release in normotensive, nephrogenic and neurogenic hypertensive dogs. *Circ Res* 15:522-531

Skott O (1988): Do osmotic forces play a role in renin secretion? *Am J Physiol* 255:1-10

Skott O, Taugner R (1987): Effects of extracellular osmolality on renin release and on the ultrastructure of the juxtaglomerular epitheloid cell granules. *Cell Tissue Res* 249: 325-329

Skøtt O, Briggs JP (1987): Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* 237:1618-1620

Skott O (1986): Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflügers Arch* 407:41-45.

Stubbe J, Jensen BL, Bachmann S, Morsing P, Skøtt O (2003): Cyclooxygenase-2 contributes to elevated renin in the early postnatal period in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1179–R1189

Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J (2001): Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. Aug 14;98(17):9983-8

Tamura K, Chen YE, Tanaka Y, Sakai M, Tsurumi Y, Koide Y, Kihara M, Pratt RE, Horiuchi M, Umemura S, Dzau VJ (2004): Nuclear receptor LXRalpha is involved in cAMP-mediated human renin gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 224:11-20

Tamura K, Umemura S, et al (1995): Recent advances in the study of renin and angiotensin genes: from molecules to the whole body. *Hypertens Res* 18(1):7-18

Tanimoto K, Sugiura A, Kanafusa S, Saito T, Masui N, Yanai K, Fukamizu A (2008). A single nucleotide mutation in the mouse renin promoter disrupts blood pressure regulation. *J Clin Invest* 118:1006-1016

Taugner R, Hackenthal E (1989): *The Juxtaglomerular Apparatus: Structure and Function*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Taugner R, Kim SJ, Murakami K, Waldherr R (1987): The fate of prorenin during granulopoiesis in epitheloid cells. Immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment. *Histochemistry*. 86(3):249-53

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

Taugner R, Buhrlé CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R (1984): Morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Contr. Nephrol* 43:76-101

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

Thomson SC, Blantz RC (1993): Homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback in hydropenia, euolemia, and acute volume expansion. *Am. J. Physiol.* 264 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 33):F930-F936

Todorov V, Müller M, Schweda F, Kurtz A (2002): Tumor necrosis factor-alpha inhibits renin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 283(5):R1046-51

Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ (1996): Angiotensin receptors. *J Hypertens*. 14:S95-103

- Vander AJ (1967): Control of renin release. *Physiol Rev* 47:359-382
- Vandongen R, Peart WS, Boyd GW (1973): Adrenergic stimulation of renin secretion in the isolated perfused rat kidney. *Circ Res* 32:290-296
- von Figura K, Hasilik A (1986): Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem.* 55:167-93
- Wagner C, Hinder M, Krämer BK, Kurtz A (1999): Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension* 34:1101-1105
- Wagner C, Kurtz A (1998): Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7:437-441
- Wall SM, Knepper MA, Hassell KA, Fischer MP, Shodeinde A, Shin W, Pham TD, Meyer JW, Lorenz JN, Beierwaltes WH, Dietz JR, Shull GE, Kim YH. (2005): Hypotension in NKCC1 null mice: role of the kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol.* Feb;290(2):F409-16.
- Wang ZQ, Moore AF, Ozono R, Siragy HM, Carey RM (1998): Immunocolocalisation of subtype 2 Angiotensin II (AT₂) receptor protein in rat heart. *Hypertension*, 32:78-83
- Wehner, Gehring: Zoologie; Stuttgart 2007²⁴; S. 250ff.
- Weihprecht H, Lorenz JN, Schnermann J, Skott O, Briggs JP (1990): Effect of adenosine1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest.* May;85(5):1622-8.
- Wilcox CS, Welch WJ, Schreiner GF, Belardinelli L (1999): Natriuretic and diuretic actions of a highly selective adenosine A1 receptor antagonist. *J Am Soc Nephrol.* Apr;10(4):714-20.
- Zhang, M.-Z., Wang, J.-L., Cheng, H.-F., Harris, R.C. & McKanna, J.A. (1997): Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol* 273, F994–F1002.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 - schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems

Abb. 2 - Die rezeptorvermittelte Aktivierung der Reninexpression

Abb. 3 - Die gewebsspezifische $G_{s\alpha}$ -Knockoutmaus wurde durch Kreuzung einer Maus, in der ein $Ren1^d$ -Allel durch Cre-Recombinase ersetzt ist, mit einer Maus, deren Exon 1 von $G_{s\alpha}$ von loxP-Sequenzen flankiert ist, generiert. Dieses Exon wird in den Nachkommen in allen Zellen mit aktivem Reninpromotor durch die Cre-Recombinase ausgeschnitten.

Abb. 4 - Links: Schematische Darstellung eines Glomerulus. (Abbildung nach Francois und Coffman, 2004). Rechts: Immunhistochemische Aufnahme eines Glomerulus mit afferenter und efferenter Arteriole (grün) und den reninbildenden Zellen (rot).

Abb. 5 - Ursprung der JG-Zellen: aus mesenchymalen Zellen (MC) gehen Glattmuskelzellen und Reninvorläuferzellen hervor, die entweder zu JG-Zellen oder selbst zu Muskelzellen reifen. Daneben entstehen aus den MC Angioblasten und Endothelzellen (Abbildung aus Sequeira Lopez et al., 2001).

Abb. 6 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität in der sich entwickelnden Mausniere. Balken=300 μ m. (a) E13, (b) E14, (c) E15, (d) früher E16, (e) später E16 (f) früher E17, (g) später E17 und (h) E18.

Abb. 7 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität in der sich entwickelnden Mausniere. Balken=500 μ m. (a) pp 1, (b) pp3, (c) pp5, (d) pp7, (e) pp10 und (f) pp90 (adult).

Abb. 8 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im $G_{s\alpha}$ -Wildtyp am E16 im gesamten Organ.

Abb. 9 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im $G_{s\alpha}$ -Wildtyp am E16 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 10 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im $G_{s\alpha}$ -Knockout am E16 im gesamten Organ. Pfeile zeigen Reninexpression.

Abb. 11 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im $G_{s\alpha}$ -Knockout am E16 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 12 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im $G_{s\alpha}$ -Wildtyp am E18 im gesamten Organ.

Abb. 13 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Wildtyp am E18 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 14 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Knockout am E18 im gesamten Organ.

Abb. 15 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Knockout am E18 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 16 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Wildtyp am pp1 im gesamten Organ.

Abb. 17 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Wildtyp am pp1 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 18 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Knockout am pp1 im gesamten Organ.

Abb. 19 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im Gs_{α} -Knockout am pp1 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 20 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im adulten Gs_{α} -Wildtyp in einem isolierten arcuaten Seitenast.

Abb. 21 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im adulten Gs_{α} -Knockout in einem isolierten arcuaten Seitenast.

Abb. 22 - Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Stadien E16, E18, pp1 und Adult. Links sind Aufnahmen von Gs_{α} -Knockoutstadien abgebildet, rechts WT-Aufnahmen. Immunreaktionen für Glattmuskelaktin sind in grün und für Renin rot dargestellt. Gelbe Bereiche zeigen die Kolokalisation beider Proteine. Vergrößerung 400x. Die Maßstabsbalken entsprechen 20µm.

Abb. 23 - Länge afferenter Arteriolen in RC- Gs_{α} ^{-/-} und WT-Nieren. Pro Genotyp und Stadium wurden 40-50 Arteriolen gemessen. Dargestellt ist die mittlere Länge \pm SEM. n.s. = nicht signifikant; $\ast = P < 0,05$

Abb. 24 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am E16 im gesamten Organ.

Abb. 25 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am E16 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 26 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am E16 im gesamten Organ.

Abb. 27 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am E16 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 28 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am E18 im gesamten Organ.

Abb. 29 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am E18 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 30 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am E18 im gesamten Organ.

Abb. 31 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am E18 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 32 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Wildtyp am pp1 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 33 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im β_1/β_2 -Knockout am pp1 in einem isolierten arcuaten Hauptstamm.

Abb. 34 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im adulten β_1/β_2 -Wildtyp in einem isolierten arcuaten Seitenast.

Abb. 35 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität im adulten β_1/β_2 -Knockout in einem isolierten arcuaten Seitenast.

Abb. 36 – oben: Zeitgang der renalen Renin-mRNA in β_1/β_2 -Adr^{-/-} und Wildtypmäusen während der Nierenentwicklung. Die Darstellung basiert auf Mittelwerten von 5-7 Nieren pro Stadium +/- SEM. unten: Differenz WT minus β_1/β_2 -Adr^{-/-} mRNA.

Abb. 37 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität in einem Nidrigsalz/Enalapril stimulierten adulten Wildtyp.

Abb. 38 – 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität in einem Nidrigsalz/Enalapril stimulierten adulten β_1/β_2 -Knockout.

Abb. 39 - Immunfluoreszenztripelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren der Stadien E16, E18, pp1 und Adult. Immunreaktionen der Tyrosinhydroxylase sind rot, Renin grün und Glattmuskelaktin blau dargestellt. Vergrößerung 400x. Die Maßstabsbalken entsprechen 20µm.

7.2. 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

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
	juxtaglomeruläre
JGE-Zelle	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
	platelet derived growth factor-
	beta
PDGF- β	Phosphatidyl-Inositol-
	bisphosphat
PIP2	Proteinkinase C
PKC	Phospholipase C
PLC	postpartal
pp	Renin-Angiotensin-Aldosteron-
RAAS	System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts

Ca ²⁺	Calcium	TRIS	Tris-(hydroxy-methyl-)amino-
	cyclisches		
cAMP	Adenosinmonophosphat		methan
cDNA	copy deoxyribonucleic acid	TRITC	Tetramethylrhodamin
	cyclisches		
cGMP	Guanosinmonophosphat	üN	über Nacht
Cy2	Carbocyanin	V.	Vena(e)
			vascular endothelial growth
DAG	Diacylglycerol	VEGF	factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat	vgl.	vergleiche
DNA	Desoxyribonukleinsäure	z.B.	zum Beispiel

7.3. Veröffentlichungen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

1. Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C (2008): Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int* 73:43-51
2. Neubauer B, Machura K, Chen M, Weinstein LS, Oppermann M, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA, Schnermann J, Castrop H, Kurtz A, Wagner C (2009): Development of vascular renin expression in the kidney critically depends on the cyclic AMP pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F1006-1012
3. Neubauer B, Machura K, Schnermann J, Wagner Charlotte: Renin expression in large renal vessels during fetal development depends on functional β_1/β_2 -adrenergic receptors. Zur Begutachtung eingereicht bei *Am J Physiol Renal Physiol*

7.4. 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 Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner für die Vergabe des Themas und für die Bereitstellung der benötigten Arbeitsmittel und Geräte. Ihr großes Interesse und Engagement trugen wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Für die vielfältige Unterstützung, die kompetente Beratung und für seine fortwährende Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz bedanken.

Melanie Gerl und Dominik Steppan möchte ich für die vielen lustigen Stunden in Labor und Büro danken.

Dank auch an Prof. Dr. Richard Warth und Prof. Dr. Frank Schweda, die mir bei den vielfältigen technischen Fragen des Laboralltags stets weitergeholfen haben.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Juliane und Leonhard für ihre kontinuierliche Unterstützung. Mein größter Dank geht schließlich an Frau Dr. Katharina Machura für die vielen hilfreichen Kleinigkeiten, die vielen aufmunternden Worte und vor allem ihren grenzenlosen Optimismus in allen Lebenslagen.