

Meinem Weiche Opa, Heinz

COX-2 und TGF- β als potentielle Faktoren zur Steuerung der Reninzellrekrutierung

Untersuchungen
in COX-2- und reninzellspezifischen TGF- β RII-
Knockoutmäusen



DISSERTATION

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

VORGELEGT VON

MELANIE GERL AUS REGENSBURG

IM JAHR 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 27.09.2011.

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

Unterschrift: _____

Inhaltsverzeichnis

Einleitung..... 7

1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) der Niere..... 7

- 1.1. Wirkungsweise und physiologische Bedeutung des RAAS..... 7
- 1.2. Der juxtaglomeruläre Apparat, die Reninsynthese und -sekretion 9
- 1.3. Die Regulation der renalen Reninaktivität 10
- 1.4. Reninzellrekrutierung im Verlauf der Nephrogenese 10
- 1.5. Aspekte zur Rekrutierung Renin bildender Zellen in der adulten Niere 12

2. Prostaglandine und das Renin-Angiotensin-System 13

- 2.1. Allgemeine Prostaglandincharakterisierung und -wirkungsweise 13
- 2.2. Prostaglandinbiosynthese – Cyclooxygenasen, als Schlüsselenzyme..... 14
- 2.3. COX-Expression in der Niere..... 14
- 2.4. COX-2 als potenter Regulator des RAAS 15

3. Der Differenzierungsfaktor TGF- β dessen Rezeptor TGF- β RII und das RAAS..... 16

- 3.1. Die TGF- β initiierte Signaltransduktionskaskade 16
- 3.2. Der TGF- β -Rezeptor-Typ II in Renin bildenden Zellen..... 17

4. Zielsetzung: Untersuchung von COX-2 und TGF- β als potentielle Faktoren zur Steuerung der Reninzellrekrutierung..... 18

MATERIAL & METHODEN..... 19

1. Material..... 19

- 1.1. Geräte 19
- 1.2. Verbrauchsmaterial 21
- 1.3. Chemikalien, Enzyme, Kits 21
- 1.4. Puffer und Lösungen..... 23
 - 1.4.1. Immunhistochemie 24
 - 1.4.2. Molekularbiologie..... 24
- 1.5. Oligonukleotide 25
- 1.6. Antikörper 26
- 1.7. Software und Internetdienste 27

2. Methoden	27
2.1. Versuchstiere	27
2.2. <i>In-vivo</i> -Studien	28
2.2.1. Untersuchungen an sich entwickelnden Mausnieren	28
2.2.2. Versuche an adulten Mäusen	29
2.3. Histologische Methoden	31
2.3.1. Anfertigung von Paraffinschnitten	31
2.3.2. Anfertigung von Kryoschnitten	31
2.3.3. Immunhistochemische Färbung	31
2.3.4. Mikroskopie und Bilddigitalisierung	33
2.3.5. Erstellung von 3D-Rekonstruktionen	33
2.4. Molekularbiologische Methoden	35
2.4.1. Genotypisierungen/ <i>Chytl</i> -Deletionspcr	35
2.4.2. Isolation der renalen Gesamt-mRNA	37
2.4.3. cDNA-Synthese	37
2.4.4. Semiquantifizierung der Renin mRNA mittels Realtime PCR	38
2.4.5. Bestimmung der Plasmapareninkonzentration	39
2.4.6. Statistische Analysen	39
Ergebnisse	40
1. Reninzellrekrutierung in COX-2 defizienten Mäusen	40
1.1. COX-2-Expression im Laufe der murinen Nephrogenese	40
1.2. Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung während der renalen Entwicklung von COX-2-Knockoutmäusen	41
1.3. Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung in der adulten COX-2-Knockoutmaus	49
1.4. Untersuchungen zu Gefäßbaumaberrationen im COX-2-/-	51
1.5. Immunhistologische COX-2-Lokalisationsstudien	52
2. Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung in reninzellspezifischen TGF-βRII-Knockoutmäusen	58
2.1. Reninzellspezifische Deletion von TGF-βRII mit Hilfe des <i>Cre/loxP</i> -Rekombinasesystems	58
2.2. TGF-βRII-Expression während der murinen Nephrogenese	59
2.3. Bestimmung der Plasmapareninaktivität während der Entwicklung in TGFβRII -/- Mäusen	60
2.4. Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung im Verlauf der Entwicklung von TGF-βRII RenCre ^{fl} Mäusen	61

2.5.	Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung in adulten TGF- β RII RenCreffl Mäusen.....	67
Diskussion.....		69
1.	Reninzellrekrutierung in COX-2 defizienten Mäusen	69
1.1.	Renin- und COX-2 Expression während der Entwicklung.....	69
1.2.	Renin-mRNA-Expression in COX-2 defizienten Mäusen während der Nierenentwicklung.....	70
1.3.	Reninexpression unter Stimulation im COX-2 -/- Adulttier.....	72
1.4.	Bedeutung von COX-2 auf die Reninzellrekrutierung im Adulttier	73
1.5.	Renale Störungen von COX-2-Knockoutmäusen	74
1.6.	Verlauf des zeitlich-räumlichen COX-2-Expressionsmusters	77
1.7.	COX-2-Lokalisation in der adulten Mausniere unter Stimulation des RAAS	78
1.8.	COX-2-Expression und der Macula-densa-Mechanismus während der renalen Entwicklung	79
1.9.	COX-2 als entscheidender Faktor der kortikalen Nierenentwicklung.....	80
1.10.	COX-2 in der Niere, Resümee und Ausblick	84
2.	Reninzellrekrutierung in der reninzellspezifisch deletierten TGF-βRII-Knockoutmaus	85
2.1.	Das <i>Cre/loxP</i> -Deletionssystem – Methode der Wahl zur Generierung der reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmaus.....	85
2.2.	Zeitlich korrelierende Expressionsmuster von TGF- β RII und Renin.....	87
2.3.	Reninaktivität in der reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmaus.....	88
2.4.	Reninzellrekrutierung in der reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmaus	88
2.5.	Die Rolle direkter reninzellspezifischer TGF- β -Signalgebung bei der Entwicklung des renalen Gefäßbaums.....	90
2.6.	Der TGF- β RII als essentieller Faktor des TGF- β -Signalwegs	91
2.7.	TGF- β -Expression unter Stimulation des RAAS	92
2.8.	Reninzellrekrutierung in der adulten reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmaus.....	93
2.9.	Renin als potentieller Regulator TGF- β s.....	94
2.10.	TGF- β -Signalgebung auf Reninzellen – Resümee und Ausblick	95

Zusammenfassung	96
abstract	99
Literaturverzeichnis.....	102
Anhang.....	111
Abbildungsverzeichnis	112
Abkürzungsverzeichnis	114
Bisherige Veröffentlichungen	116
Danksagung.....	117

Einleitung

1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) der Niere

1.1. Wirkungsweise und physiologische Bedeutung des RAAS

Als wichtigstes Exkretionsorgan des Körpers besitzt die Niere essentielle Bedeutung in der Aufrechterhaltung des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalts sowie in der Regulation des Blutdrucks.

Sie ist nicht nur Zielorgan zahlreicher Hormone, sondern steuert auch selbst auf endokrinem Wege entscheidende Körperfunktionen. Eine wichtige Rolle hierbei spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (*Peters & Clausmeyer, 2002; Mercure C. et al., 1998*).

Zentraler Regulator des RAAS ist Renin, ein proteolytisch wirksames Enzym, das vorwiegend in der Niere gebildet wird. Es katalysiert die Hydrolyse des von der Leber ins Blut sezernierten Glykoproteins Angiotensinogen zu Angiotensin I (ANGI) und gibt so Anstoß zum Start einer komplexen Enzymkaskade (**Abb.1.1**).

Das biologisch inaktive ANGI wird durch das aus dem Lungenepithel stammende Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) in das aktive, um zwei Aminosäuren kürzere Oktapeptid-Hormon Angiotensin II (ANGII) überführt. Über die Bindung an spezielle Angiotensin-II-(AT)-Rezeptoren ist ANGIII eigentlicher Mediator des Systems. Es wirkt stark vasokonstriktorisch und führt folglich zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstands und damit auch des Blutdrucks. ANGIII regt in der Neurohypophyse die Freisetzung von Vasopressin zur vermehrten Wasserrückresorption an und induziert außerdem zur gesteigerten Flüssigkeitsaufnahme das Durstgefühl im Hypothalamus. Über AT1-Rezeptoren nimmt es zum einen direkten Einfluss auf die tubuläre Na⁺- und Wasser-Rückresorption. Zum anderen fördert es diese auch indirekt über die Stimulation der Nebenniere zur Synthese und Sekretion des Steroidhormons Aldosteron. Letztendlich resultiert eine Aktivierung des RAAS in einer maßgeblichen Erhöhung des Blutdrucks und des Blutvolumens.

Anders als beim Menschen, bei dem unter physiologischen Bedingungen vor allem die Plasmaprotein-Konzentration begrenzend ist, gilt in der Maus Angiotensinogen als limitierender Faktor des Systems (Kurtz A., 1989; Hackenthal E. et al., 1990; Persson PB., 2003).

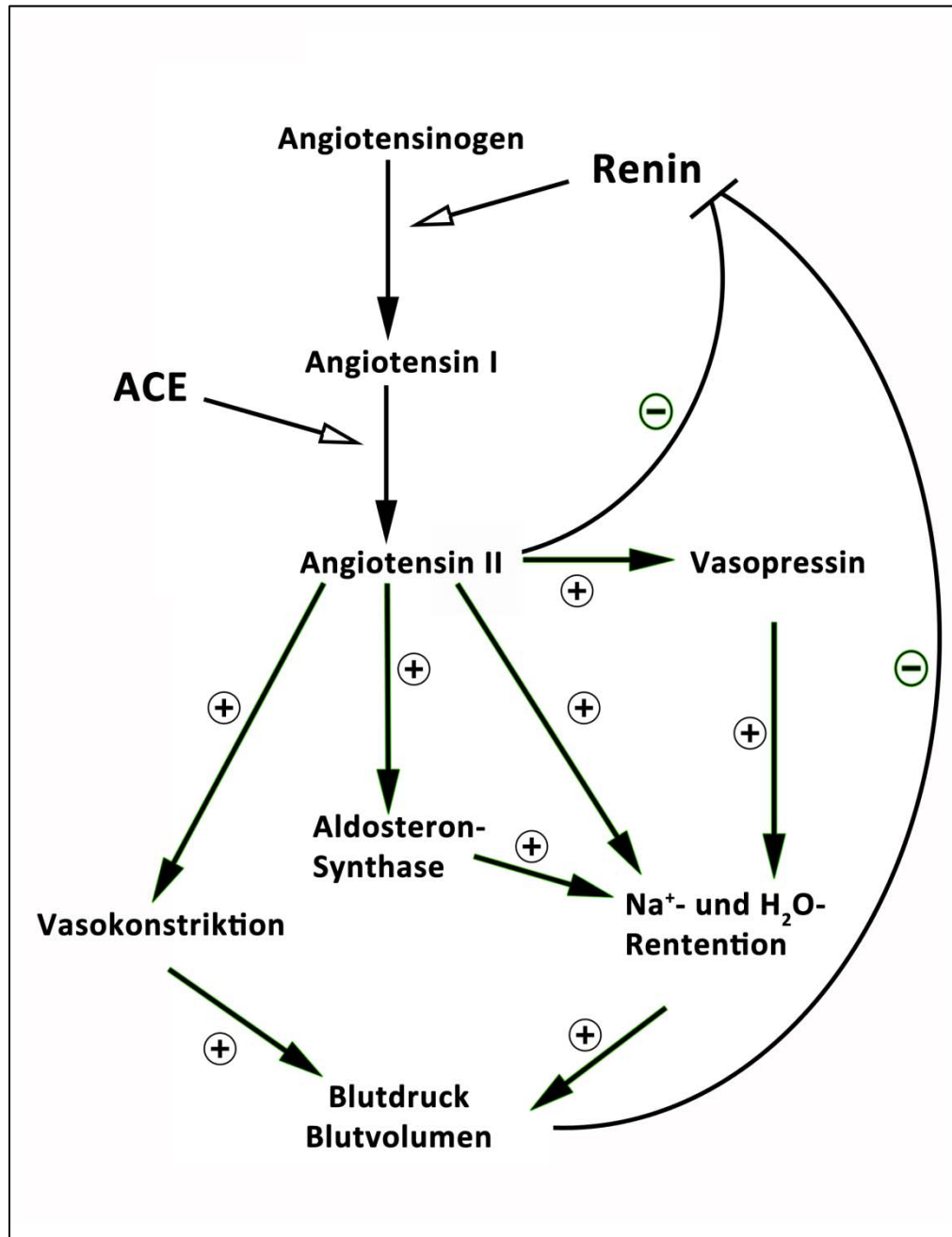


Abb.1.1 Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

1.2. Der juxtaglomeruläre Apparat, die Reninsynthese und -sekretion

In der Niere wird Renin hauptsächlich von juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JGE-Zellen), die in der Wand der Vasa Afferentia in unmittelbarer Nähe zum vaskulären Pol des Glomerulus sitzen, exprimiert (**Abb.1.2**) und dort in sekretorischen Vesikeln bis zu seiner kontrollierten Freisetzung gespeichert (Bader & Ganten, 2000; Taugner R. et al., 1987).

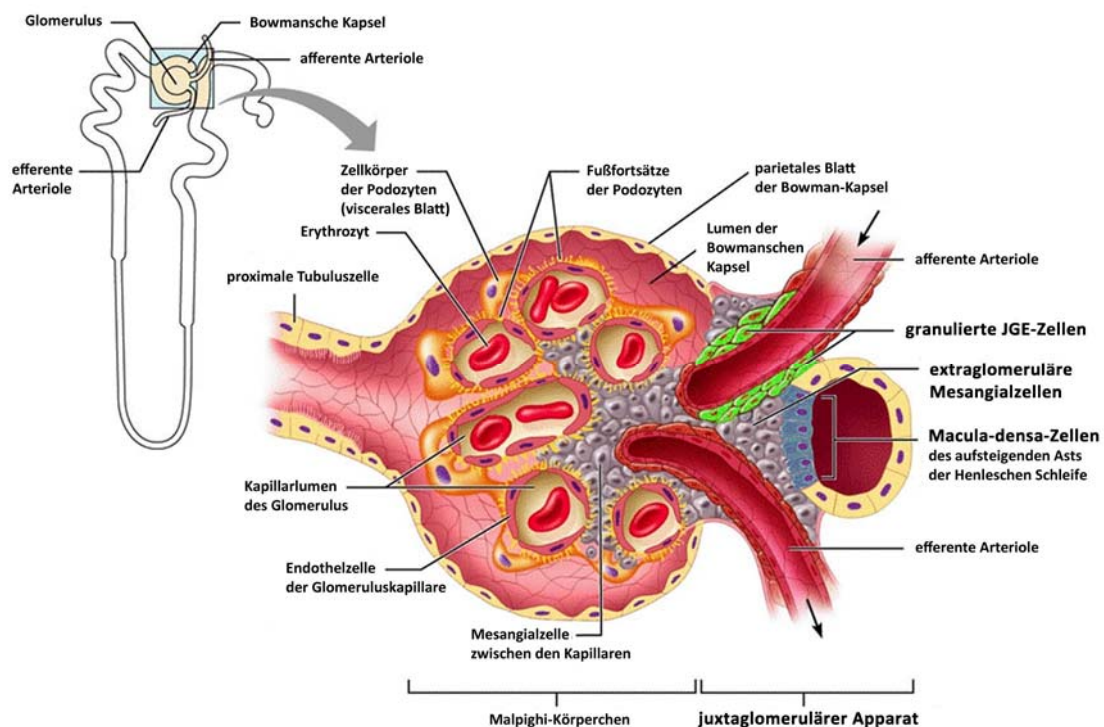


Abb.1.2 Schematische Darstellung eines Glomerulums mit detaillierter Beschreibung des juxtaglomerulären Apparats

(Grafik aus <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio211/chap25/chap25.htm>)

Die nierenspezifische Reninsynthese und -sekretion wird durch verschiedenste systemische und intrarenale Faktoren dirigiert. Auf Zellebene betrachtet, stellen hier die sekundären Messenger Ca^{2+} , cGMP sowie cAMP die wichtigsten Regulatoren dar. Der sekundäre Botenstoff cGMP kann sowohl stimulierend als auch inhibierend auf das RAAS einwirken (Wagner C. et al., 1998a; Kurtz A. et al., 1998; Beierwaltes WH., 2010). Der cAMP-Signalweg gilt mit der Aktivierung von $\text{Gs}\alpha$ und Proteinkinase A (PKA) als klassischer Stimulator des Reninsystems, Ca^{2+} hemmt es dagegen. Anders als bei den meisten sekretorischen Zellen führt ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zur Inhibition der Reninsekretion. Dieses

Phänomen wird auch als Calciumparadoxon der Reninfreisetzung bezeichnet (Schweda & Kurtz, 2004; Grünberger C. et al, 2006; Peters & Clausmeyer, 2002; Persson PB.; 2003).

1.3. Die Regulation der renalen Reninaktivität

Die Regulation der Reninexpression ist äußerst komplex. Auf Organebene gilt das sympathische Nervensystem, das über β_1 -Rezeptoren zur Reninproduktion und -freisetzung anregt, als wohl wichtigster systemischer Stimulator. Andere systemische Regulatoren wie die Kochsalzzufuhr die ANGII-Konzentration im Blut und auch der Blutdruck wirken dagegen mit negativen Feedback-Mechanismen hemmend auf das Reninsystem (Schnermann J., 1998; Holmer S. et al., 1993; Bader & Ganten, 2000; Schweda F. et al., 2005; Kurtz & Wagner, 1998). Bei der lokalen Kontrolle zur Reninregulation sind besonders der Macula-densa-Mechanismus als tubulärer Chloridsensor, der Perfusionsdruck in der Nierenarterie und endotheliale Faktoren wie Stickstoffmonoxid und Prostaglandin E_2 , von entscheidender Bedeutung (Kurtz & Wagner, 1998).

1.4. Reninzellrekrutierung im Verlauf der Nephrogenese

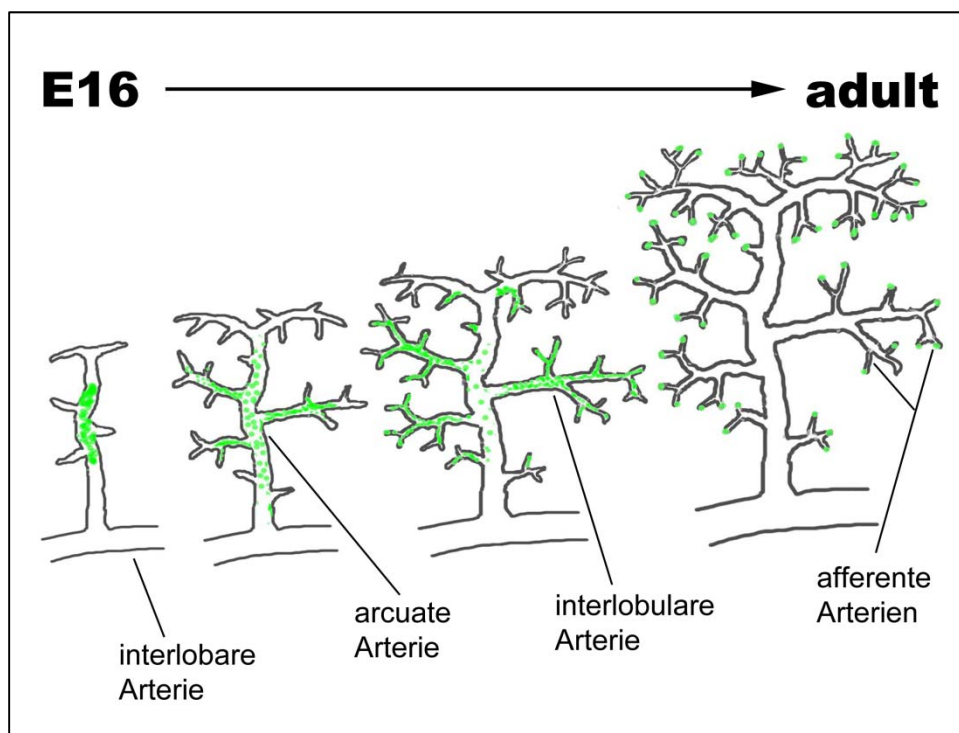
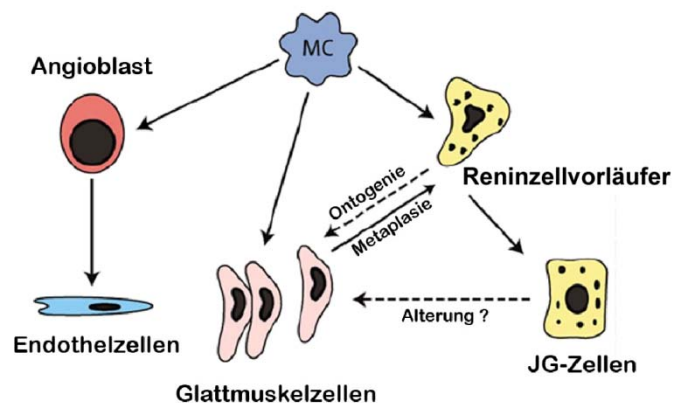


Abb.1.3 Schematische Darstellung der Nierengefäßbaumentwicklung und Reninzellrekrutierung (in grün) während der Nierenreifung von E16 bis adult. (Mit freundlicher Genehmigung von Dominik Steppan zur Verfügung gestellt).

Die Lokalisation von Reninzellen an ihrer klassischen juxtaglomerulären Position in der Tunica Media der afferenten Arteriolen ist zwar typisch für die ausgereifte Niere, variiert jedoch während der Nephrogenese in einem für Säugetiere uniformen Muster (*Carbone GM. et al. 1993; Gomez RA. et al., 1989; Graham PC. et al., 1992; Kon Y. et al., 1994; Minuth M. et al., 1981; Castrop H. et al., 2010*). In **Abb.1.3** sind schematisch die Entwicklung des Gefäßbaums und die Reninzellrekrutierung im Verlauf der Nierenreifung gezeigt.

Nach Vaskularisierung der Niere lassen sich Renin bildende Zellen zunächst in der Wand großer arterieller Gefäße finden. Mit fortschreitender Nierenreifung folgen sie dann dem sich entwickelnden Gefäßsystem in Richtung kleinerer Arterien, ziehen sich dabei zunehmend aus den großen Gefäßen zurück, bis sie schließlich den vaskulären Pol am Glomerulus und damit ihre klassische juxtaglomeruläre Position im Adultstadium erreicht haben (*Sauter & Machura et al., 2007; Minuth M. et al., 1981; Gomez AR. et al., 1989 & 1999*).

Abb.1.4 Abstammung der JG-Zellen. Dargestellt sind methanephrotische Mesenchymzellen (MC) als Ursprung vaskulärer Glattmuskelzellen sowie der Reninzellvorläufer und der Endothelzellen, die von Angioblasten abstammen. Während der Ontogenese können sich Reninzellvorläufer in JG-Zellen und zu einer Subpopulation von Glattmuskelzellen entwickeln. Diese speziellen Glattmuskelzellen besitzen die Fähigkeit, über metaplastische Verformung wieder in Reninzellen überzugehen (nach *Sequeira Lopez ML. et al., 2001*).



Welche Zellen im Laufe der Nephrogenese die Fähigkeit zur Reninproduktion erlangen, ist unklar. Auch deren Herkunft ist bislang nicht bekannt. Eine Hypothese besagt, dass Reninzellen ohne nierenspezifische Induktion in extrarenalen Gefäßwänden ihren Ursprung finden und im Verlauf der renalen Vaskularisierung in die fötale Niere eingeschleust werden (*Richoux AS. et al. 1987, Fuchs S. et al. 2002*). Da sich während der Embryonalentwicklung Renin bildende Zellen bereits noch vor Vaskularisierung der Niere im undifferenzierten Blastem des Metanephros finden lassen, geht eine andere Hypothese (**Abb.1.4**) davon aus, dass Renin produzierende Zellen von Progenitorzellen des renalen Metanephros abstammen (*Sequeira Lopez ML. et al., 2001, Reddi V. et al., 1998*). Embryonale Reninzellen können Vorläufer anderer nicht Renin exprimierender Zelltypen sein. Deshalb führt eine Inhibition der Generierung Renin bildender Zellen zu schweren Entwicklungsstörungen der Gesamtniere (*Sequeira Lopez ML. et al., 2004; Pentz ES. et al., 2004*). Welche Faktoren dieses charakteristische An- und Abschalten der

Reninexpression im Zuge der Nierenreifung verantworten, ist bislang noch weitestgehend ungeklärt. Neueste Daten lassen allerdings vermuten, dass Chromatinremodellierung und cAMP zur Erlangung und Aufrechterhaltung des Reninzellcharakters eine wesentliche Bedeutung besitzen (*Pentz ES. et al., 2008*).

1.5. Aspekte zur Rekrutierung Renin bildender Zellen in der adulten Niere

Interessanterweise können Zellen, die während der Nierenentwicklung einmal zur Synthese von Renin befähigt waren, diese auch im Adultstadium wiederaufnehmen (*Sequeira Lopez ML. et al., 2004*). In der adulten Niere stellen JG-Zellen nur eine sehr kleine Zellpopulation von myoepithelialen Zellen in der Tunica Media der afferenten Arteriolen dar. Dabei ist die Anzahl an Renin produzierenden Zellen sehr variabel. Sie sinkt im Allgemeinen mit zunehmendem Alter und unterliegt je nach Reninbedarf teils drastischen Schwankungen. Chronische Stimulation des Reninsystems wie Salzdepletion, Nierenarterienstenose oder ACE-Inhibition führt zu einer retrograden Rekrutierung Renin bildender Zellen in den afferenten Arteriolen bis hin zu den interlobularen Arterien. Dies geschieht in einer bislang noch unverständenen diskontinuierlichen Weise, bei der sich reninpositive mit reninnegativen Zellen in einem streifen- bzw. bandähnlichen Muster abwechseln (*Fuchs S. et al., 2002; Kurtz & Wagner, 1998*). Man geht davon aus, dass Glattmuskelzellen der Gefäße durch reversible metaplastische Verformung die Eigenschaft zur Reninsekretion erlangen (*Cantin M. et al., 1977; Sequeira Lopez ML. et al., 2001*). Eine Studie von *Sequeira Lopez ML. et al.* aus dem Jahre 2004 zeigte, dass nicht alle glattmuskelzellähnlichen Zellen diese Umwandlung durchlaufen können, sondern nur solche, welche schon während der frühen Entwicklung genetisch dazu vordeterminiert wurden. Welche Regulationsmechanismen diesem schon seit langem bekannten Phänomen der Rekrutierung von Reninzellen in der adulten Niere auf Organ-, Zell- und molekularer Ebene zu Grunde liegen, ist jedoch offen.

Auch die Herkunft der Reninzelle konnte noch nicht eindeutig festgelegt werden. Lange Zeit wurde angenommen, dass JG-Zellen aufgrund der in ihnen enthaltenen Myofilamente metaplastisch modifizierte Glattmuskelzellen (SMC) sind (*Taugner & Hackenthal, 1989; Taugner R. et al., 1984; Barajas L., 1979; Kurtz & Wagner, 1998*). Neuere Untersuchungen zur Aufklärung der Abstammung Renin exprimierender Zellen (**Abb.1.4**) lassen jedoch vermuten,

dass es sich dabei nicht um Glattmuskelzellen per se handelt. Dagegen wird angenommen, dass diese Zellen ihren Ursprung vielmehr in einer Vorläuferzellform finden, welche auch in eine Reihe nicht Renin bildenden Zelltypen wie SMCs, Mesangial- oder extrarenalen Zellen weiter differenzieren kann (*Sequeira Lopez ML. et al., 2001*).

2. Prostaglandine und das Renin-Angiotensin-System

Die Prostaglandine (PGs) PGI_2 und PGE_2 , welche über Prostanoidrezeptoren wirken, gelten als wichtige direkte Stimulatoren der Reninsynthese und -sekretion. *In-vitro*-Studien an deletionsmutanten Mäusen einzelner Prostaglandinrezeptoren konnten belegen, dass zur Vermittlung des PG-Stimulus auf die Reninzelle, speziell die Prostanoidrezeptoren EP2, EP4 und IP eine wichtige Rolle spielen. Diese leiten das Signal G_s -Protein gekoppelt ins Zellinnere weiter, was zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und letztendlich zur Sekretion von Renin führt (*Castrop H. et al., 2010; Friis UG. et al., 2005; Fujino T. et al., 2004; Jensen BL. et al., 1996; Schweda F. et al., 2004; Breyer & Breyer, 2000*).

2.1. Allgemeine Prostaglandincharakterisierung und -wirkungsweise

Allgemein umfassen die Prostaglandine (Prostanoide) eine mannigfaltige Familie von Autacoiden aus dem Cyclooxygenase (COX) katalysierten Arachidonsäuremetabolismus. Freie Arachidonsäure, abgespalten von Membranphospholipiden, wird dabei in einer zweistufigen enzymatischen Reaktion zunächst in das instabile Zwischenprodukt PGH_2 umgewandelt. PGH_2 wird mit Hilfe spezieller Synthasen dann in die verschiedenen biologisch aktiven und stabileren Prostanoidformen metabolisiert. Die fünf Prostanoidvertreter sind PGE_2 , Prostacyclin (PGI_2), $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 sowie Thromboxan A_2 (TxA_2). Jedes dieser Prostaglandine wirkt über einen spezifischen G-Protein-gekoppelten Zelloberflächenrezeptor. Es wird angenommen, dass Prostanoide in allen wichtigen Organsystemen wie dem Kardiovaskularsystem, dem Gastrointestinaltrakt, dem Reproduktions- oder renalen System in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine Rolle spielen. In der Niere können sie sowohl auf parakrine als auch auf autokrine Weise wirksam werden und sind an der Regulation der Salz-Wasser-Homeostase, des Gefäßtonus und hormoneller Prozesse beteiligt (*Harris RC. 2008; Hao & Breyer, 2008; Nasrallah R. et al., 2007*).

2.2. Prostaglandinbiosynthese – Cyclooxygenasen, als Schlüsselenzyme

Als Schlüsselenzym und geschwindigkeitsbestimmender Faktor der Prostaglandinbiosynthese spielt COX, auch bekannt als Prostaglandinsynthase G_2/H_2 (PTGS), eine zentrale Rolle in der Bereitstellung der verfügbaren Prostanoidmenge. Damit ist PTGS entscheidend an der Regulation der über Prostaglandine vermittelten Prozesse beteiligt. Es gibt zwei klassische Cyclooxygenaseisoformen, COX-1 (PTGS1) und COX-2 (PTGS2), welche zwar eine 60% -ige Homologie aufweisen, jedoch Produkte zweier unterschiedlicher Gene sind und sich sowohl in ihren Expressionsmustern als auch in ihrer Regulation unterscheiden. Eine putative dritte Isoform, COX-3 als Spleißvariante von COX-1, wird derzeit noch diskutiert (*Chandrasekharan NV. et al., 2002*). COX-1 wird überwiegend konstitutiv exprimiert und katalysiert die Produktion von Prostaglandinen, die alltägliche physiologische Funktionen in Organen wie der Niere, im Gastrointestinaltrakt und in Thrombozyten koordinieren und modellieren. Basierend auf ihrer weiten Verbreitung in den unterschiedlichsten Geweben, gilt COX-1 im Allgemeinen als die konstitutive, COX-2 dagegen als die induzierbare Isoform. Verglichen mit COX-1 ist die COX-2-Expression basal zwar weitaus spezifisch begrenzter, reagiert aber dafür enorm auf inflammatorische und proliferative Stimuli. Von COX-2 generierte Prostaglandine gelten außerdem als zentrale Regulatoren von physiologischen Ereignissen während der Entwicklung, des Zellwachstums und bei Entzündungen (*Khan KN. et al., 1998; Cheng & Harris, 2003*).

2.3. COX-Expression in der Niere

In der Niere werden beide Isoformen, sowohl COX-1 als auch COX-2, konstitutiv exprimiert. COX-1 wird in glomerulären Mesangialzellen, vaskulären Endothelzellen, parietalen Epithelzellen der Bowman-Kapsel und Zellen des kortikalen sowie medullären Sammelrohrsystems synthetisiert (*Komhoff M. et al., 1997; Cheng & Harris, 2004*). In den Spezies Maus, Ratte, Kaninchen, Hund und Mensch wird COX-2 in der Macula densa und Interstitialzellen der Medulla gebildet. Tiefergreifende Studien an Ratten- und Kaninchennieren zeigten außerdem eine COX-2-Expression in an die Macula densa angrenzenden tubulären Zellen im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (*Castrop H. et al., 2010; Vio CP. et al., 2001*). In der humanen Niere finden sich zusätzlich geringe, aber detektierbare Mengen an COX-2 in den Podozyten und Glattmuskelzellen der Arteriolen

(Harris RC. et al., 1994; Komhoff M. et al., 1997; Khan KN. et al., 1998; Campean V. et al., 2003; Harris RC., 2006).

2.4. COX-2 als potenter Regulator des RAAS

Es ist bekannt, dass die Macula-densa-(MD)-Zellen sowohl im Mensch als auch im Nager neben COX-2 auch die PGE₂-Synthase besitzen. Diese ist zur Bildung von PGE₂ essentiell (Campean V. et al., 2003; Therland KL. et al., 2004). Nicht nur ihre Lokalisation in unmittelbarer Nähe der JG-Zellen lässt vermuten, dass von COX-2 stammende Prostaglandine an der Signalvermittlung zwischen epithelialer Macula densa und vaskulären Renin sekretierenden JGE-Zellen beteiligt sind. Die Regulation der maculären COX-2-Expression unterliegt den gleichen physiologischen Parametern und geht im Normalfall mit Änderungen der Aktivität des Renins einher. Sowohl die Bildung des Renins als auch die PTGS2-Produktion ist stark von der tubulären Salzkonzentration, ANGII und dem Blutdruck abhängig (Schweda F. et al., 2003; Wagner C. et al., 1998b; Wagner C. et al., 2000). Peti-Peterdi et al. (2003) konnten unter Verwendung von Biosensorzellen in ihren Versuchen eine Freisetzung von PGE₂ aus MD-Zellen als Reaktion auf eine verringerte luminale NaCl-Konzentration belegen. Bei Nidrigsalzdiät, gesenktem renalen Perfusionsdruck, unter chronischer Gabe von Schleifendiuretika oder bei Barttersyndrom-Patienten konnte eine gesteigerte COX-2-Expression festgestellt werden. Ähnliche Befunde lieferten Studien mit ACE-Inhibitoren und ANGII-AT1-Rezeptorantagonisten (Cheng HF. et al., 1999; Cheng HF. et al., 2001). Ein weiterer aussagekräftiger Beleg für das enge Zusammenspiel des RAAS mit PTGS2 ist die Tatsache, dass klassische Manöver zur Stimulation der Reninproduktion bei fehlender COX-2-Aktivität z.B. in Knockoutmäusen und bei selektiver pharmakologischer Inhibition fehlschlagen oder nur einen sehr schwachen Effekt erzielen. Bei fehlender COX-1-Expression konnte dies nicht beobachtet werden (Cheng HF. et al., 2001; Cheng HF. et al., 2002; Yang T. et al., 2000).

3. Der Differenzierungsfaktor TGF- β , dessen Rezeptor TGF- β RII und das RAAS

Einige Studien geben Anstoß zur Annahme, dass auch der Differenzierungsfaktor TGF- β (transforming growth factor beta), im Speziellen seine Isoformen TGF- β 1 und - β 2, mit dem Renin-Angiotensin-System interagieren (*Kashiwagi M. et al., 2000, Liu & Ballermann, 1998*). Bereits 1991 beschrieben *Horikoshi et al.* im Rahmen von Versuchen mit Mäusen unter Trinkwasserentzug einen deutlichen Anstieg sowie eine Ansammlung und Kolokalisation von TGF- β 2 und Renin in JGE-Zellen in der Glattmuskelzellschicht von interlobularen Arterien. Vergleichbares zeigte sich auch bei Ratten unter Dehydration, Kaliumdepletion oder unter ACE-Inhibition (*Ray PE. et al., 1993*). In Kindern mit Hypertrophie des juxtaglomerulären Apparates, verursacht durch Nierenarterienstenose und ischämischer akuter Nierenschädigung, konnte eine gesteigerte TGF- β 2-Expression beobachtet werden (*Ray PE. et al., 1994*).

3.1. Die TGF- β initiierte Signaltransduktionskaskade

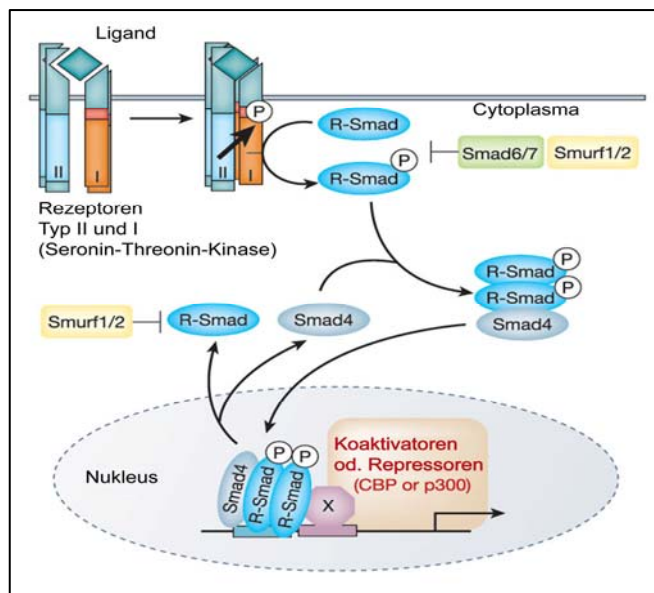


Abb.1.5 Allgemeiner Mechanismus der TGF- β -Rezeptor- und Smad-Aktivierung

(nach Derynck R. & Zhang YE., 2003).

TGF- β s zählen zur Superfamilie TGF- β , welche außerdem die BMPs (**b**one **m**orphogenetic **p**roteins), Aktivine und mit ihnen verwandte Proteine umfasst. Von TGF- β selbst sind drei Isoformen beschrieben (TGF- β 1-3), welche alle auch in der Niere exprimiert werden (*Ando T. et al., 1998*). Allgemein spielen sie eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellfunktionen sowie bei der Entwicklung, z.B. bei der Angiogenese oder Zelldifferenzierung, und stehen

deshalb in Verbindung mit Tumorgenese. Die Weiterleitung von TGF- β generierten Signalen erfolgt über zwei verschiedene Transmembranrezeptoren mit Seronin-Threonin-Kinase-Aktivität, den TGF- β -Rezeptor-Typen I und II (TGF- β RI und -RII). Im Zuge der Signaltransduktion

(Abb.1.5) kommt es, induziert durch Ligandenbindung, zur Dimerisierung von Typ I, auch bekannt als ALK (activin like kinase 1-7), und Typ-II-Rezeptoren. Die Bildung dieses heterodimeren Komplexes an der Zelloberfläche ermöglicht nun der Rezeptorkinase des Rezeptors Typ II die Transphosphorylierung der Rezeptor-I-Kinasedomäne, was diese wiederum zur Phosphorylierung von Smad-Proteinen und damit zur Aktivierung der Smad-Protein-Kaskade befähigt. Es handelt sich dabei um eine lineare Signalweiterleitung, ausgehend vom Typ-II-Rezeptor über Typ-I-Rezeptor und den Smads, welche letztendlich zu einer ligandinduzierten Transkription im Nukleus führt (*Attisano & Wrana, 2002; Shi & Massagué, 2003; Yingling JM. et al., 2004; Derynck & Zhang, 2003; Carvalho RL. et al., 2004; Oshima M. et al., 1996*).

3.2. Der TGF- β -Rezeptor-Typ II in Renin bildenden Zellen

Die unterschiedlichen Differenzierungsfaktoren besitzen, je nachdem welches Signal sie vermitteln, verschiedene Kombinationen von bestimmten Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren. Auch die Bildung oligomerer Smadkomplexe und diverse sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren, mit denen sie interagieren können, erhöhen die Variabilität dieses Systems und bilden auf diese Weise mit die Grundlage zu einer zell-, organ und kontextabhängigen Regulation (*Attisano & Wrana, 2002*). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl TGF- β -Rezeptor-Typ I als auch -Typ II in der Niere in Endothelzellen des Glomerulus, Mesangial- und Epithelzellen, sowie im Tubulus exprimiert werden (*MacKay K. et al., 1989; Shankland SJ. et al., 1996*). Unter pathologischen Bedingungen ändert sich dieses Expressionsmuster (*Ando T. et al., 1998*). Bei experimentieller membranöser Nephropathie beispielsweise lässt sich TGF- β RI- und -RII-Expression verstärkt in glomerulären Epithelzellen beobachten (*Shankland SJ. et al., 1996*).

Rezeptorexpressionsstudien an Mäusen während der Entwicklung und im Adulttier, bei denen eine starke TGF- β RII-Expression in Renin bildenden Zellen nachgewiesen werden konnte, implizieren, dass ein von TGF- β RII transduziertes Signal im Zusammenhang mit dem RAAS stehen könnte (*Liu & Ballermann, 1998*).

4. Zielsetzung: Untersuchung von COX-2 und TGF- β als potentielle Faktoren zur Steuerung der Reninzellrekrutierung

Sowohl die COX-2- als auch die TGF- β RII-Expression unterliegen, wie die des Renins, während der Nephrogenese starken sequentiellen Schwankungen, wobei die des TGF- β RII sogar auf weiten Strecken mit der des Renins korreliert (*Stubbe J. et al.; 2003; Liu & Ballermann., 1998*). Auch wird die Synthese von Renin, COX-2 und TGF- β 2 (ein Ligand des TGF- β RII) durch gleiche physiologische Prozesse modelliert. TGF- β ist entscheidend an der Ausbildung von Gefäßen beteiligt (*Karamysheva AF., 2008*). Es wird außerdem vermutet, dass TGF- β die Differenzierung von Perizyten beeinflusst. Diese Zellen gehören wie die Glattmuskelzellen zu den muralen Zellen. Man geht derzeit davon aus, dass beide Zelltypen der gleichen Zelllinie entstammen (*Armulik A. et al., 2005; Gaengel K. et al., 2009*). Bei der Rekrutierung Renin bildender Zellen spielen glattmuskelzellähnliche Zellen eine zentrale Rolle. Basierend auf einer gemeinsamen Abstammung könnte TGF- β in der Reninzelle, im Speziellen der TGF- β -Rezeptor II, von Bedeutung sein. COX-2 dagegen wirkt über den cAMP-Signalweg. Neueste *In-vivo*-Studien lassen darauf schließen, dass eine intakte cAMP-Kaskade essentiell für die Reninexpression während der Entwicklung ist (*Neubauer B. et al., 2009*).

Eine Involvierung beider Faktoren, COX-2 und TGF- β RII, in den bislang weitestgehend unaufgeklärten Steuermechanismus der Reninzellrekrutierung, während der Nephrogenese aber auch in der adulten Niere, ist daher durchaus denkbar. Eingehende Untersuchungen zur Reninexpression in COX-2 defizienten sowie an reninzellspezifisch deletierten TGF- β RII Mäusen sollen daher Aufschluss bringen, ob und – wenn ja – inwieweit ein Fehlen dieser Faktoren das Phänomen der Reninzellrekrutierung beeinflusst. Um möglichst detaillierte Aussagen über die Reninzellverteilung machen zu können, wird hauptsächlich nach der bereits von *Sauter & Machura* (2008) etablierten Methode zur Erstellung von dreidimensionalen (3D-) Modellen arterieller Nierengefäßbäume gearbeitet. Diese ermöglicht eine weitaus konkretere Bestimmung des Reninexpressionsmusters im vaskulären System als es die herkömmliche zweidimensionale Betrachtungsweise zulässt. Mit Hilfe dieser Studie sollen neue Einblicke und Erkenntnisse in die Regulations- und Rekrutierungsmechanismen des Reninsystems gewonnen werden.

MATERIAL & METHODEN

1. Material

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
Kryotom	CM 3050S, Leica, Wetzlar
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
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, Hechtlingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen Multidrive XL, Pharmacia, Ratingen
UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
UV-Spektrometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H UniEquip, Martinsried
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen
Wärmeblöcke	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/I
Wasserbäder	Modell W13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel

Zentrifugen

Labofuge 400, Heraeus, Hanau
Biofuge haemo, Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

1.2. Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Augenfäden 7/0 USP 0,5 EP DSS10	Serag-Wiessner, Naila
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Hämatokritkapillaren	Brandt, Wertheim
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Kanülen 0,4 x 19mm	BD Drogheda, Dublin, Irland
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 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

1.3. Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf

Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100 bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Frankfurt am Main
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen,
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
First-Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen,
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/μl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x bzw. Colorless, 5x	Promega, Mannheim
H₂O₂ 30%	Merck, Darmstadt
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin® 25000 (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl₂-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
K₂HPO₄ x 2 H₂O	Merck, Darmstadt
KH₂PO₄	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt

MgCl₂	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Na₂HPO₄ x 12 H₂O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt,
Natriumchlorid, NaCl	Merck, Darmstadt
Nuklease freies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT)₁₅ Primer, 0,5 μg/μl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylhydrazin Hydrochlorid, C₆H₈N₂ x HCl	Sigma, Deisenhofen
RENCTK (Angiotensin I Radioimmunoassay)	DiaSorin, Saluggia, Italien
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNasin Ribonuclease Inhibitor, 40 U/μl	Promega, Mannheim
Sevofluran SEVOrane®	Abbott, Wiesbaden
SYBR® Green PCR Kit	Roche, Mannheim
Tissue-Tek®	Sakura, NL
TRIzol-Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

1.4. Puffer und Lösungen

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

1.4.1. Immunhistochemie

Fixierlösung (Methyl-Carnoy-Lösung)

Methanol	60%
Chloroform	30%
Eisessig	10%

Fixierlösung für Perfusion

PBS (Phosphate Buffered Saline)	
Paraformaldehyd	3%

PBS-(Phosphate Buffered Saline) Puffer

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 (Bovine Serum Albumin)	1%

Blockierlösung

PBS-Otto-Puffer	
BSA (Bovine Serum Albumin)	1%
HS (Horse Serum)	10%

1.4.2. Molekularbiologie

Agarosegel

TBE	
Agarose	2%

DEPC-H₂O

1/1000 Vol. DEPC in ddH₂O, schütteln,
üN geöffnet unterm Abzug stehen lassen, dann autoklavieren

Ethidiumbromidlösung

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

Maleatpuffer

TRIS	1,22%
Maleinsäure	1,74%
EDTA	0,89%
	add 1L

NaOH zur gDNA-Extraktion

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

6x Loading Dye

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

10x TBE

Tris	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	0,02 M

Tris HCl zur gDNA-Extraktion

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

1.5. Oligonukleotide

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

Primer für Genotypisierung:

COX-2 -/-:	5'-GCC-CTG-AAT-GAA-CTG-CAG-GAC-G-3'
	5'-CAC-GGG-TAGCCA-ACG-CTA-TGT-C-3'
	5'-CAC-CAT-AGA-ATC-CAG-TCCGG-3'
	5'-ACC-TCT-GCG-ATG-CTC-TTC-C-3'
TGF-βRIIfloxflox	5'-GCA-GGC-ATC-AGG-ACC-TCA-GTT-TGA-TCC-3'
	5'-AGA-GTG-AAG-CCG-TGG-TAG-GTG-AGC-TTG-3'
Ren 1d (468):	5'-GTA-GTA-GAA-GGG-GGA-GT-3'
Ren 1d (653):	5'-GAA-GGA-GAG-CAA-AAG-GT-3'
Cre (400):	5'-TTG-GTG-TAC-GGT-CAG-TAA-3'
TGF-βRIIfloxflox : Deletionsprimer (nach Chytil A., 2002)	5'-TAA-ACA-AGG-TCC-GGA-GCC-CA-3'
	5'-AGA-GTG-AAG-CCG-TGG-TAG-GTG-AGC-TTG-3'

Primer für mRNA-Analysen:

GAPDH	5'-ATG CCA TCA CTG CCA CCC AGA AG-3' 5'-ACT TGG CAG GTT TCT CCA GGC GG-3'
Renin	5'-ATG AAG GGG GTG TCT GTG GGG TC-3' 5'-ATG CGG GGA GGG TGG GCA CCT G-3'
COX-2:	5'-ACAACAACCTCCATCCTCCTG-3', 5'-AGCCATTCCTTCTCTCCTG-3'
TGF-βRII	5'- CGCTTCGCCGAGGTCTACAA 3' 5'-GGCCAGGTCATCCACAGACA 3'

1.6. Antikörper

Antikörper	Art	Hersteller
Chicken Anti-Renin (murine) IgG	Primärantikörper	Davids Biotech, Regensburg
Mouse Anti-αSMA (murine) IgG	Primärantikörper	Beckman Coulter, München
Rabbit Anti-COX-2 (murine) IgG	Primärantikörper	Cayman Chemical Michigan, USA
Mouse Anti-Wilms' Tumor 1 Protein (human) IgG	Primärantikörper	Dako, Hamburg
Sheep Anti-Tamm Horsfall Glycoprotein (human) IgG	Primärantikörper	Bio Trend, Köln
Goat Anti-K-cadherin (human) IgG	Primärantikörper	Santa Cruz Biotechnology. Inc, Heidelberg
Mouse Anti-Calbindin D-28K IgG	Primärantikörper	Swant, Marly, Schweiz
Donkey Anti-Chicken IgY TRITC-conjugated	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg
Donkey Anti-Chicken IgY Cy2-conjugated	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg
Donkey Anti-Mouse IgG Cy2-conjugated	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg

Donkey Anti-Mouse IgG Cy5-conjugated	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg
Donkey Anti-Rabbit IgG TRITC-conjugated	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg
Donkey Anti-Goat IgG Cy5-conjugated	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg

1.7. Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office 2007* verfasst. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit *Adobe Photoshop CS4* und *ImageJ* (Wayne Rasband. NIH. USA). Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 5* und *Microsoft Office XP* erstellt. Bei der Literaturrecherche half PubMed von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Zur Proteinsequenzrecherche wurde die Datenbank UniProtKB von EMBL-EBI UK zu Hilfe genommen (<http://www.ebi.ac.uk/embl>).

Zur Mikroskopie wurde *AxioVision Rel.4.5.* von Zeiss und für die 3D-Rekonstruktion *Amira 4.1.2 visualization software* (Mercury Computer Systems, Inc., USA) verwendet.

2. Methoden

2.1. Versuchstiere

Sämtliche Nierenproben der homozygoten COX-2-Knockoutmäuse erhielten wir aus einer Kooperation mit freundlicher Unterstützung von *Kirsten Madsen (University of Southern Denmark, Odense, Denmark; Department of Physiology)*.

Homozygote COX-2-Knockoutmäuse und deren Wildtypkontrollen (WT) stammen aus einer Heterozygot x Heterozygot-Verpaarung. Für die Versuche wurden als Kontrollen Geschwister-tiere verwendet. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR-Analyse von DANN, isoliert aus Schwanzbiopsieproben. Die Versuchstiere wurden von *Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA* erworben und hatten einem gemischten genetischen Hintergrund (C57Bl/6 und 129Sv). Diese Mäuse wurden erst nach einer systemisches Rückkreuzung (6-7 Generationen) in den C57Bl/6-Stamm zu Experimenten verwendet.

Zur Erstellung der Wildtypentwicklungsserie wurden C57Bl/6-Mäuse benutzt, welche von *Charles River, Sulzfeld* bezogen wurden.

Zur Generierung der reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmaus wurde das *Cre/loxP* - Rekombinase-System verwendet. Dazu wurden zunächst Cre^{Ren1d}-Mäuse (mit freundlicher Genehmigung von *Ariel Gomez, University of Virginia* erhalten) mit kommerziell erworbenen TGF- β RIIfloxflox Mäusen (von *EMMA-The European Mouse Mutant Archive, nach Chytil A. et al., 2002*) gekreuzt. Die Tiere besaßen einen gemischten genetischen Hintergrund aus 129Sv und C57Bl/6. Für die Versuche wurden heterozygote TGF- β RII RenCrefloxflox Mäuse benutzt, die sowohl ein funktionsfähiges Ren1d-Gen als auch ein Cre^{Ren1d} trugen benutzt. Für die Versuche wurden zunächst RenCrefloxflox Männchen mit homozygoten RenRenfloxflox Weibchen verpaart, so dass die RenRenfloxflox Geschwistertiere als Kontrollen zu den konditionalen RenCrefloxflox Knockouts dienen konnten. Die Genotypisierung erfolgte mittels einer PCR durch die Analyse der genomischen DNA, isoliert aus der Schwanzspitze.

Alle Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien des *National Institute of Health guidelines for the care and use of animal research* durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Es wurde stets auf optimale Haltungparameter für Nager geachtet (Temperatur 23°C \pm 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% \pm 5%, Hell-Dunkelintervall 12h, Futter und Wasser ad libitum).

2.2. *In-vivo*-Studien

2.2.1. Untersuchungen an sich entwickelnden Mausnieren

Zur Untersuchung des Reninexpressionsmusters während der Entwicklung wurden sowohl für die Rekonstruktion, als auch zur Messung der Reninabundanz Mäuse aus repräsentativen Entwicklungsstadien benötigt. Um das entsprechende Entwicklungsstadium exakt bestimmen zu können, wurden die Mäuse zeitlich verpaart. Die Zuchtpaare wurden 24h nach Zusammensetzen wieder getrennt. Der Trennungstag wurde dabei als Embryonaltag 1 gewertet. Für sämtliche Untersuchungen war $n \geq 3$ pro Entwicklungszeitpunkt und Versuchsgruppe (Knockout- und Wildtypkontrollgruppe).

Zur Entnahme der fötalen Nieren wurde das Muttertier zunächst mit Sevofluran anästhesiert und durch Genickbruch getötet, danach wurden die Nieren der Embryos entnommen. Zur

Präparation der postpartalen Nieren wurden die Jungtiere zuerst mit Sevofluran betäubt und dann durch Genickbruch getötet. Alle Nieren wurden schnellstmöglich entnommen. Es diente je eine Niere pro Tier zur molekularbiologischen, die 2. Niere zur histologischen Untersuchung. Die Nieren zur RNA-Isolation wurden in Flüssigstickstoff gefroren und bis zur späteren RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Die Nieren für histologische Versuche wurden direkt nach Entnahme in eine Fixierlösung überführt.

Gewebefixierungen für histologische Untersuchungen:

Die Nieren zur Rekonstruktion der COX-2 Knockoutstadien wurden sofort nach Entnahme in Methyl-Carnoy-Fixierlösung überführt und darin mind. 24h bei 4°C fixiert.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen zur COX-2-Lokalisation im Wildtyp während der Entwicklung war eine Perfusion des Nierengewebes notwendig. Bei den Untersuchungen an den TGF- β RII-RenCrefloxflox und RenRenfloxflox Mäusen war eine Perfusion Standard.

Die Nieren (ab E16-pp14) wurden durch Perfusion mit Paraformaldehyd (3%) in PBS fixiert. Dazu wurden die Tiere zunächst durch Genickbruch getötet und das Abdomen geöffnet. Nach dem Abbinden und Entnehmen der linken Niere zur RNA-Isolation und Resektion des Leberlappens (als Abfluss) wurde der Brustbereich geöffnet. Perfundiert wurde mit Hilfe einer Kanüle über den linken Herzventrikel. Zunächst wurde mit 5ml isotoner NaCl-Lösung und 10l.E. Heparin gespült. Danach erfolgte die Fixierung mit frisch hergestelltem Paraformaldehyd (3%) in PBS. Der Fluss wurde dabei konstant bei 10ml/1,5min gehalten. Nach Entnahme der perfundierten Nieren wurde je eine halbe Niere zur Paraffineinbettung in 70% Methanol bei 4°C aufbewahrt und eine halbe für Kryoschnitte in Tissue-Tek® über Flüssigstickstoff eingebettet und bei -80°C gelagert.

2.2.2. Versuche an adulten Mäusen

Die Mäuse für die molekularbiologischen wie auch histologischen Untersuchungen am Adultstadium waren im Alter von 90-120 Tagen. Für die Stimulationsversuche wurden die Knockoutmäuse und Wildtypkontrollmäuse in je 2 Versuchsgruppen ($n \geq 4$) eingeteilt.

Kontrollgruppe: Die Kontrolltiere erhielten Standardfutter (Na^+ 0.6% w/w) und blieben unbehandelt.

LS + Enalapril: Zur Stimulation des Reninsystems wurden die Tiere 7 Tage unter Niedrigsalzdiät (LS, Na^+ 0.02% w/w) gehalten und erhielten ab dem 4. Tag zusätzlich den Angiotensin-Converting-Enzyme-(ACE)-Inhibitor Enalapril ($10\text{mgkg}^{-1}\text{Tag}^{-1}$) als Trinkwasserzusatz.

Probeentnahme für molekularbiologische Untersuchungen

Nach Beenden des Stimulationsprotokolls wurden die Mäuse mit Sevofluran tief anästhesiert und durch Dekapitation getötet. Unmittelbar folgend wurden Blutproben zur Plasmapreninbestimmung gesammelt. Die Abtrennung des Blutplasmas erfolgte mit einer Hämatokrit-Zentrifuge (5min, 12500g). Das Blutplasma wurde bis zu den Messungen bei -20°C gelagert.

Für die Analysen der renalen mRNA wurden dem getöteten Tier die Nieren schnellst möglich entnommen und in Flüssigstickstoff gefroren. Die Lagerung des Nierengewebes erfolgte bis zur Isolation der Total-mRNA bei -80°C .

Gewebefixierung für histologische Untersuchungen:

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 Bauchorta wurde die Aorta unterhalb des Abgangs 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. Danach erfolgte die Fixierung mit frisch hergestelltem Paraformaldehyd (3%) in PBS. Der Fluss wurde dabei konstant bei 40ml/3min gehalten. Nach Entnahme der perfundierten Nieren wurden diese bis zur Paraffineinbettung in 70% Methanol bei 4°C aufbewahrt.

2.3. Histologische Methoden

2.3.1. Anfertigung von Paraffinschnitten

Um autokatalytische Prozesse zu verhindern und zum besseren Erhalt der Gewebestruktur wurde das Nierengewebe direkt nach Organentnahme bzw. bereits davor durch PFA-Perfusion fixiert.

Zur Paraffineinbettung erfolgte zunächst eine schrittweise Entwässerung des Gewebes in einer Methanolreihe aufsteigender Konzentration [2x (70 %, 80 %, 90 %, absolut) je 30min]. Gespült wurde in absoluten Isopropanol 2x je 30min bei RT anschließend 30min bei 45°C. Dem folgend wurden die Nieren weitere 30min in einem Isopropanol/Paraffin-Gemisch (1:1; 55°C) belassen und dann 2x je 24h bei 60°C in Paraffin inkubiert. Abschließend wurden die Präparate in mit 60°C warmem Paraffin gefüllte Silikon-Kautschuk-Einbettförmchen überführt und zur Aushärtung eine Nacht bei Raumtemperatur belassen. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden dann Gewebeschnitte erstellt, in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt und abschließend auf Objektträger aufgezogen. Zur Rekonstruktion wurden 5µm dicke Folgequerschnitte angefertigt. Die Objekte wurden bei 40°C mind. 12h im Wärmeschrank getrocknet und in dieser Form gelagert.

Die Gewebeschnitte wurden bei 40°C mind. 12h im Wärmeschrank getrocknet und in dieser Form gelagert.

Unmittelbar vor der Färbung erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte in Xylol (abs., 2x 15min) dann Isopropanol (abs., 3x 5min) und Methanol (abs., 2x 5min).

2.3.2. Anfertigung von Kryoschnitten

Zur Erstellung von Kryoschnitten wurde in Tissue-Tek® eingebettetes Gewebe am Kryotom geschnitten. Es wurden 6µm dicke Gefrierschnitte nahe der Nierenmitte gelegen angefertigt und auf superfrost plus Objektträger aufgebracht. Vor dem Färben wurde das Gewebe kurz angetaut.

2.3.3. Immunhistochemische Färbung

Sowohl Kryo- als auch Paraffinschnitte wurden mit der gleichen Methode indirekt immunfluoreszent doppel- bzw. dreifachgefärbt. Dabei wird nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge die Fluoreszenz eines mit dem entsprechenden Fluorophor

markierten Antikörperkomplexes, bestehend aus zwei Antikörpern detektiert. Der primäre Antikörper bindet an das zu detektierende Antigen im Gewebe. Der sekundäre Antikörper dagegen richtet sich spezifisch gegen Antigensequenzen der Wirtsspezies aus der der 1. Antikörper stammt und ist mit einem signalemittierenden Fluorophor gekoppelt.

Färbung	Doppelfärbung zur Rekonstruktion	COX-2, WT1, THP Trippelfärbung	COX-2, WT1, Cdh6 Trippelfärbung	COX-2, Calbindin Doppelfärbung
Gewebe	Paraffinserienschnitte 5µm	Kryoschnitte 6µm	Kryoschnitte 6µm	Paraffinschnitte 5µm
Demaskierung	-	TrisEDTA, pH 8.5, 1h, 94°C	TrisEDTA, pH 8.5, 1h, 94°C	TrisEDTA, pH 8.5, 1h, 94°C
Blockierlösung 1	10% Horseserum, 1% BSA in PBS 30min, RT	5% Magermilch in PBS 1h RT	5% Magermilch in PBS 1h RT	5% Magermilch in PBS 1h RT
Primäre Antikörper	Mouse Anti-α-SMA (1:10) Chicken Anti-Renin (1:200)	Rabbit Anti-COX-2 (1:200) Mouse Anti-WT1 (1:100) Sheep-Anti-THP (1:100)	Rabbit Anti-COX-2 (1:200) Mouse Anti-WT1 (1:100) Goat-Anti-Cdh6 (1:50)	Rabbit Anti-COX-2 (1:200) Mouse Anti-Calbindin (1:200)
Verdünnlösung	1% BSA in PBS	5% Magermilch in PBS	5% Magermilch in PBS	5% Magermilch in PBS
Sekundäre Antikörper	Cy2 Donkey Anti-Mouse (1:400) TRITC Donkey Anti-Chicken (1:300)	TRITC Donkey Anti-Mouse (1:300) Cy5 Donkey Anti-Mouse (1:400) Cy2 Donkey Anti-Sheep (1:400)	TRITC Donkey Anti-Mouse (1:300) Cy5 Donkey Anti-Mouse (1:400) Cy2 Donkey Anti-Goat (1:400)	TRITC Donkey Anti-Mouse (1:300) Cy2 Donkey Anti-Mouse (1:400)

Zur eigentlichen Färbung wurden die Schnitte zuerst auf dem Schüttler je 3x 5min in PBS-Puffer gewaschen. Je nach Färbeprotokoll der verwendeten Antikörper wurden die Antigene gegebenenfalls demaskiert und die Schnitte erneut in PBS gewaschen. Zur Abschwächung unspezifischer Bindungen wurden sie dann in Blockierlösung überführt und dort je nach Färbeprotokoll 30-90min bei RT belassen. Nach dem Blockieren wurden die Schnitte mit den entsprechenden primären Antikörpern (verdünnt in Blockierlösung) in einer Feuchtkammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper waren dabei in der entsprechenden Blockierlösung verdünnt. Am Folgetag wurde 3x 5min mit der Lösung gewaschen in der die entsprechenden sekundären Antikörper (je nach Färbeprotokoll) verdünnt wurden. Dem

folgend wurde der sekundäre, Fluorophor konjugierte Antikörper aufgebracht. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der konjugierten Fluorophore mussten die Schnitte ab diesem Schritt im Dunkeln gehalten werden. Die Inkubation erfolgte 90min bei RT in einer Feuchtkammer. Vor dem abschließenden Eindeckeln mit Glycergel wurden die Schnitte 3x je 5min in PBS-Puffer danach in H₂O gewaschen.

2.3.4. Mikroskopie und Bilddigitalisierung

Die Digitalisierung der immunfluoreszenzgefärbten Gewebeschnitte erfolgte mit Hilfe eines Axiovert200M Mikroskops mit den entsprechenden Fluoreszenzfiltersets und motorisierter Objektauflage, einer Schwarzweiß-CCD-Kamera (AxioCamMRM) sowie der Software AxioVision von Zeiss.

2.3.5. Erstellung von 3D-Rekonstruktionen

Um das Reninexpressionsmuster detailliert untersuchen zu können wurden 3D-Rekonstruktionen (**Abb.2.1**) unterschiedlicher Nierenentwicklungsstadien sowie adulter unbehandelter und mit LS und Enalapril behandelter Nieren angefertigt. In den Rekonstruktionen wurden der arterielle Gefäßbaum und die zugehörige Reninverteilung gezeigt. Es wurden Knockouttiere und Kontrollen verglichen.

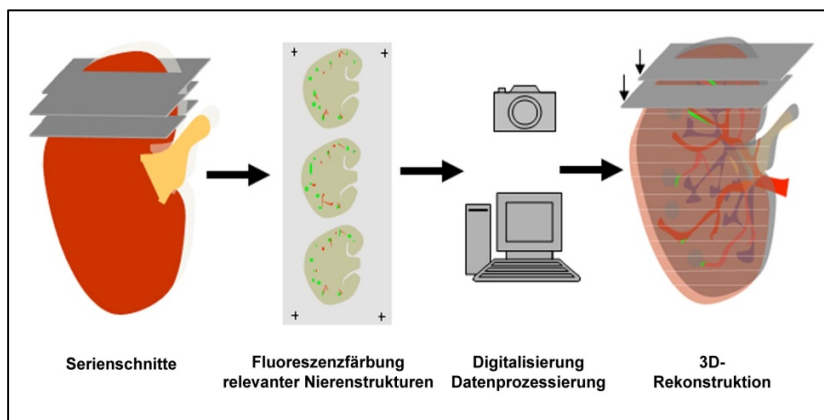


Abb.2.1 Schema zur Methode der 3D-Rekonstruktion.
(Mit freundlicher Genehmigung von Charlotte Wagner zur Verfügung gestellt)

Zur 3D-Rekonstruktion dienten Paraffinserienschnitte, die wie oben beschrieben fixiert, gegen Renin sowie α -SMA immunfluoreszent gefärbt und digitalisiert worden waren. Es wurden Modelle arterieller Gefäßbäume von unreifen und adulten COX-2- und TGF- β RII RenCrefloxflox Knockoutnieren und den korrespondierenden Wildtypen angefertigt. Als Wildtypreferenzen konnte bei den COX-2-Knockoutrekonstruktionen (auf C57Bl/6 Stamm

rückgekreuzte Tiere) bereits existierende Modelle aus der C57Bl/6 Wildtypbibliothek (erstellt und mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt von *Katharina Machura*) zurückgegriffen werden. Da es sich bei den TGF-βRII RenCrefloxflox Tieren um einen anderen genetischen Hintergrund handelte, wurden für diese Kontrollmodelle von Nieren der TGF-βRII RenRenfloxflox Geschwistertiere angefertigt.

COX-2-Knockouts (und korrespondierende WT-Kontrollen)					
rekonstruiertes Stadium	E18	pp1	pp3	pp10	Adult basal, LS+Enalpril
Ausschnitt	190-220 Schnitte	300-350 Schnitte	80-100 Schnitte	90-120 Schnitte	90-120 Schnitte
Zusätzlich dargestellte Strukturen	Nierenkapsel, Becken Glomeruli	Nierenkapsel, Becken, Ureter Glomeruli	Nierenkapsel	Nierenkapsel,	Nierenkapsel, Glomeruli
Reninzellspezifische TGF-βRII-Knockouts (und korrespondierende WT-Kontrollen)					
Rekonstruiertes Stadium	E18	pp1	Adult basal, LS+Enalpril		
Ausschnitt	150-200 Schnitte	100-120 Schnitte	90-120 Schnitte		
Zusätzlich dargestellte Strukturen	Nierenkapsel	Nierenkapsel, Glomeruli	Nierenkapsel, Glomeruli		

Die Mehrkanalbildaufnahme erfolgte bei allen Stadien mit 100-facher Vergrößerung. Nach der Bilderfassung einer Nierenserie folgte das „Equalizing“ der einzelnen Bilder. Dazu wurde mittels des freizugänglichen Bildanalyse-Programms *Image J* (*Wayne Rasband*, NIH, USA) ein Stapel von Bildern gleicher Größe erzeugt. Für die später separate Datensegmentierung wurden die Farbkanäle, also der Renin- und αSMA-Kanal über die RGB-Split-Funktion wieder

getrennt. Zur eigentlichen Rekonstruktion erfolgte der Datenimport in die *Amira 4.1.2* Visualization Software auf einem Dell Precision 690 Computer System. Nach Abgleich der Pixelgröße entsprechend der Bildvergrößerung folgte die Bildalignierung, in der die Einzelbilder einer Serie in die gleiche Orientierung gebracht werden. Bei der anschließenden Datensegmentierung wurden die Renin- und α -SMA-Signale, orientiert an den unterschiedlichen Grauwerten des Bilds, mit Hilfe einer Reihe von Segmentierungswerkzeugen des Programms markiert und in Labelsets zusammengefasst und weiter bearbeitet. Diese Datensets bilden die Grundlage zur Erstellung von Matrizen, der Berechnung der Oberflächenvolumina und statistischen Berechnungen. Zur Rekonstruktion von Glomeruli, Nierenkapsel, Ureter und Nierenbecken erfolgte die Markierung nach strukturellen Merkmalen. Es ist bekannt, dass sich in sklerotisiertem Gewebe IgM-Antikörper ansammeln. Der verwendete sekundäre Anti-Maus-Antikörper erzeugt dort eine Artefaktfärbung. Die sklerotisierten Glomeruli im adulten COX-2-Knockout konnten aufgrund dieses Nebeneffekts erkannt und markiert werden. Die Längenbestimmung der superfiziellen afferenten Arteriolen, erfolgte mit Hilfe der 3D-Strecken- und Winkelmessfunktion der Software. Als Grundlage dazu dienten die berechneten Oberflächenvolumina (Surfacedateien) der erstellten Modelle.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Genotypisierungen/*Chytil*-Deletionspcr

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden mittels PCR genotypisiert. Zur Überprüfung der Deletion des im TGF- β RII-Gens geflochten Bereichs wurde ebenfalls eine PCR durchgeführt. Die Extraktion der genomischen DNA (gDNA) erfolgte dabei nach der NaOH-Methode. Für die Genotypisierungen wurde gDNA aus Gewebe der Schwanzspitze, für die TGF- β RII-Deletionspcr nach *Chytil A. et al.* (2002) gDNA aus renalem Gewebe von neugeborenen Mäusen benutzt.

Protokoll zur gDNA-Extraktion

- 2mm Mausschwanz bzw. 1 Niere im 1,5ml Cup mit 100 μ l 25mM NaOH versetzen
- Inkubation bei 96°C für 1h im Thermocycler
- gut vortexen, um den Schwanz aufzulösen und Zugabe von 10 μ l Tris HCl, pH8

- 6min zentrifugieren bei 10000rpm
- einsetzen von 2µl des Überstandes (gDNA) in die Genotypisierungs-PCR

20µl PCR-Reaktionsansatz:

Je 1µl sense und antisense Primer (10pmol/µl),
 2,5µl dNTPs (2,5 mM),
 4µl Puffer (GoTaq buffer green)
 0,3µl GoTaq
 9,2µl dd H₂O

Allgemeines Amplifizierungsprotokoll:

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

RenCre: 56°C

TGF-βRII floxflox: 61°C

Chytl-Deletionspcr: 62°C

Phase	Zyklen	Temperatur	Dauer
Aktivierung	1	94°C	3min
Denaturierung	35	94°C	30s
Annealing		je nach Primern	1min
Elongation		72°C	1min
Elongation	1	72°C	2min
Store	1	4°C	∞

Die PCR-Ansätze wurden auf ein Agarosegel (2%) aufgetragen und durch horizontale Gelelektrophorese in die einzelnen DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V.

2.4.2. Isolation der renalen Gesamt-mRNA

Die Isolierung der Total-RNA aus gefrorenen Nieren basiert auf der Guanidinium-Phenol-Chloroform-Methode nach *Chomczynski und Sacchi* (1987). Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und es wurde darauf geachtet RNase-Kontamination zu vermeiden. Zuerst wurden die gefrorenen Organe mit einem Ultra-Turrax Mixer in 1ml TRIZOL homogenisiert und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200µl Chloroform und je 1/5 des Gesamtvolumens TRIZOL hinzugefügt, 15s stark geschüttelt und 3min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 12000g, 15min) konnte die wässrige RNA-haltige Phase abgenommen werden. Zur RNA-Fällung wurde Isopropanol (abs., je 1Vol.) zugegeben und nach mehrmaligen schwenken 10min bei RT inkubiert. Nach weiteren Zentrifugationschritten wurde das RNA-Pellet zunächst mit 75% Ethanollösung (1ml je ml TRIZOL) gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und abschließend in nukleasefreiem Wasser 1-3min bei 55°C resuspendiert.

Zur Quantifizierung wurde die isolierte RNA 1:50 in nukleasefreiem Wasser verdünnt und photometrisch vermessen. 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. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.4.3. cDNA-Synthese

Mit Hilfe der reversen Transkriptase wurde die isolierte RNA in copy DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies bietet den Vorteil, dass zwar noch alle Information der ursprünglichen RNA gespeichert sind, jedoch in sehr viel stabilerer Form konserviert bleiben und sich mit PCR-Techniken analysieren lassen.

Je 1µg der isolierten Gesamt-RNA wurde zur cDNA-Synthese, als Template für die spätere Realtime (RT)-PCR eingesetzt. Diese erfolgte mit Hilfe der MMLV reversen Transkriptase Reaktion. Als Primer wurden Oligo(dT)₁₅-Ketten verwendet, um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren.

Protokoll:

10µl Reaktionansatz:

1µg Gesamt-RNA, 1µl Oligo-(dT)₁₅ Primer (0,5µg/µl) add DEPC-H₂O
 → 5min auf 65°C erhitzt, anschließend sofort auf Eis stellen
 Mix aus 1µl MMLV Reverse Transkriptase (100U), je 4µl dNTPs (2,5mM) und Puffer (5x first strand buffer) sowie 3µl DEPC-H₂O erstellen und zu 10µl Ansatz geben.

→ 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.

2.4.4. Semiquantifizierung der Renin mRNA mittels Realtime-PCR

Zur Quantifizierung der Renin mRNA-Expression wurden RT-PCR-Analysen am Roche LightCycler® 480-Gerät unter Verwendung des Lightcycler 480 SYBR Green Master PCR Kits von Roche durchgeführt. Bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch vermessen. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, der mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA bindet.

Protokoll:

10µl Reaktionansatz:

5µl Lightcycler 480® SYBR Green Master, je 0,5µl sense und antisense Primer (10pmol/µl), 3µl dd H₂O und 1µl cDNA

Phase	Zyklen	Temperatur	Dauer
Aktivierung	11	95°C	15min
Denaturierung	40	95°C	15s
Annealing		58°C	20s
Elongation		72°C	20s

Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Zum Abschluss eines jeden Laufs wurde außerdem die Schmelzkurve der amplifizierten DNA bestimmt (Aufschmelzen der DNA von 60°C-95°C mit 0,1°C/s) und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Housekeeper wurde das nicht mitregulierte Kontrollgen GAPDH verwendet.

2.4.5. Bestimmung der Plasmareninkonzentration

Zur Bestimmung der Plasmareninkonzentration (PRC) wurde die von Renin katalysierte Bildung von Angiotensin I (ANGI) aus Angiotensinogen gemessen. Die Konzentration an ANGI, welche proportional zum Reningehalt der Probe ist, wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassay-Kits (RIA) der Firma DiaSorin mit den vom Hersteller bereitgestellten Reagenzien und Standards bestimmt. Diese Analysen basieren auf der Competition um eine limitierte Anzahl an Bindungsstellen des Renins der Probe mit ¹²⁵I radioaktiv markierten ANGI. Zur PRC-Messung wurde das aus dem Vollblut abgetrennte Blutplasma 1:20 mit Maleatpuffer verdünnt und 50µl davon mit 22µl dialysiertem Substrat (Serum aus bilateral nephrektomierten Ratten, 1:5 mit Maleatpuffer verdünnt), 28µl RIA-Reaktionspuffer und 2µl PMSF auf Eis vermischt. 5µl dieses Mix wurden zur Bestimmung des Warmwerts 1,5h bei 37°C inkubiert der Rest bis zum Assay für die entsprechenden Kaltwerte auf Eis belassen. Nach 24h Inkubation mit 500µl Tracer bei RT und Absaugen wurde die Menge an umgesetzten ANGI mittel RIA bestimmt und die Differenz zwischen Warm- und Kaltwert berechnet. Die Messdaten wurden außerdem um den Messwert des ANGI-Umsatzes der Kontrolle ohne Plasmaprobezusatz korrigiert.

2.4.6. Statistische Analysen

Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des einfraktionellen ANOVA-Tests berechnet. Als signifikant wurden Statistiken mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,05$ (*), als hochsignifikant $P < 0,01$ (**) bezeichnet.

Ergebnisse

1. Reninzellrekrutierung in COX-2 defizienten Mäusen

1.1. COX-2-Expression im Laufe der murinen Nephrogenese

Um Aussagen über die COX-2-mRNA-Abundanz im Verlauf der murinen Nephrogenese treffen zu können, wurden zunächst Expressions-Analysen durchgeführt. Dazu wurde die Gesamtnieren-mRNA einer Entwicklungsserie von C57Bl/6 Wildtypmäusen, beginnend mit Embryonaltag (E) 15 bis zum adulten Stadium, vermessen.

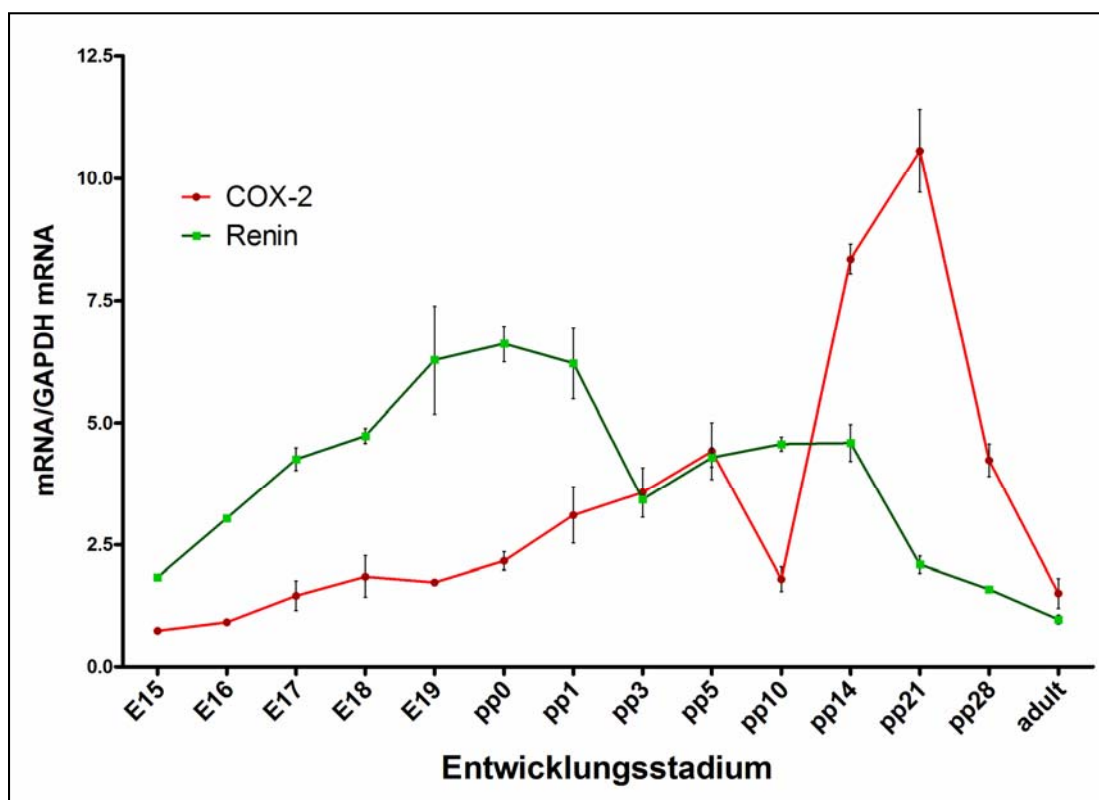


Abb.3.1 Renin- und COX-2-Expression während der Entwicklung in C57Bl/6 Mäusen.
Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 3-5 Nieren pro Entwicklungsstadium.

Abb.3.1 zeigt das zeitliche Expressionsprofil von COX-2 verglichen mit Renin. Ausgehend von der geringsten COX-2-Expression an Embryonaltag (E) 15, steigt die COX-2-Expression bis zum postpartalen Tag (pp) 5 zunächst kontinuierlich auf etwa das 4-fache des Ausgangswerts

an. Am 10. Tag post partum fällt sie wieder auf die Hälfte des Anstiegsniveaus zurück und nimmt dann wieder zu. Das Maximum der COX-2-Expression findet sich an pp14-21. Zu diesem Zeitpunkt erreicht es mehr als das 10-fache des Ausgangswerts von E15. Bis zum Adultstadium sinkt sie wieder auf pp10-Niveau ab.

Auch die Reninexpression steigt ab E15 an, findet ihr höchstes Level um den Zeitpunkt der Geburt bei E19-pp1 und nimmt dann zunächst wieder ab. Ab pp3 erfolgt ein erneuter, wenn auch flacherer Anstieg der Kurve bis pp14. Danach erniedrigt sich die Expressionsrate auf das Kurvenminimum im Adulttier.

1.2. Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung während der renalen Entwicklung von COX-2-Knockoutmäusen

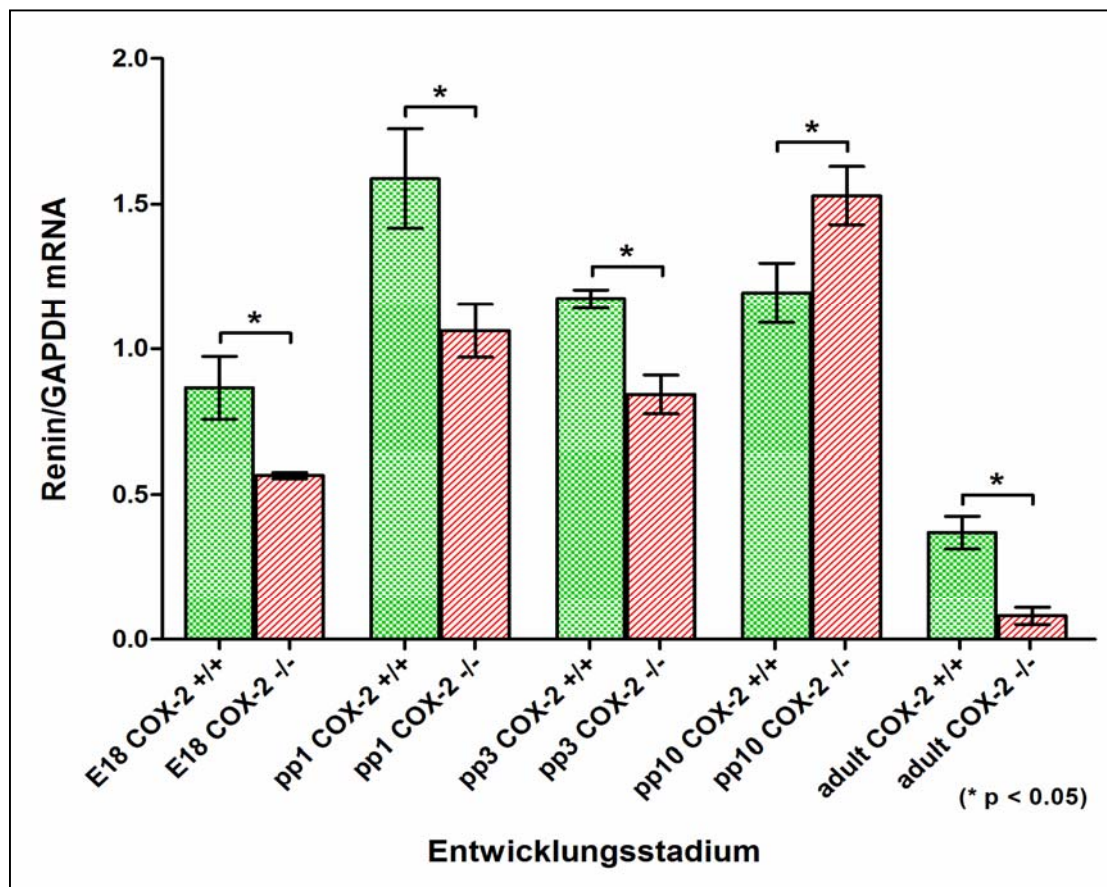


Abb.3.2 Reninexpression in COX-2-Knockoutmäusen während der Entwicklung verglichen zu COX-2 +/+. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 3-6 Nieren pro Entwicklungszeitpunkt.* bezeichnet signifikante Unterschiede von $p < 0.05$.

Zur genauen Analyse der renalen Reninexpression bei COX-2-Defizienz wurden COX-2-Knockoutmäuse (COX-2 $-/-$) mit reinem C57Bl/6 Hintergrund verwendet. Es ist bekannt, dass COX-2-Knockoutmäuse einen starken Phänotyp, einhergehend mit erheblichen renalen Schäden besitzen und dass dieser entscheidend vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängig ist (Dinchuk JE. et al., 1995; Morham SG. et al., 1995; Norwood VF. et al., 2000; Yang T. et al., 2005). Um eine solche Störgröße möglichst auszuschließen, wurden mit C57Bl/6 rückgekreuzte Tiere gewählt. Diese besitzen nach Yang T. et al. (2005) im Vergleich zu anderen COX-2 $-/-$ Knockoutlinien den mildesten Phänotyp.

Als erstes wurde die Reninexpression der COX-2-Knockouttiere auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurde die Gesamtnieren-RNA der auch für die Rekonstruktion ausgesuchten Entwicklungsstadien vermessen. Wie **Abb.3.2** veranschaulicht, zeigte sich in allen untersuchten COX-2 $-/-$ Stadien, ausgenommen in pp10, eine zu den korrespondierenden Wildtypen signifikant erniedrigte Reninexpression. Bei COX-2 $-/-$ Nieren der Stadien E18, pp1 sowie pp3 liegen die Reninwerte etwa 30-35% unter den entsprechenden Wildtypwerten. In adulten Knockouttieren zeigte sich eine Reninexpression von nur noch 20% des Wildtypniveaus. Bei den untersuchten COX-2 $-/-$ Nieren von Postpartaltag 10 konnte dagegen ein um ca. 1/3 erhöhter mRNA-Wert festgestellt werden.

Als nächstes sollten 3D-Rekonstruktionen des arteriellen Nierengefäßbaums, basierend auf gegen α -Glattmuskelaktin und Renin immunhistochemisch gefärbten Serienschnitten, Aufschluss über das zeitlich-räumliche Reninexpressionsmuster in COX-2-Knockoutmäusen geben. Rekonstruiert wurden Gefäßbäume von COX-2 $-/-$ Nieren mit zugehöriger Reninverteilung von E18, pp1, pp3 und pp10 sowie adulten Nieren. Diese Nierenentwicklungsstadien sind für den Verlauf der Reninexpression repräsentativ. Bei den frühen, noch wenig entwickelten Stadien E18 und pp1 wurde jeweils der Gefäßbaum einer halben Niere rekonstruiert. Zur besseren Orientierung im Modell wurden dort sowohl Nierenkapsel und Becken als bei pp1 auch der Ureter mit dargestellt. Aufgrund des sich immer komplexer verästelnden Gefäßgeflechts wurden, aus Gründen der Übersichtlichkeit, ab pp3 nur Nierenteilbereiche betrachtet. In den Modellen der adulten Nieren sind außerdem die Glomeruli mit abgebildet.

Ogleich das vaskuläre System mit zunehmendem Nierenreifegrad immer diffiziler und komplexer wird, ist das allgemeine durchweg konstante Aufbauprinzip des renalen

Gefäßbaums bereits am Embryonaltag 18 deutlich zu erkennen. Die Arteria (A.) renalis verzweigt sich am Hilus in die sich zu den arcuaten Bögen gabelnden A. interlobares. Aus den arcuaten Arterien entspringen dann entweder direkt zu den Glomeruli führende afferente Arteriolen, diesen noch vorgeschaltete A. interlobularis, oder arcuate Seitenäste, welche noch vor den interlobularen Arterien zwischengeschaltet sind. Änderungen dieses Grundbauplans im Hinblick auf die Aufzweigungsart ließen sich in keinem der rekonstruierten Knockoutmodelle finden. Auch im Entwicklungsstand des Gefäßbaums war in keinem Stadium in den COX-2 $-/-$ Nieren ein wesentlicher Unterschied zu den Wildtypen festzustellen (**Abb.3.3-6**). Allerdings zeigten sich in den Knockouttieren deutliche Aberrationen in der Ausbildung der kortikalen Gefäßbaumstruktur. Der kortikale Phänotyp des adulten Tiers war ab pp10 stark ausgeprägt.

Abb.3.3 zeigt die Rekonstruktionen COX-2 $-/-$ E18 mit zugehörigem Wildtyp. Renin wird am Embryonaltag 18 im Wildtyp entlang des gesamten Gefäßbaums exprimiert, obwohl es bereits beginnt, sich aus den großen proximalen Gefäßen zurückzuziehen. Es lässt sich in den großen arcuaten Bögen und transversalen Seitenästen, den interlobularen Arterien, über sämtliche Aufgabelungen hinweg bis hin zu den afferenten Arteriolen finden. Die Reninexpression erstreckt sich dabei fast kontinuierlich mit nur wenigen Unterbrechungen über die gesamte Gefäßlänge, bereits bis zu den vaskulären Polen der Vasa afferentia. Es zeigte sich, dass die Verlagerung der Reninexpression dabei nicht in der gesamten Niere synchron verläuft. In einigen Bereichen lässt sich Renin bereits näher am vaskulären Pol beobachten als an anderen. Im Knockout findet sich die Reninexpression zwar an vergleichbaren Positionen wie im Wildtyp, jedoch in geringeren Mengen. Es ist eine vereinzelte, meist fleckige Reninexpression in den großen arcuaten Gefäßen, den interlobularen Arterien und den afferenten Arteriolen zu detektieren. Im rekonstruierten COX-2-Knockoutmodell lässt sich feststellen, dass die Reninexpression nicht in allen Nierenteilbereichen gleich stark ausgeprägt ist.

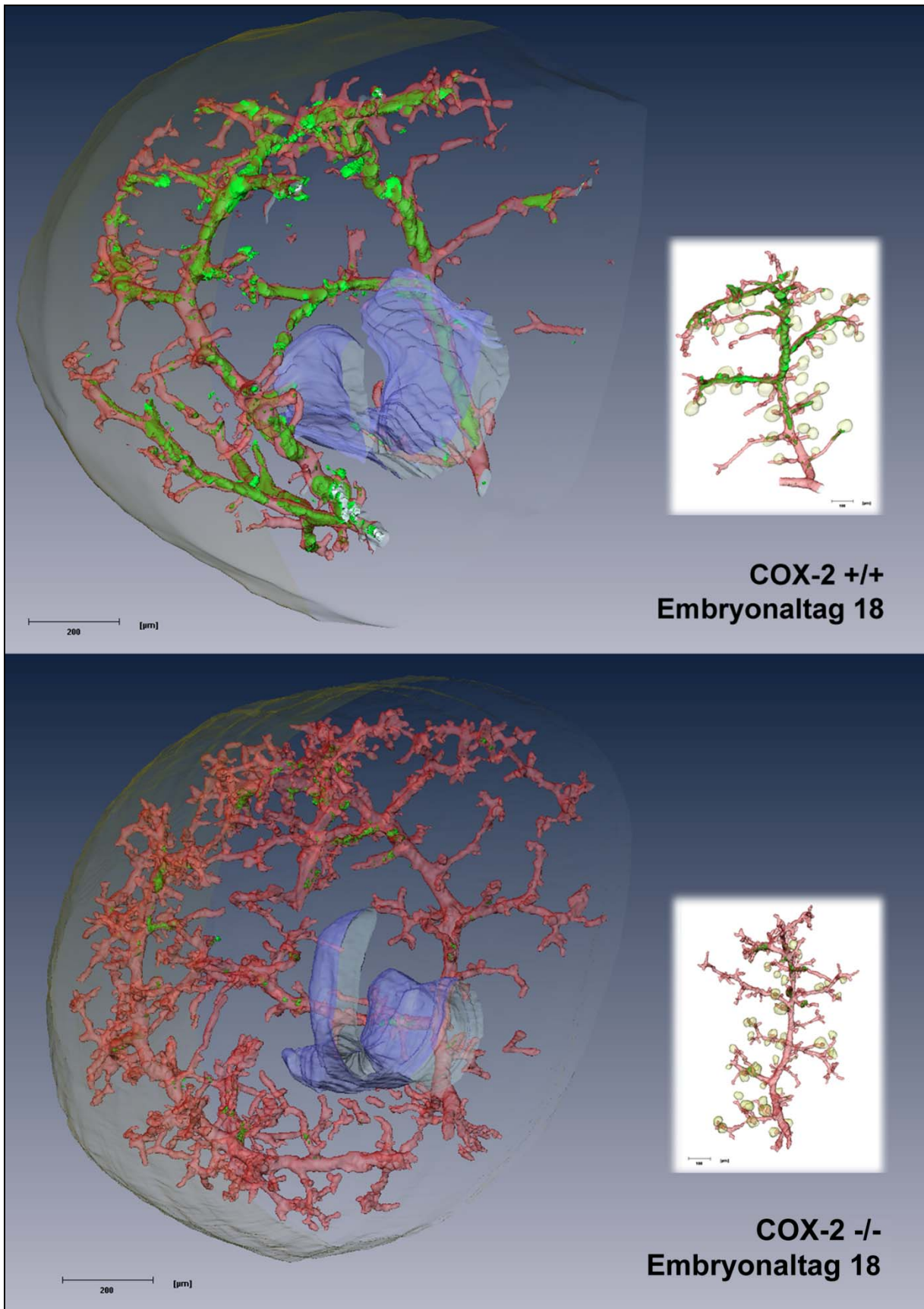


Abb.3.3 Amira 3D-Gefäßbaumrekonstruktionen von COX-2 -/- im Vergleich zu COX +/+ Nieren an Embryonaltag 18. Dargestellt sind arterielle Gefäße (rot), Renin (grün), zusätzlich der Ureter sowie das Becken (blau) und die Nierenkapsel (gelb). Außerdem wird ein isolierter arcuater Ast gezeigt (herausgegriffen aus dem jeweiligen Modell) bei dem exemplarisch Glomeruli (gelb) mit dargestellt sind.

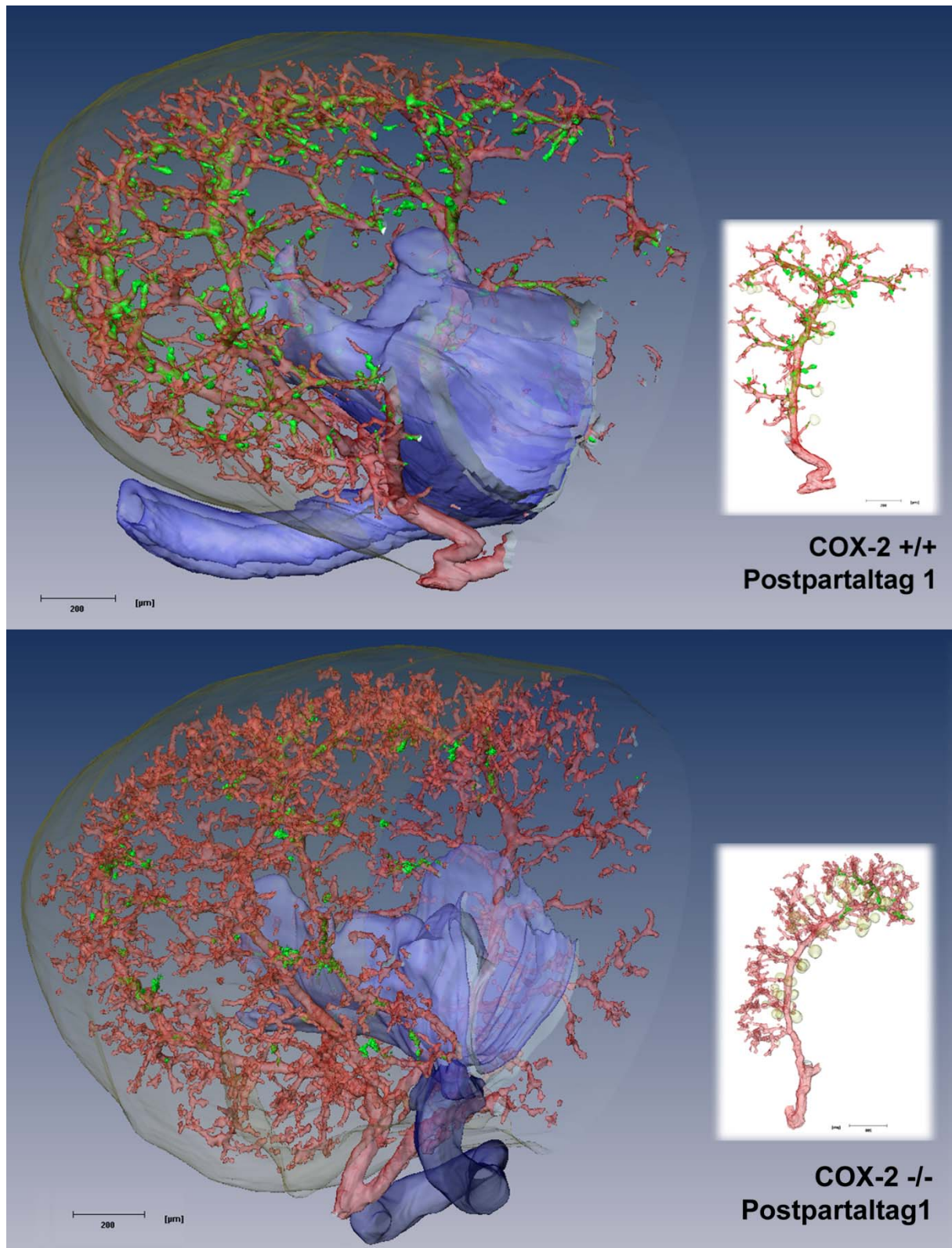


Abb.3.4 Amira 3D-Gefäßbaumrekonstruktionen von COX-2 -/- im Vergleich zu COX +/+ Nieren an Postpartaltag 1. Dargestellt sind arterielle Gefäße (rot), Renin (grün), zusätzlich der Ureter sowie das Becken (blau) und die Nierenkapsel (gelb). Außerdem wird ein isolierter arcuater Ast gezeigt (herausgegriffen aus dem jeweiligen Modell) bei dem exemplarisch Glomeruli (gelb) mit dargestellt sind.

Einen Tag nach der Geburt an pp1 ist Renin im COX-2 $+/+$ aus den distalen Bereichen der A. arcuatae weitestgehend verschwunden und überwiegend nur noch an den Verzweigungspunkten zu und in den großen arcuaten Seitenästen, den interlobularen Arterien und den afferenten Arteriolen vorhanden und zwar in einem gestreuten diskontinuierlichen Muster. Hauptsächlich in juxtamedullären afferenten Arteriolen sitzt es bereits an seiner klassischen Position am vaskulären Pol der Glomeruli. Auch in diesem Entwicklungsstadium gleicht das räumliche Expressionsprofil der COX-2-Knockoutmaus dem des Wildtyps. Wieder befinden sich Renin bildende Zellen generell an den gleichen Stellen des Gefäßbaums, im Knockout aber mit sehr viel geringerer Abundanz (**Abb.3.4**).

Am postpartalen Tag 3 (pp3) hat sich Renin bereits vollständig aus den arcuaten Stämmen und größtenteils auch aus den arcuaten Seitenästen zurückgezogen. Es findet sich nun vorwiegend in den proximaler gelegenen Gefäßverästelungen und in den an der Grenze zur Medulla gelegenen afferenten Arteriolen, häufig schon auf seine juxtaglomeruläre Position begrenzt. In **Abb.3.5** ist ein kortikaler Gefäßausschnitt, ausgehend von einem arcuaten Seitenast, einer 3 Tage alten COX-2-Knockoutmaus und des korrespondierenden Wildtyps abgebildet. Sich entwickelnde kortikoradiale interlobulare Arterien und afferente Arteriolen sind sowohl im COX-2 $+/+$ als auch im Knockout frei von Renin bildenden Zellen. Im arcuaten Seitenast ist bei beiden an Abzweigungspunkten noch Reninexpression zu finden.

An Postpartaltag 10 (pp10) lässt sich Reninexpression in der juxtamedullären und mittleren kortikalen Zone an seiner klassischen Position am Eingang zum Glomerulus beobachten. Wie **Abb.3.5** verdeutlicht, zeigt hier der Knockout im Vergleich zum Wildtyp, im Gegensatz zu allen anderen rekonstruierten Stadien, aber im Einklang mit den mRNA-Daten, eine gesteigerte Reninexpression. Vor allem vor juxtamedullären Glomeruli, aber auch mittkortikal lässt sich im Knockout eine gesteigerte Reninabundanz finden.

Im Adulttier limitiert sich die Reninproduktion im COX-2 $+/+$ wie auch im Knockout auf eine juxtaglomeruläre Position in den afferenten Arteriolen. Im Wildtyp finden sich prinzipiell an jedem Glomerulus Renin produzierende Zellen. Wobei häufig die Reninabundanz in juxtamedullären Glomeruli höher ist als in superfiziellen. In der COX-2 defizienten Niere hingegen tritt an den oberflächigen Glomeruli nur vereinzelt eine geringe, meist aber keine Reninexpression auf. In Bereichen des Kortex lassen sich in COX-2 $-/-$ Nieren gehäuft deutlich kleinere sklerotisierte Glomeruli beobachten, direkt unterhalb der Kapsel sogar nur

ausschließlich solche. Aus **Abb.3.6** wird ersichtlich, dass diese geschädigten Glomeruli nur selten Reninexpression aufweisen. Auch bei histologischer Betrachtung lässt sich vor den subkapsulären Glomeruli keine und – wenn doch – nur geringe Reninimmunreaktivität beobachten.

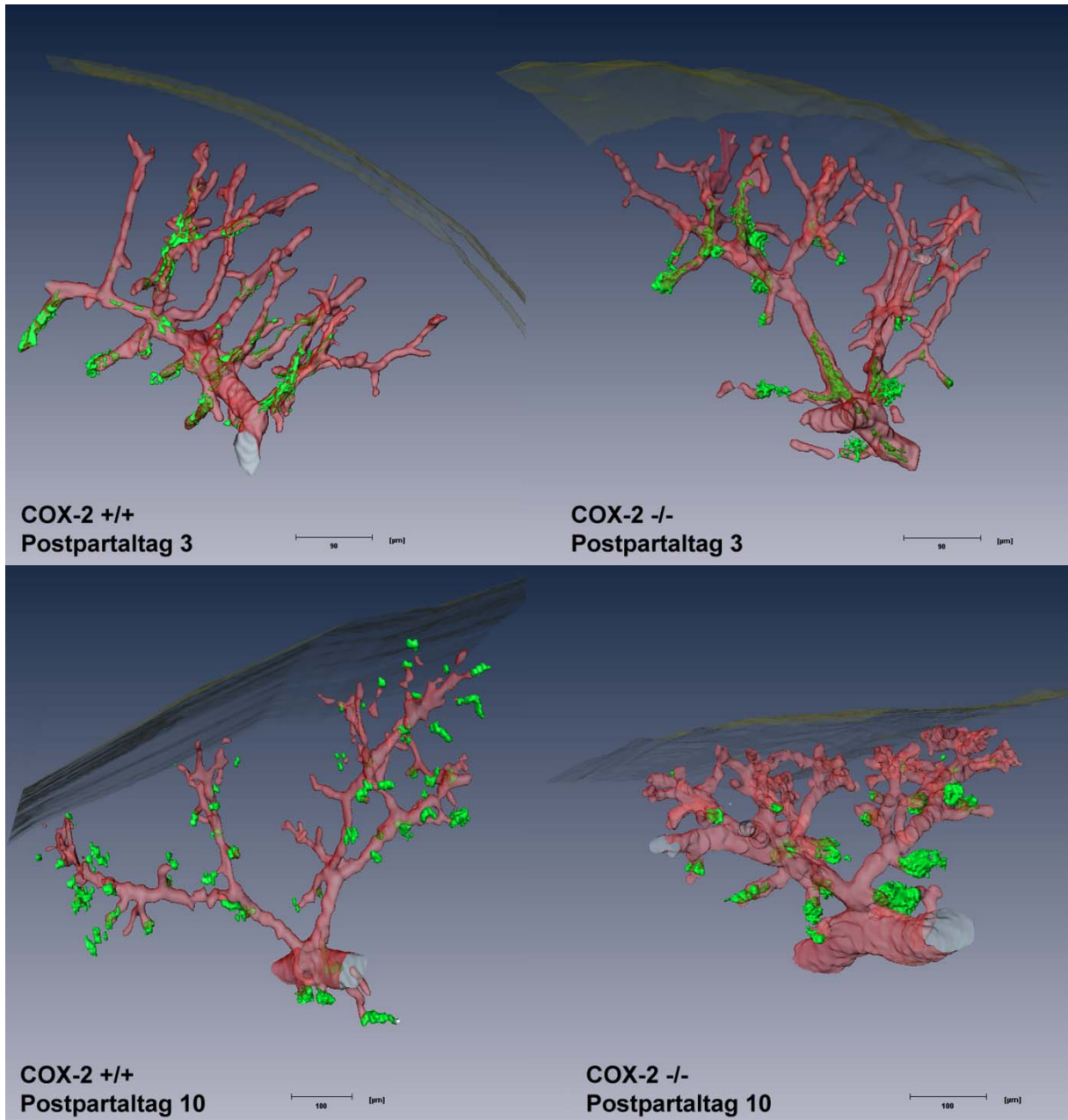


Abb.3.5 Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen von COX-2 -/- und COX-2 +/+ Nieren an Postpartaltag 3 und 10. Gezeigt ist ein kortikaler Abschnitt des Gefäßbaums, ausgehend von einem arcuaten Ast von Knockoutnieren (rechts) an pp3 und darunter pp10, jeweils mit korrespondierendem Wildtyp links. Der Gefäßbaum ist in rot dargestellt, Renin in grün und zusätzlich die Nierenkapsel in gelb.

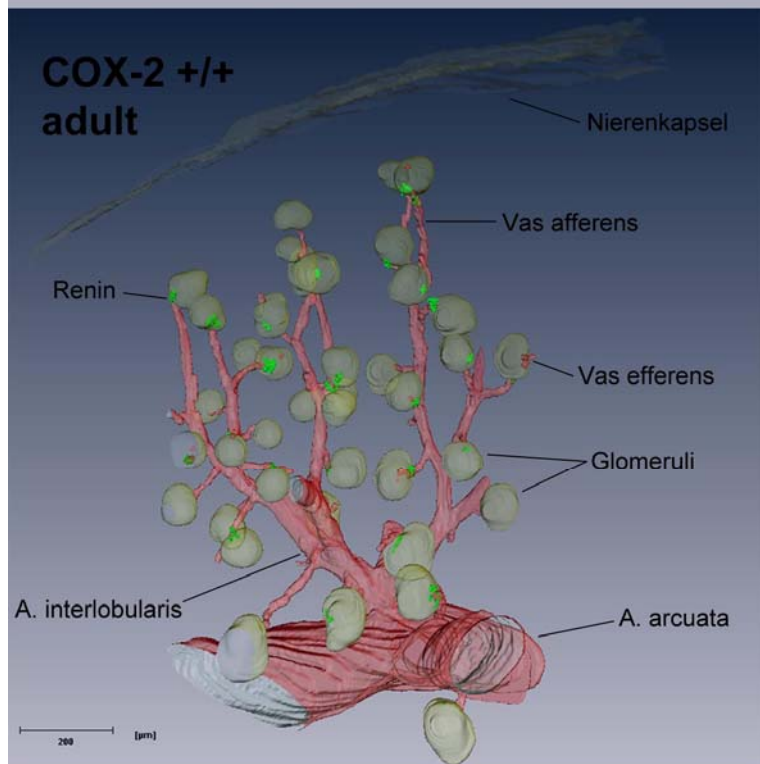
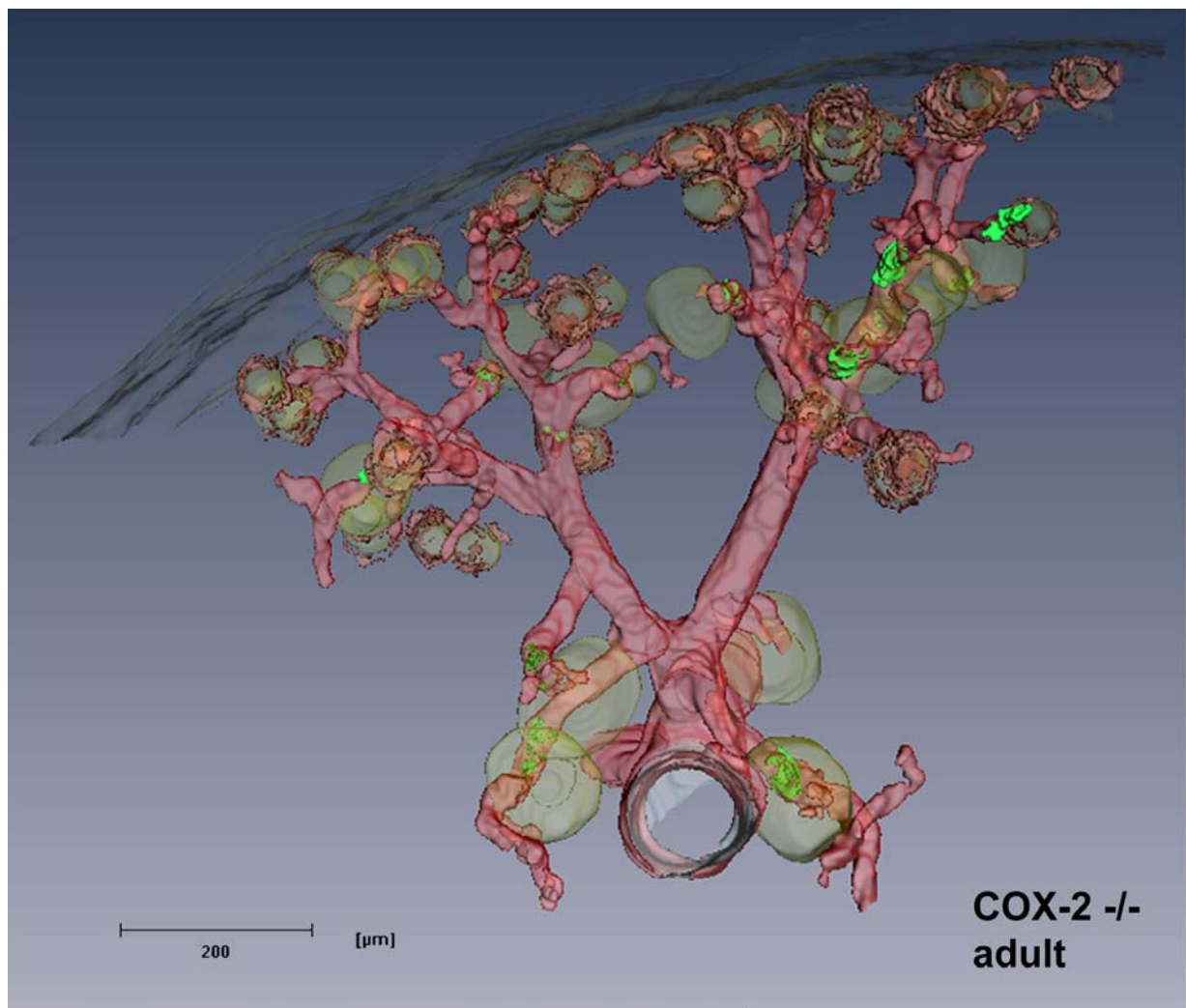


Abb.3.6 Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen adulter COX-2 -/- und COX-2 +/+ Nieren. Abgebildet ist ein kortikaler Ausschnitt des Gefäßbaums, ausgehend von einem arcuaten Ast, je einer adulten, unbehandelten Knockout- und Wildtypmaus. Dargestellt sind in rot der Gefäßbaum, in grün die Reninverteilung und jeweils in gelb Glomeruli und die Nierenkapsel. Im Modell der COX-2 -/- sind außerdem sklerotisierte Glomeruli in braun gezeigt.

1.3. Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung in der adulten COX-2-Knockoutmaus

Um feststellen zu können, ob das Fehlen von COX-2 auf die Reninzellrekrutierung im Adulttier Einfluss nimmt, wurden außerdem die Renin-mRNA und *Amira* 3D-Teilstückrekonstruktionen von COX-2 $-/-$ und $+/+$ Nieren unter Stimulation des RAAS untersucht. Dazu wurden die Tiere 7 Tage unter Nidrigsalzdiät (LS) gehalten und ihnen wurde die letzten 4 Tage der Diät zusätzlich der ACE-Inhibitor Enalapril verabreicht.

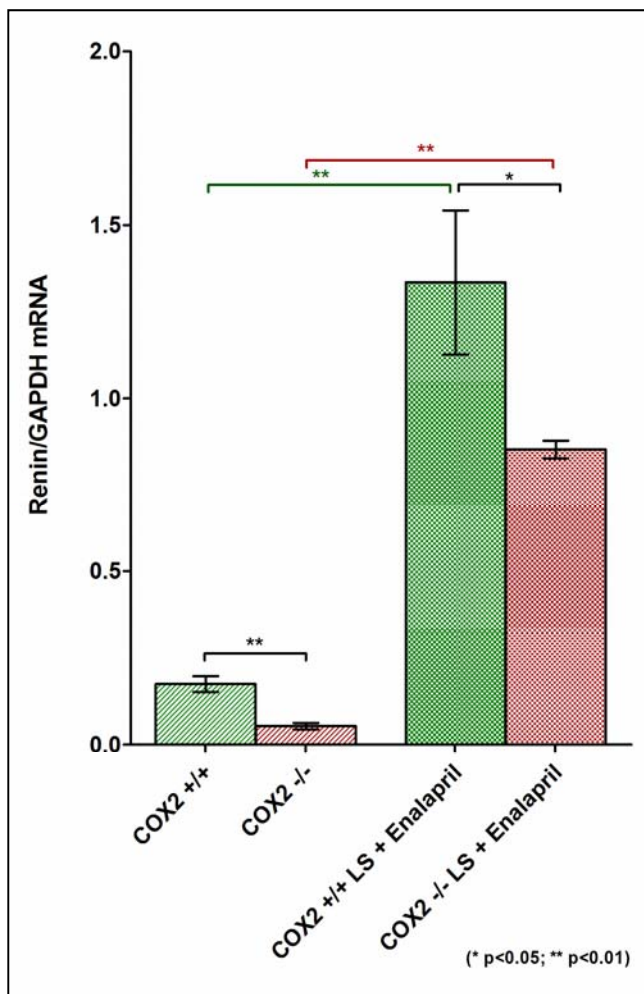


Abb.3.7 Renin-mRNA-Abundanz in adulten unbehandelten COX-2 $-/-$ und mit Nidrigsalz und Enalapril (ACE-Inhibitor) behandelten COX-2 $-/-$ Mäusen. Zum Vergleich mit dargestellt sind die Wildtypkontrollgruppen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 3-6 Nieren pro Versuchsgruppe.

* bezeichnet signifikante Unterschiede von $p < 0.05$ und ** Signifikanz von $p < 0.01$.

Dass eine Stimulation zur Reninsynthese mit LS in Kombination mit ACE-Inhibition im adulten Knockouttier möglich ist, bestätigen die Renin-mRNA-Messungen (**Abb.3.7**). Die Reninexpression liegt im COX-2 $-/-$ zwar generell, basal wie stimuliert, signifikant deutlich unter den Level der COX-2 $+/+$ Kontrollgruppen. Im COX-2 $-/-$ war jedoch eine Stimulation auf das 16-fache des Basalwerts möglich. Beim Wildtyp zeigte sich dagegen eine etwa 8-fache Steigerung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren.

In **Abb.3.8** sind die Rekonstruktionen von Nieren mit chronisch stimulierten RAAS abgebildet. Verglichen mit den zugehörigen, unbehandelten Kontrollen (**Abb.3.5**) weisen der Wildtyp und der Knockout eine gesteigerte Reninexpression auf.

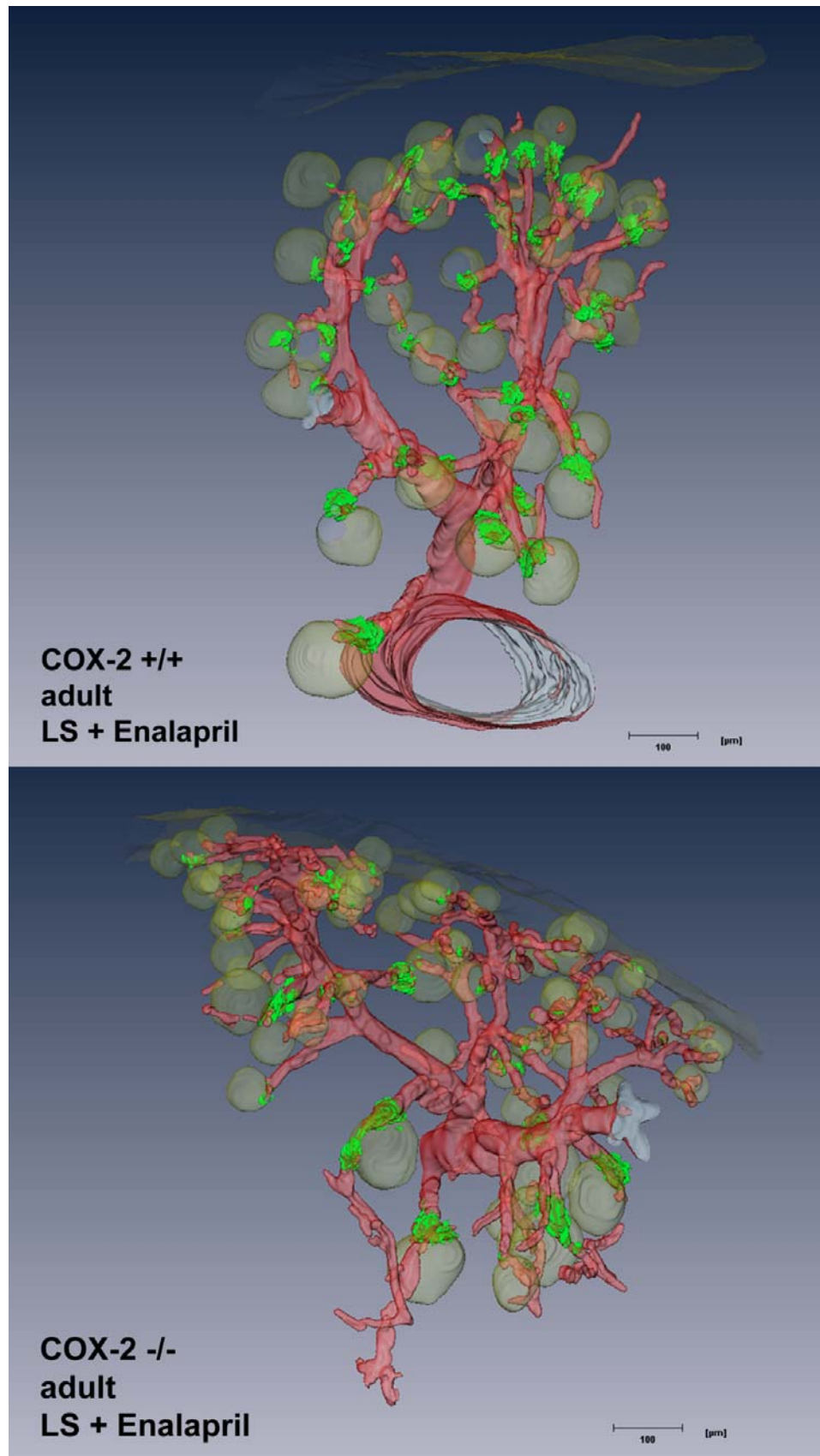


Abb.3.8 Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen adulter, zur Reninexpression stimulierter COX-2 -/- und COX-2 +/+ Nieren. Abgebildet ist ein kortikaler Ausschnitt des Gefäßbaums, ausgehend von einem arcuaten Ast, je einer adulten mit Nidrigsalz und Enalapril (ACE-Inhibitor) behandelten COX-2-Knockout- und Wildtypmaus. Dargestellt sind in rot der Gefäßbaum, in grün die Reninverteilung und jeweils in gelb Glomeruli und die Nierenkapsel.

Im Wildtyp zeigt sich eine retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen in den afferenten Arteriolen an Glomeruli aller Nierenbereiche. Auch im Knockout kann im Vergleich zum Basalzustand insgesamt eine erhöhte Reninabundanz beobachtet werden. Allerdings nimmt die Reninexpression, ausgehend von den juxtamedullären hin zu den weiter außen liegenden superfiziellen Glomeruli, ab. Eine Rekrutierung Renin bildender Zellen tritt vorwiegend an juxtamedullären Glomeruli auf. Die subkapsulären Glomeruli weisen auch hier wieder, verglichen mit tiefer liegenden Glomeruli, eine geringere Reninabundanz auf. Eine Rekrutierung Renin produzierender Zellen kann aber auch in dieser Region stellenweise beobachtet werden.

1.4. Untersuchungen zu Gefäßbaumaberrationen im COX-2^{-/-}

Am Gefäßbaum der adulten, COX-2 defizienten Maus lassen sich besonders im Kortex deutliche Malformationen erkennen. Der kortikale arterielle Baum erscheint, verglichen zum Wildtyp im Ganzen, gestaucht und komprimiert zu sein. Es befindet sich nahezu kein Raum zwischen Kapsel und afferenten Arteriolen des äußeren Kortex. Im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem diese langgestreckt zur Kapsel zeigen, sind die afferenten Arteriolen im Knockout schirmartig in Richtung Nierenmitte gedrückt. Auch die subkapsulären Glomeruli, bei denen es sich ausschließlich um kleine sklerotisierte Glomeruli handelt, stehen in unmittelbarem Kontakt zur Kapsel.

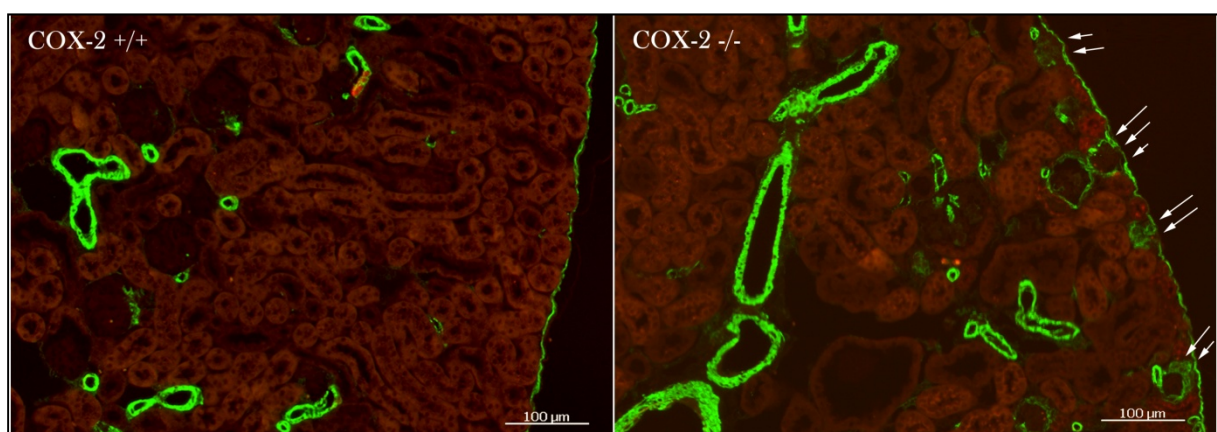


Abb.3.9 Renin- und αSMA-Immunfluoreszenzaufnahmen einer adulten COX-2^{-/-} Niere. Gezeigt ist ein gegen Renin (in rot) und αSMA (in grün) immunhistologisch gefärbter Paraffinschnitt (5µm). Weiße Pfeile markieren exemplarisch kleine sklerotisierte Glomeruli, die in direktem Kontakt zur Nierenkapsel stehen. Links ist zum Vergleich der entsprechende COX-2-Wildtyp abgebildet.

Abb.3.9 zeigt hierzu exemplarisch Ausschnitte von zur Rekonstruktion verwendeten mikroskopischen Aufnahmen. Es handelt sich dabei um immunhistologisch gegen α -Glattmuskelaktin und Renin gefärbte COX-2 $-/-$ und Wildtyp-Nierengewebeschnitte.

Auf ein im Knockout schon in den frühen postnatalen Stadien beginnendes gestörtes kortikales Wachstum des arteriellen Gefäßbaums deuten auch die Rekonstruktionen von pp1 und pp3 (**Abb.3.3-5**). Die am Nierenrand liegenden Gefäße erscheinen dort bereits etwas

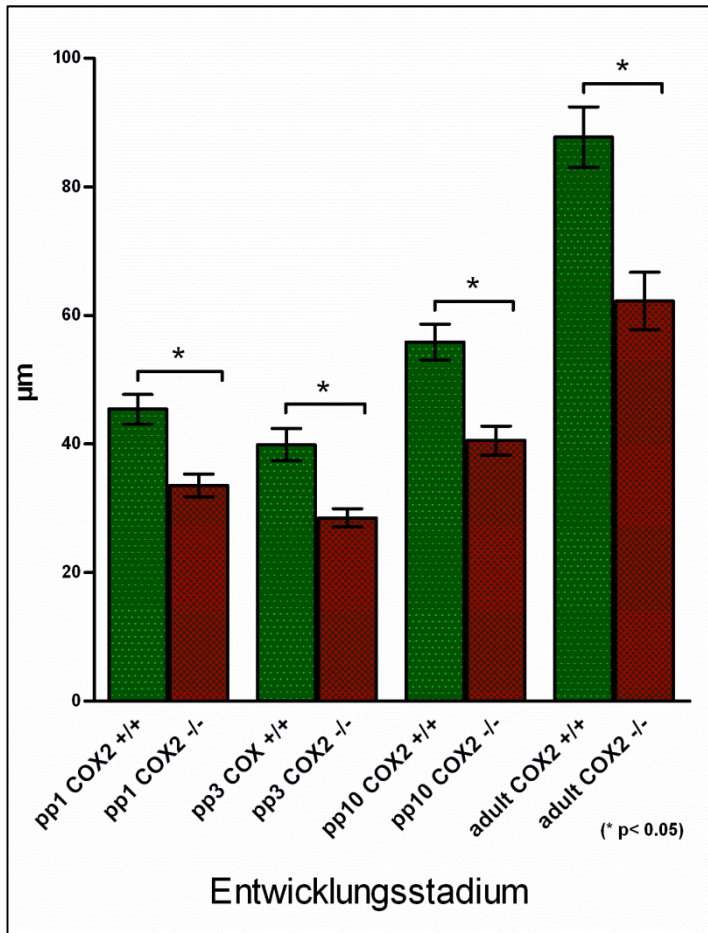


Abb.3.10 Längenmessung superfizieller afferenter Arteriolen von COX-2 $-/-$ verglichen zu Wildtypmäusen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Gemessen wurde aus den erstellten 3D-Modellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 20-40 afferenten Arteriolen pro Entwicklungszeitpunkt und Versuchsgruppe.

* bezeichnet signifikante Unterschiede von $p < 0.05$

verdichtet. Am postpartalen Tag 10 (**Abb.3.5**) ist der Phänotyp des adulten COX-2 $-/-$ schon deutlich erkennbar. Der Gefäßbaum zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp gestaucht und die afferenten Arteriolen der kortikalen Zone bilden doldenartige Glomerulibündel direkt unterhalb der Nierenkapsel. Um die optischen Eindrücke zu quantifizieren, zeigt **Abb.3.10** die Längenmessung der superfiziellen afferenten Arteriolen aus den rekonstruierten Modellen der einzelnen Stadien des Wildtyps und Knockouts im Vergleich. Es war eine durchweg klar messbare Verkürzung der oberflächigen afferenten Gefäße im Knockout festzustellen.

1.5. Immunhistologische COX-2-Lokalisationsstudien

Um eine mögliche parakrine Wirkung von COX-2 stammenden Prostaglandinen auf die Reninzellen zu untersuchen, wurden immunhistochemische Co-Färbungen von COX-2, Renin

und α -SMA als Gefäßindikator an C57Bl/6 Wildtypmäusen unterschiedlichen Alters ausgewertet. Da der einzige gefundene, für die Mausniere signalgebende COX-2-Antikörper, eine sehr hohe Artefaktfärbung von Erythrozyten verursacht, mussten sämtliche zur Immunhistologie verwendeten Nieren perfundiert werden. Es wurde Gewebe einer Entwicklungsserie (E18, pp1-pp7, pp10, pp14, pp21) und adult untersucht.

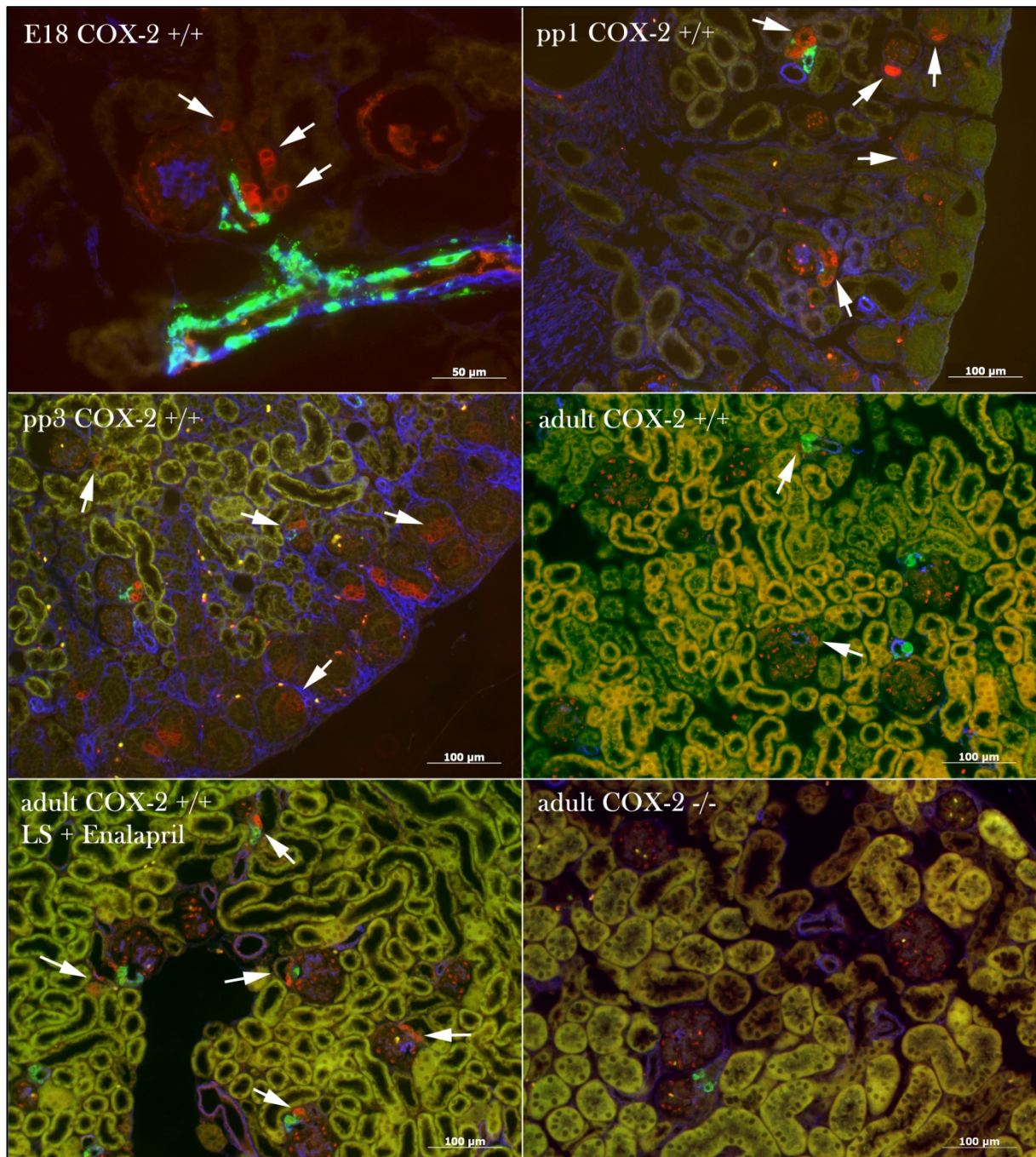


Abb.3.11 Immunfluoreszenzfärbungen von COX-2, Renin und α -SMA (als Gefäßindikator) in Wildtypnierenschnitten unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Dargestellt sind COX-2- (rot), Renin- (grün) und α -Glattmuskelaktinimmunreaktivität (blau) auf Paraffinschnitten (5μm) perfundierter Nieren. Gezeigt sind Färbungen von COX-2 +/+ Mäusen der Stadien E18, pp2, pp3, adult, unbehandelt und mit LS, Enalapril behandelt sowie die zugehörige adulte COX-2 -/- Negativkontrolle. Weiße Pfeile kennzeichnen exemplarisch COX-2-Signale.

In sämtlichen postpartalen Stadien bis hin zum adulten Stadium konnte COX-2, wenn auch nicht immer in gleichem Ausmaß, im Bereich der Macula densa (MD) und vereinzelt interstitiellen Zellen der Medulla und Papille beobachtet werden. Sporadisch und äußerst selten zeigten sich einzelne Zellen großer Blutgefäße COX-2 immunpositiv. In adulten, unter Normalbedingungen gehaltenen Mäusen konnte eine COX-2-Produktion vereinzelt in der MD-Region und in interstitiellen Zellen der Medulla detektiert werden. Es zeigte sich hier nur eine sehr geringe Abundanz. Bei mit LS und ACE-Inhibitor behandelten Tieren ließ sich COX-2-Expression fast an jeder Macula densa finden und auch die COX-2-Abundanz in Medulla und Papille war erhöht (**Abb.3.11**). In Nierenschnitten von COX-2-Knockouttieren konnte keine COX-2-Immunreaktivität festgestellt werden (**Abb.3.11**, adult COX-2 -/-). In Korrelation zu den COX-2-mRNA-Analysen zeigten fötale und postpartale Stadien eine deutlich höhere COX-2-Abundanz. In reifenden Nieren ließ sich COX-2-Expression verstärkt in kortikalen tubulären Strukturen beobachten. Schon am Embryonaltag 18 konnte COX-2-Immunreaktivität an juxtamedullären Glomeruli im Bereich der Macula densa nachgewiesen werden (**Abb.3.11**, E18). Auffällig in den noch unreifen Nieren war, dass eine zunächst schwache Synthese von COX-2 in der nephrogenen Zone direkt unterhalb der Nierenkapsel oft zellclusterartig auftrat. Auch in den Vorläuferformen der frühen, sich entwickelnden Nephrone, wie den komma- und S-förmigen Körperchen (comma-shaped body = CSB, S-shaped body = SSB) zeigte sich COX-2-Abundanz (**Abb.3.11**, pp1, pp3).

Zu keinem untersuchten Entwicklungszeitpunkt konnte eine direkte Co-Lokalisation von Renin und COX-2 gefunden werden. Außerdem standen Renin und COX-2 bildende Zellen meist lediglich im Bereich der Macula densa in enger räumlicher Nähe zueinander. Dies war selbst im Entwicklungsstadium E18 der Fall, in dem noch eine sehr flächige Reninexpression nahezu entlang des gesamten Gefäßbaums auftritt (**Abb.3.11**, E18). Es konnte beobachtet werden, dass COX-2 in der Region der Macula densa oft in größerem Umfang gebildet wurde, bevor dort die volle Reninexpression erreicht war. Mit zunehmender Reninimmunreaktivität an juxtaglomerulärer Position begann sich die COX-2-Expression dort meist bereits wieder abzuschwächen.

Da die Malformationen der COX-2-Knockoutmaus vor allem im äußeren Kortex auftreten, war es von Interesse die genaue Lokalisation der COX-2-Signale zu determinieren, besonders den Abschnitt des heranreifenden Nephrons, in welchem COX-2-Expression erstmals auftritt.

Dazu wurden immunhistologische Tests mit verschiedenen Nephronabschnittsmarkern (*nach Georgas K. et al., 2009*) durchgeführt. Verwendet wurden zu diesem Zweck perfundierte Nieren der postnatalen Entwicklungsstadien pp1-pp5, welche eine ausgeprägte nephrogene Zone besitzen. Als Indikatoren für einzelne Segmente im sich entwickelnden Nephron wurden K-Cadherin (Cdh6) und Wilmstumorfaktor 1 (WT1) gewählt.

Bei K-Cadherin handelt es sich um ein transmembranes Zell-Zell-Adhäsionsprotein, dessen Expression während der Nephrogenese im späten distalen renalen Vesikel, im oberen Bogen des kommaförmigen Körperchens, im medialen Segment des S-förmigen Körperchens und im Phase III Nephron hauptsächlich in der Anlage der Henle-Schleife stattfindet. WT1 als ein Transkriptionsfaktor wird im Zuge der Nephrogenese in der Ureterspitze, im prä tubulären Aggregat, im proximalen renalen Vesikel, dem proximalen Teil des CSBs (unteres Segment) und des SSBs sowie später in der Bowman-Kapsel (viscerales und parietales Blatt) im Glomerulus exprimiert. **Abb.3.12** zeigt zur besseren Orientierung die Wt1- und Cdh6-Verteilung im CSB und SSB, bearbeitet nach *Georgas K. et al. (2009)*.

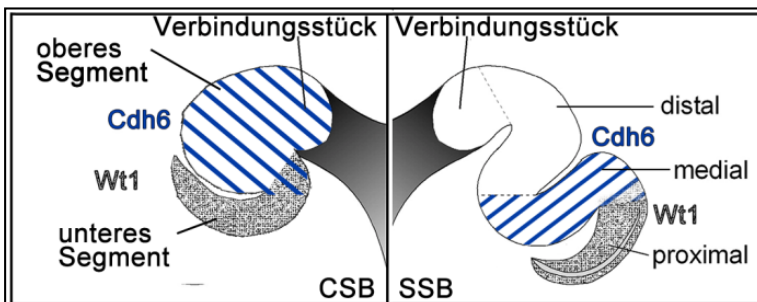
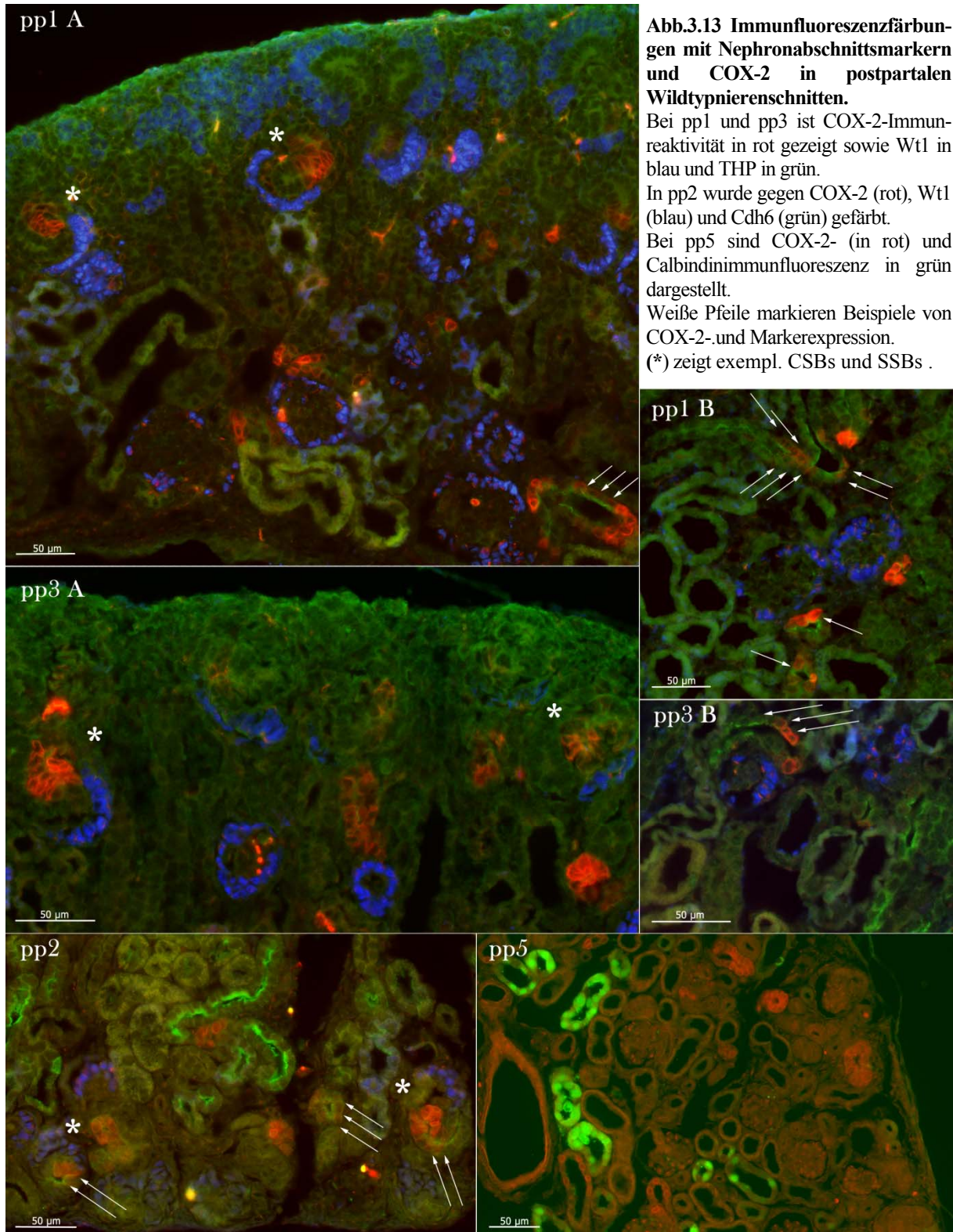


Abb.3.12 Schematische Einteilung des komma- (CSB) und S-förmigen Körperchens (SSB) mit Expressionsverteilung von Wt1 und Cdh6. (Grafik bearbeitet nach *Georgas K. et al., 2009*)

Als Marker des dicken aufsteigenden Asts der Henle-Schleife (*thick ascending limb of Henle, TAL*) wurde gegen das luminal membranständige Tamm-Horsfall-Glycoprotein (THP) gefärbt. Als Indikator des distalen Tubulus diente das Calciumbindepotein Calbindin.

Es zeigte sich keine Co-Lokalisation von WT1 und COX-2. Allerdings fanden sich oft Stellen innerhalb der nephrogenen Zone, in komma- und S-förmigen Körperchen (in **Abb.3.13** exemplarisch mit * markiert) in denen beide Signale ineinander übergehen oder sich nur, durch einige nichtgefärbte Nephronzellen unterbrochen, aneinanderreihen. In Schnitten die zusätzlich mit Cdh6 gefärbt waren, konnte in Zellen dieser frühen Nephronstrukturen außerdem eine teilweise Co-Lokalisation von Cdh6 und COX-2 festgestellt werden. Zur Veranschaulichung wurden einige solcher Stellen in **Abb.3.13**, pp2 mit weißen Pfeilen

hervorgehoben. COX-2-Synthese erfolgt im frühen Nephron demnach meist in dem sich WT1 positiven Segment unmittelbar anschließenden, K-Cadherin exprimierenden Segment. Folglich also dem oberen Teil des CSB und der medialen Region des SSB.



Die mittlkortikale COX-2-Expression war dagegen in THP-positiven Bereichen zu finden (**Abb.3.13**, pp1A, weiße Pfeile). Wobei sich die COX-2-Immunreaktivität nicht über den gesamten THP exprimierenden Nephronabschnitt erstreckte, sondern nur stellenweise auftrat (in **Abb.3.13**, pp1B mit weißen Pfeilen markiert). COX-2-Produktion findet sich demzufolge im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife. Im Bereich der MD schließen sich COX-2 exprimierende Zellen den THP immunreaktiven Zellen an (in **Abb. 3.13**, pp3B mit weißen Pfeilen markiert). Eine gemeinsame COX-2- und Calbindin-Expression im distalen Tubulus konnte nicht beobachtet werden (**Abb.3.13**, pp5).

2. Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung in reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmäusen

2.1. Reninzellspezifische Deletion von TGF- β RII mit Hilfe des *Cre/loxP*-Rekombinasesystems

Der reninzellspezifische Knockout von TGF- β RII (TGF- β RII RenCre^{fl/fl} oder TGF β RII RC ^{-/-}) mit dem *Cre/loxP*-Rekombinationssystem bietet eine elegante Möglichkeit, TGF- β RII



Abb.3.14 Agarosegel zum Deletionsnachweis des geflochtenen TGF- β RII-Genbereichs in der RenCre^{fl/fl}-Maus

(PCR nach Chytil A. et al., 2002).

Eine Rekombination wird mit einer Bande bei ca. 720bp angezeigt. Der schwarze Pfeil markiert die Längenstandardbande 700bp.

ausschließlich in solchen Zellen zu deletieren, bei denen im Laufe der Entwicklung der Reninpromotor aktiv wird. Es wurden dazu TGF- β RII RenCre^{fl/fl} Mäuse generiert, bei denen ein das Exon 3 umfassender Bereich des TGF- β RII-Gens mit *loxP*-Sequenzen flankiert ist. Die *Cre*-Rekombinase steht dabei unter der Kontrolle des Reninpromotors. Wird dieser abgelesen, kommt es zur Aktivierung der *Cre*-Rekombinase und eine Rekombination, damit eine Deletion des von *loxP*-flankierten TGF- β RII-Genbereichs, findet statt.

Systemische Störgrößen, die auf das Fehlen von TGF- β RII in anderen Organen zurückzuführen wären, können so weitestgehend ausgeschlossen werden. Als wildtypische Kontrollen dienten TGF-

β RII RenRen^{fl/fl} Mäuse (TGF β RII RR ^{+/+}, Mäuse ohne *Cre*-Rekombinase, aber mit gefloxtem TGF- β RII Gen). Beim Erstellen der Entwicklungsserie wurden alle Nierenstadien zu histologischen Untersuchungen und Rekonstruktionen perfundiert. Außerdem wurden zusätzlich Blutproben und native Nieren für weitere Analysen entnommen.

Als erstes musste überprüft werden, ob der im TGF- β RII-Gen geflochte Bereich in den verwendeten RenCre-Mäusen auch tatsächlich deletiert war. Dazu wurde renale genomische DNA von neugeborenen TGF- β RII RenCre^{fl/fl} und TGF- β RII RenRen^{fl/fl} Mäusen untersucht. In diesem Alter erfolgt eine sehr hohe Reninexpression, d.h. Reninpromotor- und damit *Cre*-Rekombinaseaktivität sollten zu diesem Zeitpunkt bereits hoch aktiv sein. Getestet wurde

mit den von *Chytil A. et al.* (2002) designten Primern, die, sofern eine Rekombination stattgefunden hat, eine Bande bei ca. 720bp amplifizieren. Beim wildtypischen Gen wird unter den verwendeten PCR-Bedingungen kein Produkt erwartet, da dieses mehrere kbp groß ist. **Abb.3.14** zeigt das Agarosegel einer solchen PCR. Die im TGF- β RII RenCreffl detektierte Bande läuft in der für die Deletion erwarteten Höhe, was darauf schließen lässt, dass die Cre-Rekombinase aktiv war. Im RenRenffl konnte keine Bande dieser Größe festgestellt werden.

2.2. TGF- β RII-Expression während der murinen Nephrogenese

Abb.3.15 zeigt zunächst den zeitlichen Verlauf von TGF- β RII- im Vergleich zur Renin-mRNA-Expression einer Entwicklungsserie. Untersucht wurden für die Nephrogenese repräsentative Nierenstadien von TGF- β RII RenRenffl Kontrollmäusen, beginnend mit Embryonaltag 16.

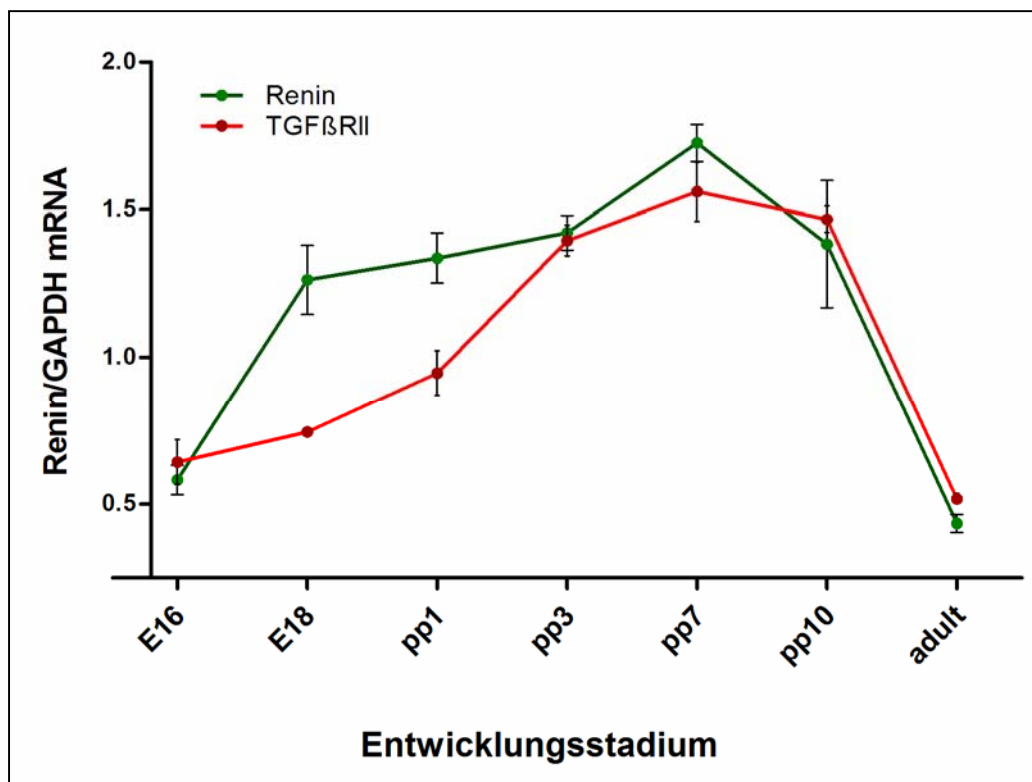


Abb.3.15 TGF- β RII- und Reninexpression in TGF- β RII RenRenffl Kontrollmäusen während der Entwicklung.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 3-6 Nieren pro Entwicklungszeitpunkt.

Es wird deutlich, dass Renin- und TGF- β RII-mRNA im zeitlichen Verlauf weitestgehend korrelieren. Die geringste Abundanz von Renin und TGF- β RII in der Entwicklung wurde an E16 gemessen. Von E18 ausgehend konnte während der weiteren fötalen und postpartalen Entwicklung bis pp3 ein deutlicher Anstieg der beiden Expressionskurven detektiert werden. Die höchste mRNA-Abundanz zeigte sich zwischen pp3-pp10. Im adulten Tier war ein Abfall der Expression auf das niedrigste gemessene Expressionslevel erkennbar. Außer in den Stadien E18 und pp1, bei denen die TGF- β RII- unter der Reninexpression bleibt, weisen alle anderen vermessenen Stadien nahezu den gleichen mRNA-Level beider Proteine auf.

2.3. Bestimmung der Plasmareninaktivität während der Entwicklung in TGF β RII $-/-$ Mäusen

Die gesammelten Blutproben der TGF β RII RC $-/-$ und RR $+/+$ Entwicklungsserie wurden zur Bestimmung des im Blutkreislauf zirkulierenden aktiven Renins für RIA-(radioimmunassay)-Messungen verwendet. Dazu wurde die Umsatzrate von Angiotensinogen zu Angiotensin I (ANGI) im Blutplasma mittels radioaktiv markierter Antikörper ermittelt. Dieser Umsatz spiegelt die Reninenzymaktivität wider, welche direkt proportional zum Reningehalt des Plasmas ist.

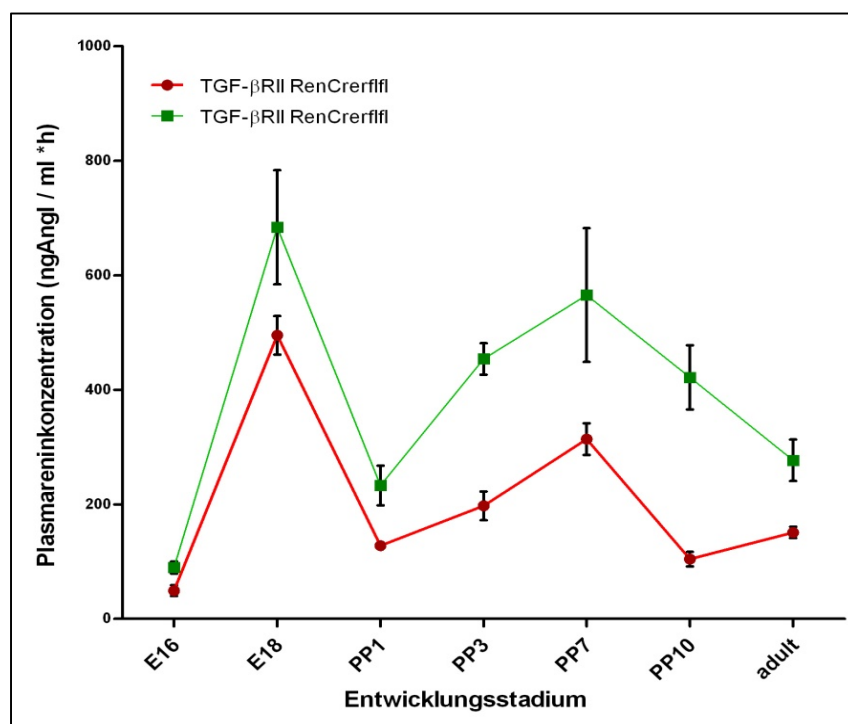


Abb.3.16 Plasmareninkonzentration in TGF- β RII RenCreffl Mäusen während der Entwicklung. Zum Vergleich mit dargestellt ist die PRC der jeweiligen TGF- β RII RenRenffl Kontrollgruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von je 3-8 Plasmaproben pro Entwicklungszeitpunkt.

Die Ergebnisse aus den RIA-Analysen der Proben zeigen, dass die TGF- β RII RenCreffl Mäuse verglichen zu den RenRenffl Kontrollmäusen eine sich durch die komplette Entwicklungsserie fortsetzende erniedrigte Plasmapreninkonzentration (PRC) aufweisen (**Abb.3.16**). In der Kontrollgruppe wurden maximale Umsatzraten (von ca. 600 ng ANGI/ml Plasma*h) an E18 und im Alter um pp7 gemessen. Ein Minimum der PRC (um 100 ng ANGI/ml Plasma*h) wurde an Embryonaltag 16 festgestellt. Ausgehend von diesem Niveau steigt die PRC bis E18 zunächst auf das etwa 7-fache und fällt dann zum postpartalen Tag 1 auf ca. den Wert 250 (ng ANGI/ml Plasma*h) zurück. Ein 2. Maximum findet sich um die 1. Woche nach der Geburt. Zum Adultstadium senkt sich die Reninaktivität wieder bis auf etwa pp1-Niveau ab. Der PRC-Verlauf im TGF- β RII RenCreffl Tier gleicht im Hinblick auf die Stadien minimaler und maximaler Reninplasmaaktivität dem der Kontrollgruppe, zeigt sich generell zu dieser jedoch erniedrigt. Wieder beginnend mit der minimal ermittelten Aktivität an E16 von 50 ng ANGI/ml Plasma*h steigt die PRC in den konditionalen Knockoutmäusen auf das 10-fache in E18 an. An pp1 zeigt sich lediglich noch 25% der 2 Tage zuvor ermittelten Umsatzrate. Bei pp3 und pp7 ist ein erneuter Anstieg der Plasmapreninaktivität zu erkennen. An pp10 (ca. 100 ng ANGI/ ml Plasma*h) senkt sich diese knapp unter pp1-Level ab. Anders als bei der Kontrollgruppe ist die PRC im adulten Tier im Vergleich zu pp10 leicht erhöht. Sie befindet sich wieder in etwa auf pp1-Niveau.

2.4. Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung im Verlauf der Entwicklung von TGF- β RII RenCreffl Mäusen

In Kombination zu dieser Messung wurde das Renin-mRNA-Profil der zugehörigen TGF- β RII RenCreffl Tiere der Entwicklungsserie bestimmt. **Abb.3.17** zeigt die Renin mRNA-Werte der Kontroll- und Knockoutmäuse in einem Balkendiagramm gegenübergestellt.

Die TGF β RII RC -/- Entwicklungsgruppen scheinen gegenüber den Kontrolltieren zwar eine Tendenz zu gesenkter Reninproduktion zu besitzen (E18, pp3), eine signifikant (für $p < 0.05$) erniedrigte Renin-mRNA-Abundanz konnte jedoch nur an pp7 festgestellt werden. Alle anderen untersuchten Entwicklungsstadien zeigten zur Kontrollgruppe vergleichbare Reninexpressionslevel. Abgesehen von der starken Senke bei pp1, die bei den mRNA-Analysen weitaus weniger ausgeprägt ist und dem Minimal- (an E16) bzw. Maximalwert (an E18), korreliert das Renin-mRNA-Expressionsprofil weitestgehend mit dem zeitlichen Verlauf der Plasmapreninaktivität. Anders als bei den Messungen der Plasmapreninaktivität

zeigt sich im renalen mRNA-Reningehalt in den konditionalen Knockouttieren allenfalls eine Tendenz zu gesenkter Reninproduktion, aber kein signifikanter Unterschied zu den Wildtypen.

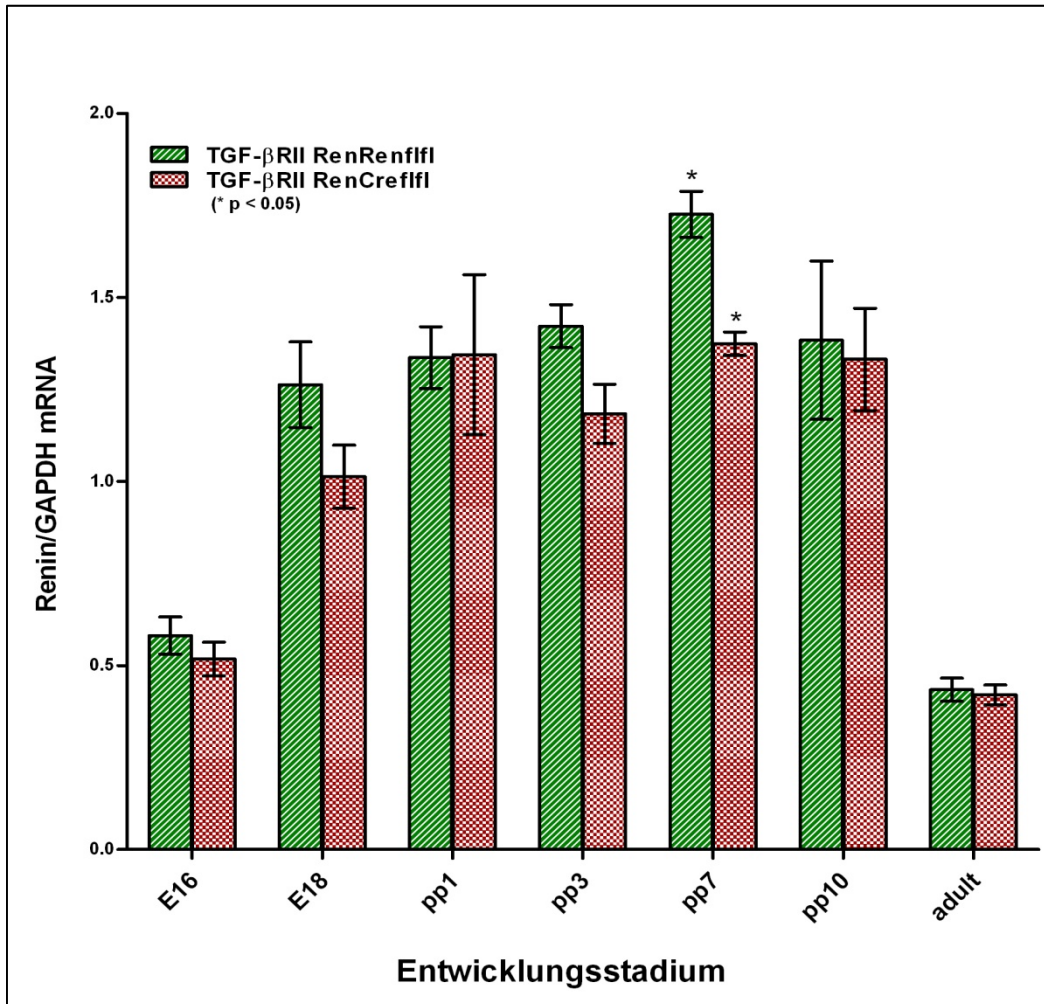


Abb.3.17 Reninexpression von TGF-βRII RenCreflfl und RenRenflfl Mäusen während der Entwicklung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM von 3-8 Nieren pro Entwicklungszeitpunkt.* bezeichnet signifikante Unterschiede von $p < 0.05$.

Um festzustellen, ob der reninzellspezifische TGF-βRII-Knockout Auffälligkeiten in der Reninzellrekrutierung aufweist, wurden 3D-Rekonstruktionen, die Teile des renalen Gefäßbaums und die Reninexpression zeigen, angefertigt. Dazu wurde das räumliche Reninexpressionsmuster am Embryonaltag 18 und postpartalen Tag 1 sowie im Adulttier untersucht. Weder im rekonstruierten prä- und postnatalen noch im adulten TGFβII RC -/- Stadium wurden wesentliche Abweichungen zu den Kontrolltieren im Hinblick auf die Reninmenge und -verteilung beobachtet. Auch der Gefäßbaum sowie die Nieren generell waren wildtypisch entwickelt.

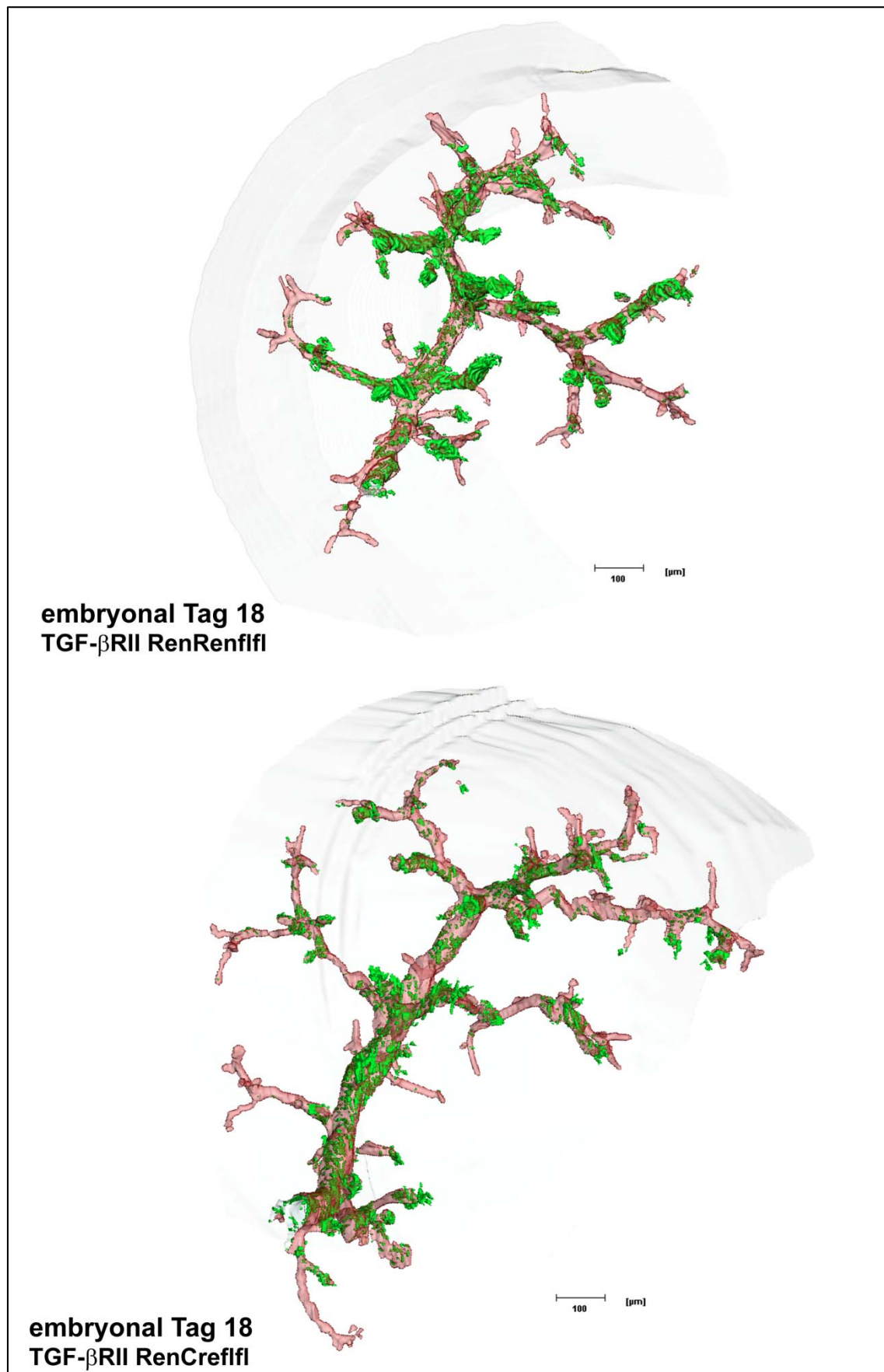


Abb.3.18 Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer TGF- β RII RenCreflfl und TGF- β RII RenRenflfl Maus an Embryonaltag 18. Gezeigt ist jeweils ein arcuater Ast. Dargestellt sind arterielle Gefäße in rot, die Reninverteilung in grün und zusätzlich die Kapsel in gelb.

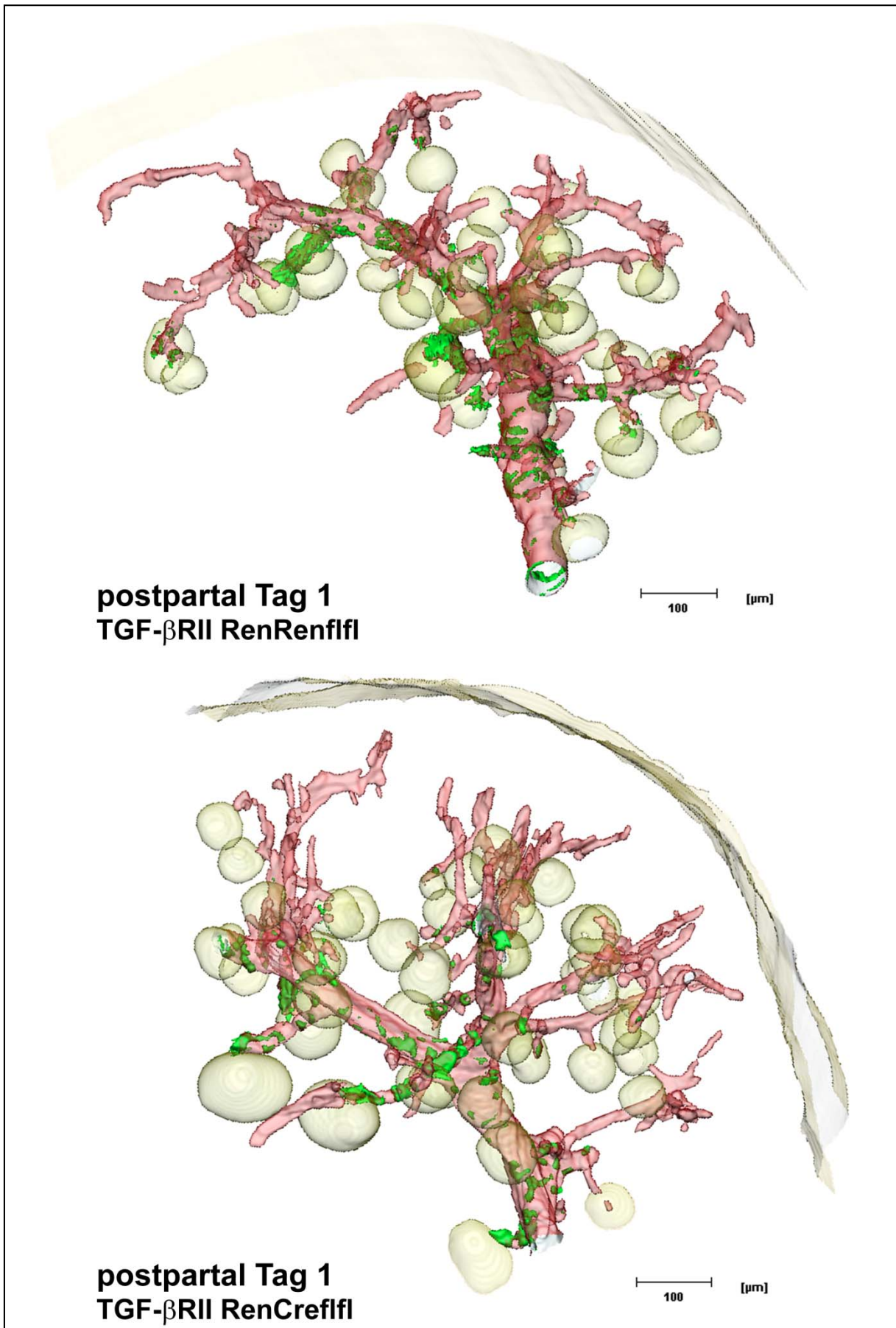


Abb.3.19 Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen von TGF- β RII RenCreflfl und TGF- β RII RenRenflfl Nieren an Postpartaltag 1. Gezeigt sind kortikale Abschnitte des Gefäßbaums, ausgehend von einem arcuaten Ast. Der Gefäßbaum ist in rot dargestellt, Renin in grün und zusätzlich die Nierenkapsel und exemplarisch Glomeruli in gelb.

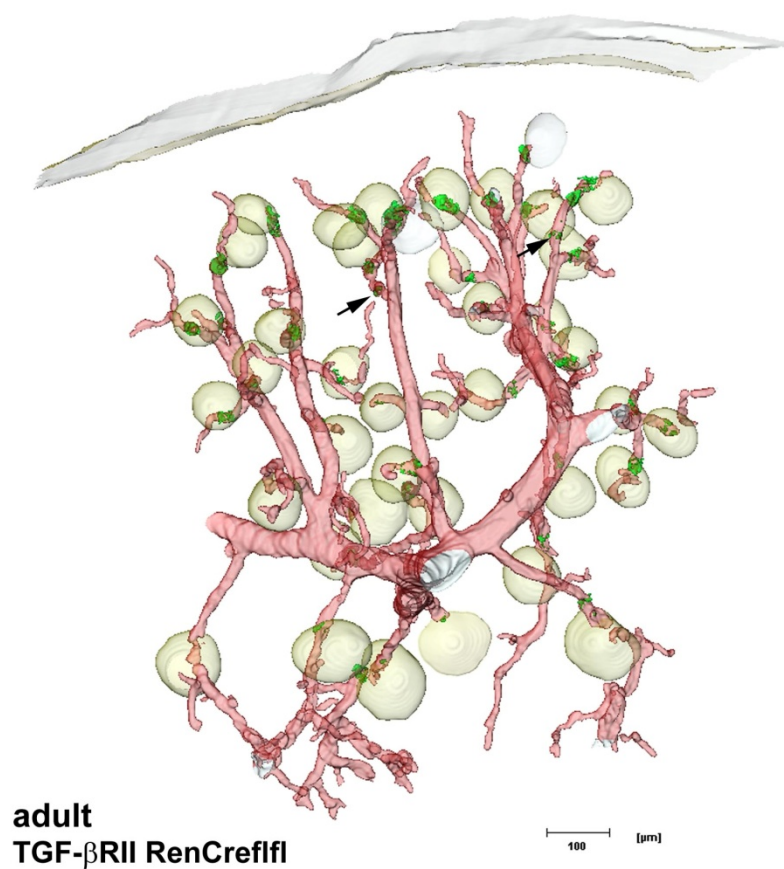
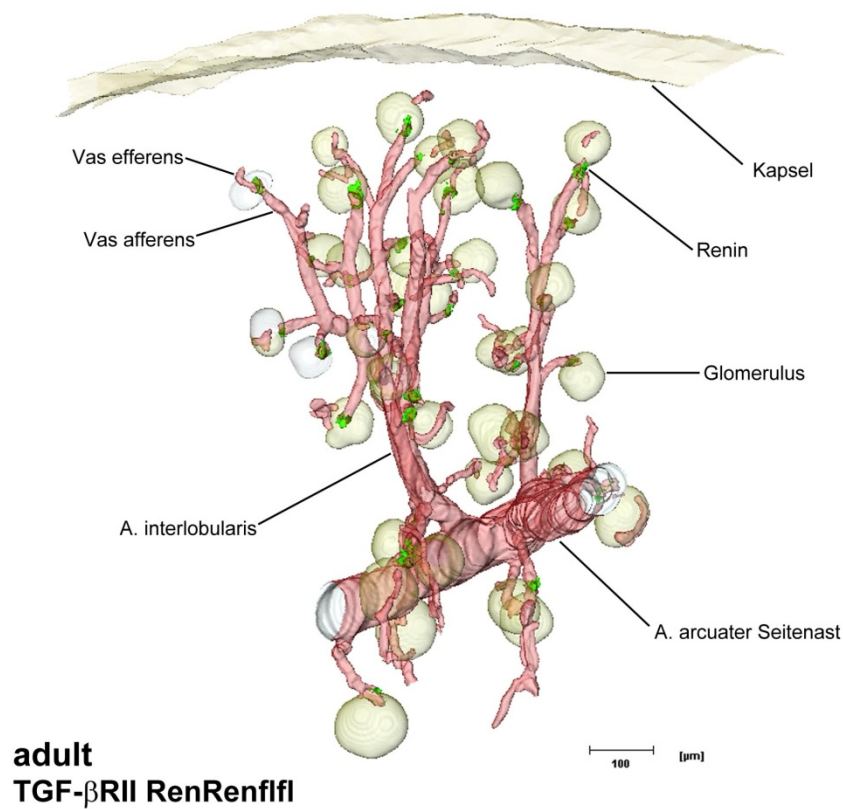


Abb.3.20 Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen von adulten TGF-βRII RenCreflf und TGF-βRII RenRenflf Nieren. Gezeigt ist je ein kortikaler Abschnitt des Gefäßbaums, ausgehend von einem arcuaten Ast. Der Gefäßbaum ist in rot dargestellt, Renin in grün und zusätzlich die Nierenkapsel und exemplarisch Glomeruli in gelb. Schwarze Pfeile markieren im TGF-βRII RenCreflf Modell Stellen von Reninzellbänderung.

Abb.3.18 zeigt die Rekonstruktion eines arcuaten Bogens einer TGF- β RII RenCreflfl Maus an Embryonaltag 18 und der entsprechenden Kontrolle. Bei beiden ist eine Reninexpression, ausgehend vom arcuaten Bogen noch, flächig entlang des gesamten Gefäßbaums zu finden. Ansatzweise ist bereits der Rückzug hin zu den weiter distal gelegenen Gefäßbereichen zu erkennen. Es lässt sich im TGF- β RII RenRenflfl als auch im RenCreflfl ein für dieses Entwicklungsstadium typisches Reninexpressionsmuster erkennen.

Bei den Modellen von pp1 und adult wurden Gefäßbaumteilbereiche, jeweils beginnend mit einem arcuaten Seitenast rekonstruiert. Zusätzlich wurden in diesen Abbildungen Glomeruli mit dargestellt.

Einen Tag nach der Geburt an pp1 (**Abb.3.19**) findet sich Reninsynthese im Kontrolltier und im TGF β RII RC -/- in den interlobularen Arterien sowie afferenten Arteriolen und zwar vorwiegend in den Vasa afferentia des inneren Kortex. In großen arcuaten Gefäßen lässt sich die Reninexpression nur noch in einem diskontinuierlichen Muster, hauptsächlich an Verzweigungspunkten zu den interlobularen Arterien, beobachten.

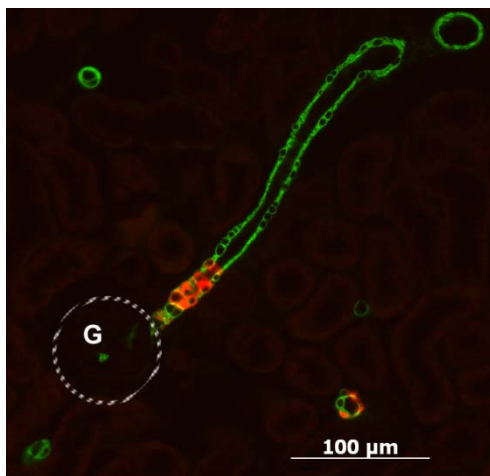


Abb.3.21 Renin- und α -SMA- Immunfluoreszenzfärbung von Nierengewebe einer adulten TGF- β RII RenCreflfl Maus. Gezeigt ist eine Bänderung von Reninzellen (rot) in einer afferenten Arteriole (α -SMA in grün dargestellt) ausgehend vom Glomerulus (G).

Im Adulttier ist die Reninproduktion basal auf seine klassische juxtaglomeruläre Position in der Wandung der afferenten Arteriole begrenzt (**Abb.3.20**). Einziger erkennbarer Unterschied zur TGF- β RII RenRenflfl Maus war eine im RenCre-Tier äußerst sporadisch auftretende Reninexpression in weiter oberhalb des Gefäßpols liegenden Bereichen der afferenten Arteriole. In der Rekonstruktion **Abb.3.20** (mit schwarzen Pfeilen markiert) sind zwei solcher Bänderungen zu finden.

Abb.3.21 zeigt ein zugehöriges immunhistologisches Bild eines Nierengewebeschnitts einer adulten TGF- β RII RenCreflfl Maus welcher gegen α -Glattmuskelaktin und Renin gefärbt wurde. Dort gut zu erkennen ist eine vom Pol der afferenten Arteriole ausgehende, streifenartig in weiter entfernt gelegene Gefäßwandbereiche ausgedehnte Reninexpression. Solche Bänderungen treten in der adulten Niere im Normalfall unter Stimulation zur Reninproduktion im Zuge von retrograder Reninzellrekrutierung auf.

2.5. Untersuchungen zur Reninzellrekrutierung in adulten TGF- β RII RenCrefl Mäusen

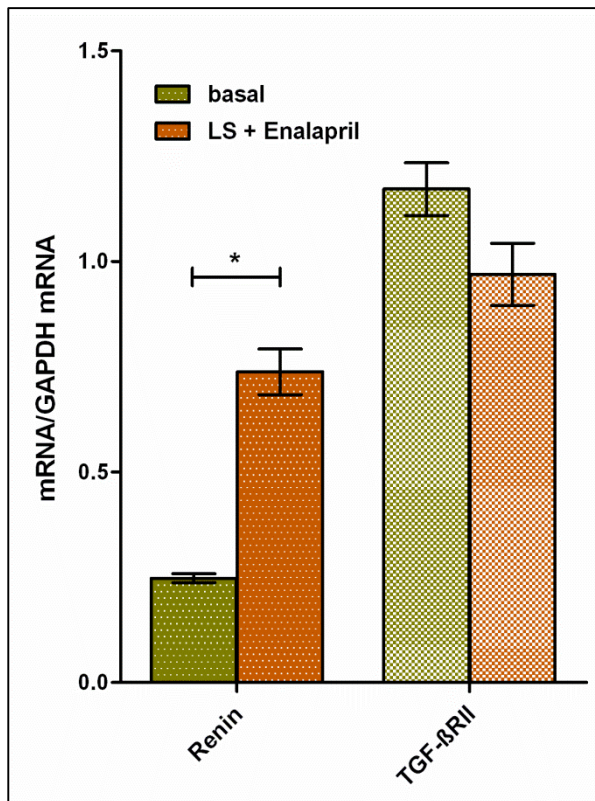


Abb.3.22 Renin- und TGF- β RII-Expression von adulten TGF- β RII RenCrefl Mäusen unter Stimulation des RAAS. Dargestellt sind die mRNA-Daten, links jeweils basal und rechts unter Behandlung mit LS+Enalapril. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von je 5-6 Nieren pro Versuchsgruppe.

* indiziert Signifikanz für $p < 0.05$.

In den Kontrollmäusen zeigte sich unter Stimulation eine gegenüber der basalen Expression deutlich erhöhte Renin-mRNA-Abundanz. Die TGF- β RII-Expression blieb dagegen unbeeinflusst (**Abb.3.22**). Die Renin- und TGF- β RII-Expression korrelieren unter LS- und Enalaprilbehandlung demnach nicht.

Eine Stimulation des RAAS war auch im TGF β RII RC $-/-$ generell möglich und zwar im gleichen Ausmaß wie in den Kontrollmäusen. **Abb.3.23** zeigt die Daten der Renin-mRNA-Messung von TGF- β RII RenCrefl Nieren verglichen mit den

Um mögliche Auswirkungen einer reninzell-spezifischen TGF- β RII-Defizienz auf die Reninzellrekrutierung im Adulttier feststellen zu können, wurden Mäuse mit stimulierten RAAS untersucht. Dazu wurden RenCrefl- und Kontrollmäuse einer 7-tägigen Niedrigsalzdiät unterzogen (LS). Ab dem 4. Tag der Diät wurde diesen außerdem zusätzlich der ACE-Inhibitor Enalapril verabreicht.

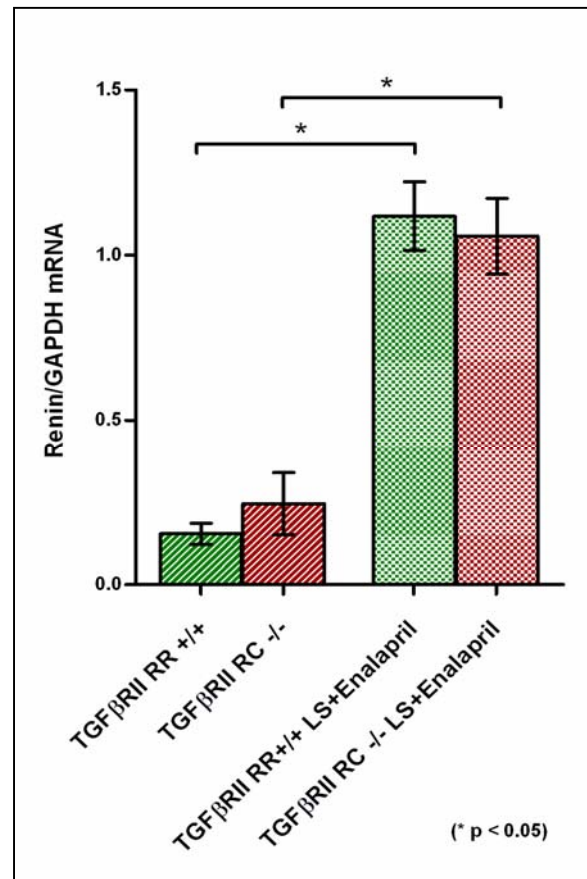


Abb.3.23 Reninexpression in mit LS und Enalapril behandelten TGF- β RII RenCrefl Mäusen.

Gezeigt sind die Daten aus mRNA-Messungen von TGF- β RII RenCrefl und TGF- β RII RenRenfl Mäusen. Dargestellt ist jeweils die basale (links) und die stimulierte (rechts) Renin mRNA-Expression. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von je 20 Nieren pro Versuchsgruppe.

* indiziert Signifikanz für $p < 0.05$.

entsprechenden RenRenflfl Mäusen. Sowohl Kontroll- als auch TGFβRII RC -/- lassen sich zu einer des Basalwerts etwa 6-fachen Reninsynthese anregen. Die RenCreflfl-Mäuse zeigten weder in der basalen noch in der LS und Enalapril stimulierten Reninexpression einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

In **Abb.3.24** sind die 3D-Rekonstruktionen zu diesen Messungen dargestellt. Auch dort konnte bezüglich der Reninmenge keine klar ersichtliche Abweichung zum Wildtyp im Knockoutmodell festgestellt werden. Allerdings zeigte sich im Gegensatz zum TGF-βRII RenRenflfl Tier zusätzlich zur Reninzellrekrutierung in den afferenten Arteriolen auch eine vereinzelte Reninabundanz in den Gefäßwänden der größeren interlobularen Arterien.

Diskussion

1. Reninzellrekrutierung in COX-2 defizienten Mäusen

Renininduktion erfolgt während der Nephrogenese in einem spezifischen zeitlichen und räumlichen Muster. Die Reninexpression wandert dabei entlang des sich entwickelnden Gefäßbaums über die großen Gefäße bis hin zu seiner juxtaglomerulären Position im Adulttier, wo es im Basalzustand auf diese spezielle Lage beschränkt bleibt. In der ausgereiften Niere kommt es unter Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems allerdings zu einem weiteren Rekrutierungsphänomen im Zuge dessen zusätzliche Zellen der Gefäßwand zur Reninproduktion befähigt werden. Welche Faktoren dieses An- und Abschalten der Reninsynthese in diesen Zellen während der Nephrogenese und in der reifen Niere kontrollieren oder zumindest beeinflussen ist bislang unbekannt. Ziel dieser Studie war es, zu klären ob und – wenn ja – inwieweit COX-2 für die Rekrutierung Renin bildender Zellen im Verlauf der Entwicklung und im adulten Tier eine Rolle spielt.

1.1. Renin- und COX-2 Expression während der Entwicklung

Gesetzt den Fall, dass durch COX-2 gebildete Prostanoiden für die Reninexpression von Bedeutung sind, wäre eine zeitliche Korrelation der Expressionsprofile beider Faktoren anzunehmen. Die Wildtypserie zur COX-2- und Renin-mRNA-Messung umfasste Nieren im Alter zwischen E15 bis adult, also die komplette Phase der Reninzellverlagerung während der Entwicklung. Die Expressionsmuster beider Faktoren waren in ihren entwicklungs-spezifischen Kurvenverläufen zeitlich nicht zueinander korreliert. Zur Phase höchster Reninabundanz, um die Geburt, zeigte COX-2 eine schwache, aber kontinuierlich steigende Expression. Zum Zeitpunkt stärkster COX-2-Bildung, 2-3 Wochen nach der Geburt, war die Reninexpression dagegen auf ihr niedrigstes Niveau im Adultstadium abgesunken. Höchste COX-2-Aktivität war demnach in Nierenreifestadien zu finden, in denen sich Renin bereits vorwiegend an juxtaglomerulärer Position befindet und der Reninzellrekrutierungsprozess

nahezu abgeschlossen ist (*nach Sauter & Machura, 2007*). Zu Entwicklungszeitpunkten des massiven Rückzugs Renin bildender Zellen aus den großen arcuaten Gefäßen von E18-pp1 lag der COX-2-Spiegel dagegen vergleichsweise niedrig.

Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit Befunden zur Reninexpression, die an Ratten erhoben wurden. In späten embryonalen sowie frühen postpartalen Stadien wurde dort zunächst eine schwache COX-2-Expression festgestellt, welche im Verlauf der 1. Woche postpartum anstieg und sich, bis zu einem rapiden Abfall ab der 3. Woche, auf einem wesentlich erhöhten Niveau stabil hielt. Auch der zeitliche Verlauf der Reninexpression zeigte sich ähnlich dem des in der Maus gemessenen (*Zhang MZ. et al., 1997; Stubbe J. et al., 2003*). Der sehr niedrigen COX-2-Abundanz der frühen Nephrogenese zu Grunde liegend postulierten *Stubbe J. et al. (2003)* daher, dass COX-2 nicht mit dem Reninmaximum bei der Geburt in Verbindung gebracht werden kann, sondern vielmehr die Reninsekretion während der postpartalen Säugeperiode unterstützt. Da die Verlagerung Renin exprimierender Zellen schon während der Embryonalentwicklung an E15/E16 beginnt und sich ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich fortsetzt, spricht diese Hypothese auch gegen eine Beteiligung von COX-2 an der Reninzellrekrutierung.

1.2. Renin-mRNA-Expression in COX-2 defizienten Mäusen während der Nierenentwicklung

Obwohl es keine direkte temporäre Korrelation von COX-2- und Reninbildung gibt, weisen dennoch alle untersuchten Knockoutstadien, mit Ausnahme von pp10, einen im Vergleich zum Wildtyp erniedrigten Renin-mRNA-Level auf. Warum in COX-2 defizienten Mäusen 10 Tage nach der Geburt sogar ein zum Wildtyp erhöhter Reninwert gemessen werden konnte ist unklar. Dieses Nierenstadium hebt sich allerdings in voneinander unabhängigen Messungen und Versuchsreihen von allen anderen untersuchten Stadien ab. Auffällig ist, dass es sich dabei um genau den Zeitpunkt handelt, bei dem auch der zeitliche Expressionsverlauf von COX-2 in der Wildtypserie einen markanten Einbruch aufweist. Die gegenüber der Wildtypgruppe signifikant erhöhte Renin-mRNA-Expression im pp10 Knockout bestätigte sich unabhängig davon im 3D-Modell. Ein Fehler in der Methodik oder bei der Messung selbst ist daher unwahrscheinlich.

Aus bisherigen Studien ist bekannt, dass adulte COX-2-Knockoutmäuse eine geringere Reninexpression und -sekretion sowie eine erniedrigte Plasmareninaktivität besitzen (Yang T. et al., 2000; Cheng HF. et al., 2001; Kim SM. et al., 2007). Daten über die Reninabundanz in COX-2 ^{-/-} Mäusen während der Entwicklung existierten bislang aber nicht. Im Zuge dieser Studie konnte bereits im untersuchten Embryonalstadium E18 eine deutlich erniedrigte Reninexpression festgestellt werden. Dort entsprach der Renin-mRNA-Wert nur etwa 70 % dem des in der Wildtypkontrollgruppe gemessenen. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass COX-2, auch trotz seiner schwachen Abundanz, schon in dieser Entwicklungsphase einen Effekt auf die Reninexpression ausübt. Wie aus den 3D-Rekonstruktionen ersichtlich wurde, beeinflusst es dabei weniger die korrekte Reninzellpositionierung als vielmehr die Anzahl Renin exprimierender Zellen. Zwar ist die Reninexpression in den angefertigten Modellen, wieder mit Ausnahme von pp10, sehr viel reduzierter, als die mRNA-Daten aufzeigen, allerdings lässt sich hierzu eine hohe Variabilität in der Sensibilität der unterschiedlichen Methoden aufführen, da eine schwache Expression immunhistologisch schlechter erfasst wird als auf mRNA-Ebene.

In allen rekonstruierten Nierenstadien war Renin auch in den Knockoutmäusen in wildtypischem, entwicklungs-spezifischem Muster in den korrekten Gefäßbaumabschnitten zu finden. Auch im Adultstadium konnte Renin nur in niedrigerer Abundanz als im Wildtyp an seiner klassischen Position am Eingang zum Glomerulus detektiert werden. Die kortikalen oberflächigen Glomeruli direkt unterhalb der Capsula fibrosa zeigten basal, im Gegensatz zu mittkortikalen und juxtamedullären, sehr wenig bis keine Reninimmunreaktivität in den afferenten Arteriolen, was auf eine fehlerhafte Reninzellpositionierung im äußeren Kortex hindeuten könnte. Allerdings wiesen viele dieser Glomeruli nach Stimulation Reninexpression auf (später ausführlich diskutiert), was belegt, dass während der Entwicklung auch an diese Stellen zur Reninproduktion fähige Zellen gelangt sein müssen. Dass Renin in der adulten COX-2-Knockoutmaus basal an juxtaglomerulärer Position exprimiert wird und zwar zu signifikant geringerer Menge als im Wildtyp, bestätigen frühere Untersuchungen von Yang T. et al. (2000).

Die Daten zur Reninexpression in den sich entwickelnden Knockoutnieren mit aufgreifend, kann demnach davon ausgegangen werden, dass der Rekrutierungsprozess von Renin bildenden Zellen, grundsätzlich auch ohne COX-2-Aktivität in korrektem zeitlich-räumlichen Muster stattfinden kann.

1.3. Reninexpression unter Stimulation im COX-2 -/- Adulttier

Erste pharmakologische Untersuchungen an Ratten und Mäusen erweckten den Anschein, dass eine Stimulation der Reninsekretion maßgeblich von der COX-2-Prostaglandinproduktion abhängig ist. Unter Verwendung der COX-2-Inhibitoren NS398 und SC58236 konnte in Folge experimenteller Manöver zur Stimulation des Reninsystems, wie renale Arterienstenose, ACE Inhibition, AT₁-Rezeptorblockade oder Niedrigsalzdiät nur eine abgeschwächte Reaktion des RAAS festgestellt werden (*Hardin P. et al., 1997; Wang JL. et al., 1999; Hardin P. et al., 2000*). Spätere Studien mit neueren selektiven COX-2-Inhibitoren, Rofecoxib und Celecoxib konnten diese Ergebnisse im Bezug auf oralen Salzentzug und Angiotensinblockade allerdings nicht in vollem Umfang bestätigen (*Kammerl MC. et al., 2001; Höcherl K. et al., 2001; Höcherl K. et al., 2002; Castrop H. et al., 2010*).

Im COX-2-Knockoutmodell hingegen, zeigte sich eine deutlich reduzierte basale Reninexpression. Eine Stimulation der Reninsekretion mit Hilfe von Niedrigsalzdiät, ACE-Inhibition, ANGI-Rezeptor-Antagonismus oder reduziertem renalen Perfusionsdruck war in COX-2-Knockoutmäusen gegenüber den Kontrolltieren verringert (*Cheng HF. et al., 2001, Yang T. et al., 2000; Kim SM. et al., 2007*). Die Befunde der hier durchgeführten Studie stimmen weitestgehend mit diesen Beobachtungen überein. Der basale mRNA-Reninpiegel zeigte sich in den COX-2-Knockouttieren verglichen zur Kontrollgruppe deutlich erniedrigt. Gleiches war auch unter Stimulation mit Niedrigsalzdiät kombiniert mit ACE-Inhibition der Fall. Allerdings führte dieses experimentelle Manöver sowohl im COX-2 +/+ als auch im Knockout zu einem signifikanten Anstieg der Reninexpression um ein Vielfaches. Eine Stimulation des Reninsystems war unter den gewählten Versuchsbedingungen bei fehlender COX-2-Aktivität möglich.

Yang T. et al. konnten 2000 zwar einen durch 14-tägige Niedrigsalzdiät induzierten Anstieg der Renin-mRNA, der Reningranulierung in den afferenten Arteriolen und der Reninaktivität in Wildtypmäusen, nicht aber in COX-2-Knockouts feststellen. Eine Stimulation zur Reninsynthese mit Niedrigsalzdiät war demnach in der COX-2-/- Maus nicht möglich. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass in Mäusen, anders als in Ratten, durch Niedrigsalzdiät allgemein nur ein geringer, kein deutlich signifikanter Anstieg der Reninexpression erzielt werden kann. Es wird davon ausgegangen, dass die Tiere ihren Salzbedarf während der Diät über Koprophagie ausgleichen (*persönliche Mitteilung von. J.*

Loffing). Die diskrepanten Ergebnisse dieser Studie stehen mit denen von *Yang T. et al.* (2000) nicht im Widerspruch, sondern basieren vielmehr auf den verwendeten unterschiedlichen Stimulationsprotokollen. Die Stimulation der Reninsynthese im COX-2-Knockout lässt sich demnach auf die Verabreichung des ACE-Inhibitors zurückführen und weniger auf die Niedrigsalzdiät. Dafür würden auch die Beobachtungen von *Wagner C. et al.* (2003) sprechen, welche trotz pharmakologischer COX-Hemmung bei signifikant erniedrigter Prostanoidproduktion nach ACE-Inhibition eine deutliche Stimulation der Reninbildung messen konnten. Von *Cheng HF. et al.* (1999) an COX-2-Knockoutmäusen durchgeführte Versuche mit dem ACE-Hemmer Captopril, bewirkten dagegen im COX-2 $-/-$ weder eine erhöhte Plasmareninaktivität noch renale Renin mRNA-Expression und renale Reninaktivität. Auch konnte im Knockout, anders als in der Kontrolle, nur eine minimale Rekrutierung zusätzlicher Reninzellen beobachtet werden. In jüngeren Arbeiten von *Kim SM. et al.* (2007) wurde aber in COX-2 deletierten adulten Mäusen nach 1-wöchiger Behandlung mit Niedrigsalzdiät in Kombination mit Enalapril ein Anstieg der Plasmareninkonzentration um das 14-fache gemessen. Dass der Rekrutierungsmechanismus Renin bildender Zellen im adulten Knockouttier prinzipiell noch intakt ist, bestätigen auch die 3D-Modelle der hier durchgeführten Studie.

1.4. Bedeutung von COX-2 auf die Reninzellrekrutierung im Adulttier

Die 3D-Modelle dieses Versuchsansatzes machen deutlich, dass unter Stimulation auch im Knockouttier die Reninexpression im JGA-Bereich erheblich verstärkt wird, indem zusätzliche Zellen im Vas afferens rekrutiert werden. Wenngleich die Reninzellrekrutierung an den Glomeruli des juxtamedullären Bereichs am stärksten ausgeprägt war, konnte auch eine erhöhte Reninexpression in den subkapsulären sklerotisierten Glomeruli beobachtet werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass auch in der adulten Maus das An- und Abschalten der Reninsynthese nicht essentiell von einer COX-2-Aktivität abhängig ist.

Die 3D-Rekonstruktionen zeigen im LS & Enalapril behandelten COX-2 $-/-$ -Tier, zumindest an den juxtamedullären Glomeruli, eine klare für die Stimulation typische zusätzliche Reninproduktion in retrograden Bereichen der afferenten Arteriolen. Auffällig ist, dass die Reninexpression im COX-2-Knockouttier basal wie auch unter Stimulation hauptsächlich an

den juxtamedullären Glomeruli und sehr viel schwächer im äußeren Kortex stattfindet. Besonders die direkt unterhalb der Nierenkapsel gelegenen Glomeruli weisen nahezu keine Reninexpression auf, was die Befunde aus der Arbeit von *Yang T. et al. (2000)* erklären könnten, die von einem niedrigeren kortikalen Renin-mRNA-Level in COX-2 Knockoutmäusen berichtet. Die 3D-Rekonstruktionen konnten zeigen, dass sich zwar unter Stimulation auch im Kortex Reninsignale detektieren lassen, allerdings in einem sehr viel geringeren Ausmaß als in der Wildtypkontrolle.

COX-2-Knockoutmäuse besitzen ein gestörtes Nierenwachstum und einen daraus resultierenden stark ausgeprägten renalen Phänotyp. Unter anderem lassen sich im Kortex sklerotisierte Glomeruli finden (*Dinchuk JE. et al., 1995; Morham SG. et al., 1995; Norwood VF. et al., 2000*). Bei den nahezu subkapsulären reninfreien Glomeruli handelte es sich ausschließlich um diese Glomeruli. Es bleibt daher fraglich, ob die fehlende Reninabundanz dort eine direkte Folge der COX-2-Defizienz oder der strukturellen Schädigung ist.

Die Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen zusammenfassend ist zu sagen, dass COX-2 auch im Adulttier kein obligatorischer Faktor des An- bzw. Abschaltmechanismus Renin bildender Zellen im Zuge der Reninzellrekrutierung ist. Für die Stimulation zur Reninexpression und -sekretion an sich, im Besonderen bei der salzabhängigen Regulation des RAAS, scheint es aber eine essentielle Rolle zu übernehmen.

1.5. Renale Störungen von COX-2-Knockoutmäusen

Frühere Untersuchungen an Knockoutmäusen ergaben, dass eine Deletion des COX-2-Gens nicht nur zu einer deutlich verkürzten Lebensdauer, sondern auch zu einem stark ausgeprägten renalen Phänotyp und vermutlich Niereninsuffizienz führt. Wie bereits erwähnt ist dabei hauptsächlich der Kortex betroffen, in dem kleine sklerotisierte Glomeruli, zystische Tubuli und interstitielle Fibrose auftreten. An Vaskulatur und Medulla konnten dagegen keine strukturellen oder funktionellen Aberrationen festgestellt werden. Eine fortschreitende Dysplasie des äußeren Kortex war bereits am postpartalen Tag 10 erstmals zu erkennen (gesamter Abschnitt: *Dinchuk JE. et al., 1995; Morham SG. et al., 1995; Norwood VF. et al., 2000*).

Ein Teil dieser Nierenstörungen war auch in den 3D-Modellen der hier durchgeführten Studie zu erkennen, vor allem in der adulten Niere waren diese massiv ausgeprägt. Es zeigten sich gebündelte kleine sklerotisierte Glomeruli die in direktem Kontakt zur Nierenkapsel standen. Weiter in der Nierenmitte gelegene und sämtliche juxtamedulläre Glomeruli waren dagegen unauffällig. Da die 3D-Rekonstruktionen belegen, dass sich das Reninexpressionsmuster während der Entwicklung im Knockouttier prinzipiell wildtypisch verlagert, liegt die Vermutung nahe, dass die fehlende Reninabundanz in der subkapsulären Region vielmehr in der strukturellen Schädigung der Nephrone, als in fehlender COX-2-Aktivität begründet ist.

Im Gegensatz zu den älteren Befunden der anderen Arbeitsgruppen wurden auch klare Unterschiede in der Struktur des arteriellen Gefäßbaums festgestellt. Dieser erschien generell und besonders im Bereich des äußeren Kortex gestaucht. Die afferenten Arteriolen dort verlaufen direkt unterhalb der Kapsel und sind schirmartig nach unten zur Nierenmitte gedrückt. Die Längenmessung der superfiziellen afferenten Arteriolen konnte belegen, dass schon im frühen postpartalen Stadium pp1 eine signifikante Verkürzung oberflächiger afferenter Arteriolen vorliegt, was darauf hindeutet, dass das gestörte Wachstum zeitlich mit dem Beginn der kortikalen Entwicklung zusammenfällt. Zwar besitzt die reninzellspezifische $G_{s\alpha}$ -Knockoutmaus, welche eine nahezu gänzlich fehlende Reninexpression aufweist, ebenso verkürzte afferente Arteriolen, allerdings ohne die Krümmung zur Nierenmitte und die Ausbildung von Glomerulibündeln wie sie in der COX-2 $-/-$ Maus beobachtet werden konnten (*Neubauer B. et al., 2009*). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass beide Faktoren hinsichtlich der Reninexpression und des Signalwegs nicht in Serie geschaltet sind und die Verkürzung der afferenten Arteriolen in beiden Knockouttieren wohl unterschiedliche Ursachen besitzt.

Viel wahrscheinlicher ist dagegen, dass es sich bei den Malformationen des Gefäßbaums in der COX-2-Knockoutmaus um einen sekundären Effekt, der auf dem gestörten Kortextwachstum beruht, handelt. Die Prozesse der Gefäß- und Nephronentwicklung laufen nämlich während der Nierenreifung parallel zueinander ab und sind aufeinander abgestimmt (*Sariola H., 1991*).

Isolierte JG-Zellen werden von Prostaglandin E_2 (PGE_2) und Prostacyclin (PGI_2) direkt zur Reninsekretion angeregt (*Friis UG. et al., 2005; Jensen BL. et al., 1996*). Sowohl *In-vitro*- als

In-vivo-Studien an Prostaglandinrezeptor deletierten Knockoutmäusen belegen, dass bei der Vermittlung dieses stimulatorischen Signals die Prostanoidrezeptoren EP2, EP4 und IP entscheidend sind. Diese sind G_s-Protein gekoppelt und führen über einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Reninfreisetzung (*Friis UG. et al., 2005; Fujino T. et al., 2004; Schweda F. et al., 2004*). Neueste Untersuchungen von *Neubauer B. et al. (2009)* an reninzellspezifisch defizienten G_{sα}-Mäusen zeigten, dass der cAMP-Signalweg auch bei der Reninexpression während der Nephrogenese eine wichtige Rolle spielt. Die Unterbrechung der Transduktionskette über die Deletion der G_s-Protein Untereinheit G_{sα} führt bereits in der frühen renalen Entwicklung zu einem nahezu vollständigen Verlust der Reninproduktion. Mit von COX-2 generierten Prostanoiden als primäre Auslöser des cAMP-Signalwegs zur Reninzellrekrutierung während der Entwicklung wäre eine serielle Kopplung des renalen Phänotyps von COX-2- und den konditionalen G_{sα}-Knockoutmäusen zu erwarten. In der Signalkaskade ist G_{sα} der Aktivierung der G_s-Protein gekoppelten Prostanoidrezeptoren direkt nachgeschaltet. Die COX-2 vermittelte cAMP-Signaltransduktion wäre damit in reninzellspezifischen G_{sα}-Knockoutmäusen auch komplett unterbrochen und eine serielle Kopplung der renalen Phänotypen daher zwingend.

Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse zur Reninexpression in COX-2 defizienten Mäusen lassen demnach darauf schließen, dass es sich nicht um von COX-2 stammende Prostanoiden als primären Regulator der Reninzellrekrutierung handelt. Zwar zeigte sich in fast allen untersuchten Entwicklungsstadien eine gesenkte Reninexpression, allerdings lag diese immer noch über der Hälfte des Wildtypniveaus. Selbst bei einem denkbaren Ausgleich mit von COX-1 generierten Prostanoiden als Ausgleichsfunktion ist eine so hohe Reninabundanz eher unwahrscheinlich. Auch das korrekte zeitlich-räumliche Muster der Reninexpression in den COX-2-Knockoutmäusen spricht gegen COX-2 als einen entscheidenden Faktor im Hinblick auf den Umschaltmechanismus Renin bildender Zellen, dafür aber vielmehr für einen potenten Stimulator des RAAS schon während der Entwicklung. Ein Wirkmechanismus über Prostanoidrezeptoren und cAMP ist nicht widersprüchlich. Die Beobachtungen in der reninzellspezifischen G_{sα}-Knockoutmaus schließen eine Summation von Effekten resultierend aus einer unterbrochener Signalgebung mehrerer Faktoren, die über den gleichen Signalweg auf die Reninzelle wirken, keineswegs aus.

1.6. Verlauf des zeitlich-räumlichen COX-2-Expressionsmusters

Aufgrund ihrer sehr kurzen Halbwertszeit und ihrer begrenzten lokalen Wirkung ist, sofern COX-2 generierte Prostanoiden während der Entwicklung und im Adulttier in Zusammenhang mit der Reninzellrekrutierung stünden, eine zeitliche als auch räumliche Co-Lokalisation von Renin und COX-2 bildenden Zellen anzunehmen.

Harris R. et al. beschrieben 1994 als erste die konstitutive Expression von COX-2 in Macula-densa-Zellen der Ratte. Die folgenden detaillierteren immunhistochemischen Studien in Ratten und Kaninchen konnten neben maculärer Expression auch eine COX-2-Immunreaktivität in angrenzenden Zellen des kortikalen dicken aufsteigenden Asts der Henle'schen Schleife aufzeigen (Stubbe J. et al., 2003; Cheng HF: et al., 1999; Mangat H. et al., 1997; Theilig F. et al., 2002; Vio CP. 1997). Beim Menschen und bei Primaten ist die COX-2-Expression im TAL unter basalen Bedingungen sehr viel geringer als in Nagetieren (Nantel F. et al. 1999, Kömhoff M. et al., 1997; Khan KN. et al. 1998). Stubbe J. et al. führten 2003 ausführliche Analysen zur COX-2-Expression in der frühen postpartalen Rattenniere durch. Daten zur räumlichen COX-2-Abundanz während der renalen Entwicklung in anderen Spezies, unter anderem der Maus standen bislang jedoch nur begrenzt zur Verfügung.

In der hier durchgeführten Studie zeigte sich COX-2-Immunreaktivität in frühen Nephronstrukturen der nephrogenen Zone direkt unterhalb der Nierenkapsel, in kortikalen tubulären Strukturen und in Bereichen der Macula densa. Eine räumliche Korrelation von COX-2- und Reninimmunreaktivität konnte nur im Bereich der Macula densa festgestellt werden. Außerhalb dieser Region bestand, selbst in frühen Entwicklungsstadien mit sehr flächiger Reninexpression, keine direkte Nachbarschaft zwischen COX-2 und Renin.

Mit Ausnahme der Macula-densa-Region ist daher eine parakrine Wirkung von COX-2 stammenden Prostanoiden auf Renin bildende Zellen auszuschließen. Eine Funktion von COX-2 ist demnach, zumindest bei der Reninzellrekrutierung in der unreifen murinen Niere, unwahrscheinlich, was wiederum die vorhergehenden Befunde dieser Studie bestätigt. Am JGA hingegen wären von COX-2 stammende Prostanoiden durch ihre Position dafür prädestiniert, auf die Reninexpression tonischen Einfluss zu nehmen. Ihre räumliche Nähe zu den dort in der Vaskulatur sitzenden Reninzellen und die Tatsache, dass in adulten COX-2-Knockoutmäusen als Antwort auf Natriumsalz keine Hochregulation der Reninexpression stattfindet (Yang T. et al., 2000), legen die Vermutung nahe, dass COX-2 lediglich als „Enhancer“ der basalen Reninbildung in der reifen Niere von Bedeutung sein könnte. Dies

wird jedoch durch die Ergebnisse unserer Studie aus den Stimulationsversuchen an der Knockoutmaus widerlegt. Nach Behandlung mit Nidrigsalz und Enalapril zeigte sich eine im Vergleich zum Basalzustand deutlich verstärkte Reninexpression in den afferenten Arteriolen. Zahlreiche Studien deuten indessen darauf hin, dass COX-2 eine maßgebliche Rolle in der salzabhängigen Regulation des RAAS im Macula-densa-Kontrollmechanismus spielt.

1.7. COX-2-Lokalisation in der adulten Mausniere unter Stimulation des RAAS

Wagner C. et al. berichteten in ihrer Arbeit 2003 zur COX-2-Expression in der adulten Mausniere von einer nicht zu detektierenden COX-2-Abundanz im renalen Kortex und keiner Veränderung der COX-2-Expression bei klassischer Stimulation des Reninsystems. Die hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnten dies nicht bestätigen, sondern korrelieren mit älteren Befunden aus Ratten von *Harris RC. et al.* (1994) und *Yang T. et al.* (1998). Sie konnten in der normalen adulten Rattenniere COX-2-Expression in vereinzelt Zellen des cTALHs in Macula-densa-Region und eine signifikant erhöhte Expression nach chronischer Salzdepletion in der Macula densa vorgelagerten Zellen beobachten. Macula-densa-Zellen besitzen außerdem die microsomale Isoform der PGE₂-Synthase, was sie zur Produktion von PGE₂ befähigt (*Villarreal ID. et al., 1986; Fuson AL. et al., 2003*). *Câmpean V. et al.* beschrieben in ihrer Arbeit zur renalen Prostglandinsynthese in Ratte und Maus 2003 eine COX-2-Immunlokalisation entlang des cTALs und in der Macula densa stets begleitet von PGE-Synthase-Immunreaktivität. Dass diese dort tatsächlich exprimiert wird bestätigten humane Studien, sowie Biosensorzellversuche an isolierten JGA-Präparaten (*Therland KL: et al., 2004; Peti-Peterdi J. et al., 2004*).

Außerdem belegen Studien von *Friis UG. et al.* (2005), dass sowohl IP-, EP2- und EP4-Rezeptoren mit JG-Zellen assoziiert sind und ihre Aktivierung zu einer rapiden PKA vermittelten exozytotischen Fusion und Freisetzung von Renin granulen führt. Auch erfolgt eine Regulation der COX-2-Expression mit Hilfe physiologischer Stimuli, was im Normalfall mit korrespondierenden Änderungen der Reninaktivität einhergeht (*Castrop H. et al. 2010*). Unter Bedingungen niedriger Salzkonzentrationen im distalen Tubulus kommt es zu einer verstärkten COX-2-Expression, wie es zum Beispiel bei verminderter oraler Salzaufnahme oder geringem renalen Perfusionsdruck der Fall ist (*Wolf K. et al., 1999; Harris RC. et al., 1994; Hartner A. et al., 2003; Jensen&Kurtz, 1997*). Ebenfalls für die Beteiligung von COX-2

am salzabhängigen MD-Kontrollmechanismus spricht, dass eine chronische Verabreichung von Schleifendiuretika zu einer erhöhten COX-2-mRNA-Abundanz in der Macula densa führt (Kammerl MC. et al., 2001a; Kammerl MC. et al., 2001b; Castrop H. et al., 2001). Die hochregulierte COX-2-Expression während Beeinträchtigung der Salztransportaktivität im TAL und auch bei oraler Niedrigsalzzufuhr wird begleitet von einem Anstieg der Expression der microsomalen PGE₂-Synthase und deren nachgeschalteter Enzyme zur PGE₂-Synthese (Kömhoff M. et al., 2004; Campean V. et al., 2003).

1.8. COX-2-Expression und der Macula-densa-Mechanismus während der renalen Entwicklung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Lokalisationsstudie zeigte, dass bereits an Embryonaltag 18 Renin und COX-2 an tieferliegenden Nephronen in JGA-Position in direkter Nähe zueinander exprimiert werden. Da es sich bei diesen Nephronen um zukünftige juxtamedulläre Nephrone handelt, welche im Verlauf der Nephrogenese als erste gebildet und ausgereift werden (Schmitt R. et al., 1999), legt diese Beobachtung nahe, dass COX-2 erst in ausgereifteren Nephronen auf die Reninexpression einwirkt und zwar schon in der früher Entwicklung einsetzend. Kömhoff M. et al. beschrieben 2000 im Zuge von *In-situ*-Hybridisierungsversuchen an Mausnierengewebe eine COX-2-mRNA-Abundanz in juxtamedullären Maculae densae schon an Embryonaltag 14.5. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Arbeiten von Stubbe J. et al. (2003), in denen der Effekt von ANGII-AT1-Rezeptor-Hemmung in frühen postnatalen Entwicklungsstadien (pp1-5) in Ratten getestet wurde. Es konnte festgestellt werden, dass ein negativer Rückkopplungsmechanismus von zirkulierendem ANGII auf COX-2 bereits von Geburt an besteht. In adulten Ratten besitzen Gluco- und Mineralocorticoide einen hemmenden Einfluss auf die renale COX-2-Expression im Kortex (Zhang MZ. et al., 1999). Inhibitoren der Mineralocorticoidrezeptoren wiederum stimulieren die kortikale COX-2-Expression (Zhang MZ. et al., 2003). Es wird angenommen, dass dieser Effekt indirekt über die resultierenden Schwankungen der Salzkonzentration vermittelt wird (Jensen BL. et al., 2004). Da auch ANGII die Sekretion von Aldosteron aus der Nebenniere fördert, ist auch in diesem Zusammenhang eine indirekte Wirkung auf die COX-2-Expression basierend auf NaCl nicht auszuschließen. Nichts desto trotz ist festzuhalten, dass die COX-2-Aktivität schon während der Nephrogenese, ob auf direkten oder indirekten Weg, durch Komponenten des Reninsystems reguliert wird. Dies lässt auf

eine negative Rückkopplung und damit wiederum auf eine Involvierung von COX-2 in die maculäre Regulation des RAAS in noch frühen Entwicklungsstadien deuten.

Eine schon frühe Beteiligung von COX-2 am salzabhängigen Macula-densa-Kontrollmechanismus erklärt zwar deren Lokalisation während der Entwicklung in JGA-Reichweite, nicht aber ihre Funktion in Regionen an denen kein Kontakt zu Renin bildenden Zellen besteht, im Speziellen der nephrogenen Zone und den mittkortikalen Tubuli.

1.9. COX-2 als entscheidender Faktor der kortikalen Nierenentwicklung

Da COX-2 ^{-/-} Mäuse an stark ausgeprägten renalen Malformationen leiden, ist die Vermutung naheliegend, dass COX-2 eine wichtige Rolle bei der Nierenreifung übernimmt. Um diese Fragestellung näher zu betrachten wurden detaillierte immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation der COX-2-Expression während der Nephrogenese durchgeführt. Anders als beim Menschen, bei dem die Nephronbildung in der 36. Schwangerschaftswoche endet, dauert die Induktion neuer Nephrone in Ratte und Maus noch 6-7 Tage nach der Geburt an. Der Metanephros entwickelt sich bzw. reift dabei in der subkapsulären Region durch zentrifugale Induktion undifferenzierten Mesenchyms ausgehend von der Ureterknospe. Juxtamedulläre Nephrone entstehen als erstes. Die Bildung weiterer Nephrone erfolgt dann am äußersten Nierenrand, der sogenannten nephrogenen Zone, über Transformation von Mesenchym zu Epithelium. Bei der Nephronreifung selbst, vom renalen Vesikel bis zum vollständig ausgereiften in die klassischen Nephronsegmente einteilbaren adulten Nephron, werden unterschiedliche Entwicklungsphasen durchlaufen (*Schmitt R. et al., 1999; Kömhoff M. et al., 1997; Jensen BL. 2004*).

In der hier durchgeführten Studie konnte eine COX-2-Immunreaktivität in Nephronen der Phase von komma- und S-förmigen Körperchen beobachtet werden. Das S-förmige Nierenkörperchen lässt sich bereits in mit Abschnittsmarkern zu identifizierende Nephronsegmente einteilen (*Little MH. et al., 2007; Georgas K. et al., 2009*). Mit Hilfe der Markerexpression konnte eine teilweise Überlagerung von COX-2-Immunreaktivität mit Cdh6 festgestellt werden, einem Marker des medialen Bereichs des S-förmigen Körperchens, der im folgenden Phase III Nephron auch eine starke Expression in der Anlage der Henle-Schleife besitzt. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Nephronabschnittsmarkern zeigten eine COX-2-Co-Lokalisation mit THP in ausgereifteren tubulären Strukturen des

Kortex, was auf eine COX-2-Expression im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife schließen lässt. In Bereichen der Macula densa war ein fließender Übergang zu THP negativen Zellen erkennbar. Mit zunehmender Nephronreife verringerte sich die COX-2-Immunreaktivität im TAL zusehends bis sie sich schließlich im Adultstadium, nur noch schwer zu detektieren, auf vereinzelte Zellen im JGA-Bereich beschränkte. Diese Befunde deuten darauf, dass sich COX-2-Expression im Verlauf der Nephronausbildung über Zellen des sich entwickelnden TAL in Macula densa assoziierte Position zieht.

Die Befunde von *Kömhoff M. et al. (2000a)* aus *In-situ*-Hybridisierungsversuchen in Mausnieren stimmen weitestgehend mit dieser Studie überein. COX-2-mRNA konnte jedoch neben komma- sowie S-förmigen Körperchen und sich entwickelnden tubulären Epithelzellen nahe entstehender Glomeruli auch bereits in renalen Vesikeln, den frühesten epithelialen Nephronstrukturen, detektiert werden. Ähnliche Beobachtungen zum zeitlich-räumlichen Expressionsprofil von COX-2 machten auch *Stubbe BL. et al. (2003)* in der sich entwickelnden Ratte. Anders als in der hier durchgeführten Studie wurde COX-2-Expression auch in den perimaculären Bereichen immer zusammen mit THP beobachtet. Dies könnte allerdings auf einen methodischen Fehler, genauer auf eine Kreuzreaktion der verwendeten sekundären Antikörper, zurückzuführen zu sein. Im Gegensatz zu *Stubbe et al. (2003)* konnten *Zhang MZ. et al. (1997)* eine COX-2-Expression in S-förmigen Nierenkörperchen der Ratte feststellen. Eine direkte Lokalisation in MD-Zellen wurde in keiner der beiden Studien beobachtet. Obwohl *Komhöff et al. (1997)* dieses Verteilungsmuster in der sich entwickelnden humanen Niere nicht bestätigen konnten, zeigte eine Studie 2001 von *Khan KN. et al.* an humanen fetalen Nieren der Schwangerschaftswochen 15-23 ein zur murinen Entwicklung vergleichbares nephronales COX-2-Expressionsprofil. Starke COX-2-Immunreaktivität wurde hauptsächlich in der Macula densa sowie im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und eine geringe Expression in Podozyten beobachtet. Außerdem wird auch in dieser Arbeit eine progressiv sinkende COX-2-Immunreaktivität ausgehend von den unreifsten Nephronen, nahe der metanephronischen Zone liegend, hin zu den weiterentwickelten Nephronen des mittleren und inneren Kortex beschrieben. Ihre starke Abundanz in der nephrogenen Zone und das in verschiedenen Spezies konservierte räumlich-zeitliche Expressionsmuster sowie die Tatsache, dass eine fehlende COX-2-Aktivität zu einer ausgeprägten Nephropathie führt, sprechen für eine essentielle Funktion von COX-2 bei der renalen Entwicklung.

Dinchuck JE. et al. sprachen in ihrer Arbeit zur Charakterisierung des Phänotyps der COX-2-

Knockoutmaus 1995 als erste von einer Überfülle an kleinen unreifen Glomeruli in der subkapsulären Zone im renalen Gewebe der adulten COX-2 $-/-$ Maus. *Norwood VF. et al.*, konnten dies in Folge (2000) bestätigen. Sie stellten ein ab dem postpartalen Tag 10 gehemmtes Nierenwachstum mit dünnem nephrogenen Kortex und kleinen zusammengedrängten subkapsulären Glomeruli fest. Die Symptomatik verschlimmerte sich mit zunehmendem Alter. Es zeigten sich eine progressive Dysplasie des äußeren Kortex, nun zystische subkapsuläre Glomeruli, der Verlust von proximaler Tubulusmasse einhergehend mit tubulärer Atrophie und Zystenbildung. Zwar wurde belegt, dass die Ausbildung der renalen Defekte stark vom genetischen Hintergrund und Geschlecht der Tiere abhängig ist, die unvollständige Reifung der Nephrone des äußeren Kortex jedoch nicht (*Yang T. et al., 2004*). Aufgrund der Tatsache, dass COX-2-Knockoutmäuse weitestgehend intakte medulläre Strukturen und korrekt ausgebildete juxtamedulläre Nephrone aufweisen, wird angenommen, dass COX-2 für die Bildung kortikaler Nephrone, nicht aber für die Entwicklung früher Nephrone obligatorisch ist.

Diese These korreliert mit Befunden der hier vorliegenden Arbeit und lässt sich, unter Verwendung der Ergebnisse älterer Untersuchungen, noch um einige Punkte erweitern. COX-2 ist bei der Nephroninduktion in der nephrogenen Zone nicht von Bedeutung. Für das weitere Wachstum der Nephrone, im Speziellen für die korrekte Ausbildung der tubulären Strukturen, scheint es dagegen essentiell zu sein. In renalen Vesikeln konnte in dieser Arbeit keine COX-2-Immunreaktivität detektiert werden, dafür aber eine starke Expression in S-förmigen Körperchen und zwar co-lokalisiert mit CdH6, einem Adhäsionsprotein, das im medialen Segment und später verstärkt in der Anlage der Henle-Schleife vorhanden ist. Die Henle-Schleife entsteht durch Auswachsen der proximalen und distalen Tubulusanlagen (*Cha J. et al., 2001*). Dies deutet auf das mediale Segment als Ursprung hin. COX-2 zeigt im Zuge der renalen Entwicklung eine hohe Expression im TAL, was es dazu prädestiniert, parakrine Wirkung auf die Zellen in unmittelbarer Nähe zu nehmen.

Vollständig ist die Nephrogenese in der Maus erst etwa am postpartalen Tag 7-10 abgeschlossen. In der Reifungsphase V besitzen die Nephrone bereits die Morphologie des adulten Stadiums, wachsen aber noch weiter (*Schmitt R. et al., 1999*). Nach Beendigung der Induktion neuer Nephrone erfolgt die Ausreifung der Henle-Schleifen noch bis etwa 2 Wochen nach der Geburt (*Cha J. et al., 2001; Kim J. 1996*). Zu diesem Zeitpunkt zeigt auch die COX-mRNA höchste Abundanz. Dass COX-2 erst in den späteren Phasen der Nephronen-

reifung an Bedeutung gewinnt, wird auch durch die erst am postpartalen Tag 10 massiv auftretende renale Pathologie in COX-2-Knockoutmäusen deutlich. Dafür spricht auch, dass eine selektive pharmakologische COX-2-Hemmung bei einer Verabreichung während der postpartalen Entwicklung, nicht aber nach Gabe während der Tragezeit, den renalen Phänotyp des COX-2-Knockouts imitiert (*Kömhoff M. et al., 2000a*). Humanstudien beschreiben eine hohe COX-2-Expression in der fetalen Niere zwischen der 15-24 Schwangerschaftswoche, einer Phase aktiver Nephrogenese (*Kömhoff M. et al., 2000a; Khan KN. et al., 2001*). Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass beim Menschen eine Verabreichung von NSAIDs im dritten Trimester der Schwangerschaft, insbesondere noch vor der 32. Schwangerschaftswoche, zu einer schweren renalen Schädigung des Kindes führen kann (*Voyer LE. et al., 1994; Veersema D. et al., 1983; Van der Heijden BJ., et al., 1994; Kaplan BS. et al., 1994*).

Wäre allerdings COX-2 für das Wachstum bzw. die Ausreifung der kortikalen Tubuli, speziell des TAL, verantwortlich, so müsste die Knockoutmaus auch eine verminderte Fähigkeit zur Urinkonzentrierung zeigen, was nach *Norwood VF. et al. (2000)* nicht der Fall ist. Allerdings sprechen die von ihnen gemessene verringerte glomeruläre Filtrationsrate und die periglomeruläre Fibrose im COX-2 $-/-$ dafür, dass die kleinen sklerotisierten Glomeruli weitestgehend funktionsuntüchtig sind.

COX-2 wirkt auf den NKCC-2-Kotransporter im TAL inhibitorisch, durch das Fehlen dieser Hemmung bei COX-2-Deletion ist daher eine Überdeckung eines solchen Effekts durch eine gesteigerte Resorptionsleistung der intakten juxtamedullären Nephrone denkbar. Im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife inhibiert COX-2, vermittelt über PGE₂ und dem EP3-Rezeptor, den Na-K-2Cl-Kotransport. Patienten mit Barter-Syndrom, die Funktionsverlustmutationen des NKCC-2-Kotransporters oder anderer TAL-Transportproteine aufweisen und dadurch an Salzverlust leiden, zeigen eine erhöhte COX-2-Abundanz und ein aktiviertes RAAS. Die Symptome solcher Patienten können durch Verabreichung von selektiven COX-2-Antagonisten gemildert werden (*Reinalter SC. et al., 2002; Kömhoff M. et al., 2000b*). Der bisherigen Wissenslage zu Grunde liegend wird angenommen, dass COX-2 ein wichtiges Bindeglied zwischen Niedrigsalzzufuhr und gesenkter Salztransporteraktivität in der Henle-Schleife ist (*Jensen BL. et al., 2004*). Da eine NKCC-2-Expression neben dem TAL in MD-Zellen selbst und in ihnen angrenzenden Zellen gefunden wurde (*Schmitt R. et al., 1999; Obermüller*

N. et al., 1996) und die Macula densa zur Synthese von PGE₂ befähigt ist (*Peti-Peterdi et al., 2003*), könnte COX-2 die Reninexpression im Hinblick auf den maculären Salzsensormechanismus auch indirekt über eine Hemmung des Na-K-2Cl-Kotransports stimulieren. Eine Verstärkerfunktion von COX-2 auf die erniedrigte epitheliale Salzresorption, welche basal nur stimulierend in Niedrigsalzsituationen aber essentiell auf das RAAS Einfluss nimmt, wäre in diesem Zusammenhang denkbar.

1.10. COX-2 in der Niere, Resümee und Ausblick

Zusammenfassend ist zu sagen, dass COX-2 in der Niere wohl unterschiedliche, aber entscheidende Funktionen einnimmt, welche ihrerseits wiederum über verschiedene Rezeptoren vermittelt zu sein scheinen. Dies stützt die Tatsache, dass keine einzige funktionsdeletierte Knockoutmaus eines jeden bekannten Prostaglandinrezeptors, einen vergleichbaren, wie durch das Fehlen von COX-2 induzierten Phänotyp aufweist (*Jensen BL. et al., 2004*).

Die Daten der hier durchgeführten Studie lassen COX-2 ganz klar als einen obligatorischen Faktor der Reninzellrekrutierung während der Nephrogenese ebenso in der adulten Mausniere ausschließen.

Da aber beide Isoformen konstitutiv in der Niere exprimiert werden und zur Synthese gleicher Prostaglandine führen, wäre ein eventueller Kompensationsmechanismus fehlender COX-2-Aktivität durch COX-1 denkbar (*Reese J. et al., 1999*). Um dies gänzlich ausschließen zu können, sind detaillierte Analysen zur COX-1-Expression oder Experimente mit selektiven COX-1-Hemmern in der sich entwickelnden und in der adulten COX-2-Knockoutmaus notwendig.

Vielmehr dagegen scheint COX-2 als potenter Stimulator des Reninsystems eine wichtige Aufgabe bei der Regulation des salzabhängigen Macula-densa-Mechanismus zu übernehmen. Während der Nierenreifung ist COX-2-Aktivität für ein intaktes Kortexwachstum, im Genauen die Ausbildung kortikaler, nicht aber juxtamedullärer Nephrone essentiell. Vieles deutet darauf hin, dass COX-2 vor allem auf die korrekte Weiterreifung und das Wachstum späterer Nephronentwicklungsstadien, sehr wahrscheinlich auf die tubuläre Weiterreifung, bedeutenden Einfluss nimmt. Nicht zuletzt aufgrund der enormen Bedeutung von NSAIDs in der praktizierenden Medizin sollte COX-2 ein wichtiges Ziel intensiver Nierenforschung bleiben.

2. Reninzellrekrutierung in der reninzellspezifisch deletierten TGF- β RII-Knockoutmaus

Während der Nierenreifung wird Renin in einem sehr konservierten und entwicklungsspezifischen Muster exprimiert, bei dem sich Renin bildende Zellen über den entwickelnden Gefäßbaum zentrifugal aus den großen Gefäßen hin zu klassischer juxtaglomerulärer Position zurückziehen. Auch im Adulttier ist die Zahl Renin bildender Zellen keineswegs konstant. Unter Bedingungen erhöhten Reninbedarfs werden zusätzliche Zellen der hinteren Gefäßwand zur Reninproduktion befähigt. Welche regulatorischen Faktoren diesen Rekrutierungsmechanismen zu Grunde liegen, ist bislang weitestgehend offen. Da TGF- β entscheidend in die Differenzierung von muralen Zellen involviert zu sein scheint und der TGF- β RII in Reninzellen nachgewiesen werden konnte, ist TGF- β als ein potentieller Regulationsfaktor der Reninzellrekrutierung denkbar. Ziel dieser Studie war es zu klären, ob TGF- β , vermittelt über den TGF- β -Rezeptor II, tatsächlich Einfluss auf die Reninzellrekrutierung nimmt.

2.1. Das *Cre/loxP*-Deletionssystem – Methode der Wahl zur Generierung der reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmaus

TGF- β übernimmt entscheidende Funktionen bei der Entwicklung im gesamten Organismus. Ein globaler Knockout des zur TGF- β -Signaltransduktion essentiellen TGF- β -Rezeptors Typ II führt daher zur Letalität der Tiere schon während der Embryonalentwicklung. Die Verfügbarkeit von TGF- β RII-floxflox- (*Chytil A. et al., 2002*) und RenCre-Mäusen (*Chen L. et al., 2007, Sequeira Lopez ML. et al., 2004*) zur Generierung von reninzellspezifisch TGF- β RII deletierten Mäusen bot nicht nur die Möglichkeit dieses Problem zu übergehen, sondern auch eine direkte Wirkung von TGF- β auf die Reninzelle selbst zu untersuchen. Bei dem verwendeten System steht die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des Ren1^d-Promotors, was in homozygoten *Cre*-Tieren in einer Nullmutation dieses Reningens resultiert. Ein intaktes Reninsystem ist allerdings für das Überleben der Tiere unabdingbar (*Takahashi N. et al., 2005*). Bei den zur Generierung benutzten Mäusen handelt es sich um einen Mausstamm (129Sv), der zwei funktionsfähige Reningenloci besitzt, Ren1d und Ren2. Beide Reningene spielen bei der Aufrechterhaltung der Homöostase zusammen. Der Verbleib und die Aktivität

des intakten Ren2-Gens genügt dabei, um eine normale Nierenentwicklung und eine ausreichende Regulation der Homöostase zu gewährleisten (*Pentz ES. et al., 2001*). *Chen L. et al.* (2007) konnten im Zuge ihrer Versuche unter Verwendung der gleichen RenCre-Maus zur Generierung der Reninzell-deletierten- G_{α} -Maus in homozygoten Cre-Tieren noch eine basale Plasmaninkonzentration von etwa 20% des Wildtypniveaus feststellen. Um dies zu umgehen und noch eine normale basale Reninexpression voraussetzen zu können (*nach Chen L. et al., 2007*), wurden in den Experimenten ausschließlich heterozygote RenCre-Mäuse verwendet. Bei diesen Tieren trägt nur eines des diploiden Ren1d-Gens die Cre-Rekombinase das verbleibende Ren1d-Gen ist dagegen voll funktionstüchtig. Da auch nicht auszuschließen ist, dass die in das Genom eingebrachten Exon flankierenden *loxP*-Sequenzen Nebeneffekte hervorrufen, wurden als Kontrollen zum konditionalen Knockout keine reinen Wildtyptiere benutzt, sondern RenRen wildtypische, gefloxe Geschwistertiere. Auch ist das *Cre/loxP*-Versuchsvorgehen nicht für alle Promotoren geeignet. Eine zielgerichtete Gendeletion erfolgt nur dann, wenn die Cre-Rekombinase schon frühzeitig aktiv wird. Der vorgeschaltete Promotor muss also während der frühen Entwicklung abgelesen werden und zusätzlich eine ausreichend hohe Aktivität besitzen, damit es zu einer Deletion des *loxP*-flankierten Genbereichs kommt.

Mit Hilfe der von *Chytil A. et al.* (2002) designten Primer zur Analyse der genomischen renalen DNA konnte belegt werden, dass eine Rekombination bzw. Deletion des *loxP*-flankierten TGF- β RII-Genbereichs in den RenCre^{fl}-Mäusen stattgefunden hat. Dass der Ren1d-Promotor zur reninzellgerichteten Deletion prinzipiell mit dem *Cre/loxP*-System nutzbar ist, bestätigen auch die bereits vorausgegangenen Studien von *Neubauer B. et al.* 2010 an der reninzellspezifischen G_{α} -Knockoutmaus.

Neben der engen zeitlichen beschreiben *Liu & Ballermann* 1998 ebenfalls eine enge räumliche Korrelation von Renin- und TGF- β RII-Immunreaktivität. Obwohl sie in ihrer Arbeit eine TGF- β RII-Expression in Renin produzierenden Zellen der Ratte beobachten konnten, konnte in der hier durchgeführten Studie kein direkter Nachweis dieses Rezeptors in Reninzellen der Maus erbracht werden. Sowohl immunhistologische als auch *In-situ*-Hybridisierungsversuche in murinem Nierengewebe schlugen fehl. Ebenso war aufgrund der zu geringen Ausbeute und Homogenität von JG-Präparationen ein aussagekräftiger, molekular biologisch gemessener Nachweis der TGF- β RII-Expression in Reninzellen nicht

möglich. Trotz der noch zu erbringenden direkten Bestätigung des Vorhandenseins von TGF- β RII in murinen Reninzellen, lassen die klaren Unterschiede zwischen konditionalen Knockout- und Kontrollgruppen der gemessenen Renin-mRNA und PRC-Werte gegenteiliges nahezu ausschließen.

2.2. Zeitlich korrelierende Expressionsmuster von TGF- β RII und Renin

Das Reninexpressionmuster entwickelt sich zeitlich äußerst charakteristisch. Bei einem Effekt von TGF- β -Signalen über den TGF- β RII auf die Reninzellrekrutierung im Verlauf der Nephrogenese ist auch eine zeitlich parallele Expression des TGF- β RII anzunehmen. Realtime PCR Gesamtnieren-mRNA-Messungen einer Kontrolltierentwicklungsserie (RenRenflfl-Mäuse) mit Nieren im Alter zwischen E16 bis pp10 und adulten zeigten einen nahezu identischen Kurvenverlauf der TGF- β RII- und Reninexpressionsprofile. Anders als bei der Ratte (*Zhang MZ. et al., 1997; Stubbe J. et al., 2003*) und in C57Bl/6-Mäusen gemessen, wurde die höchste Reninabundanz nicht um die Geburt, sondern in ca. 7 Tage alten Mäusen gefunden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Daten von *Machura K. et al. (2009)*, welche in 129Sv-Wildtypmäusen einen vergleichbaren Verlauf der Reninexpression feststellen konnten. Da es sich in den hier untersuchten Mäusen um Tiere handelt, die aus dem gleichen Mausstamm gezüchtet wurden, kann darauf geschlossen werden, dass die Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Reninexpression auf dem genetischen Hintergrund der Mäuse basieren. Das Expressionsprofil scheint also für diesen Mausstamm typisch zu sein. Zum renalen Expressionsprofil des TGF- β -Rezeptors Typ II während der Entwicklung in der Maus und in anderen Spezies sind bislang keine mRNA-Daten vorhanden. Allerdings konnten *Liu & Ballermann* in ihrer Arbeit 1998 in der Rattenniere anhand von immunhistochemischen Untersuchungen gesonderte zeitliche Expressionsprofile beider Faktoren von Stroma, interlobularen Arterien, afferenten Arteriolen und juxtaglomerulären Zellen aufstellen. TGF- β RII- und Renin zeigen auch dort nicht nur in allen Gefäßbereichen eine zueinander sehr ähnliche Expression, sondern die dort immunhistologisch aufgestellten Expressionsprofile der afferenten Arteriolen korrelieren in ihrem zeitlichen Verlauf mit dem zeitlichen Verlauf der hier gemessenen mRNA-Abundanzen in der Maus. Die enge zeitliche Abstimmung beider Faktoren lässt ein Zusammenspiel während der Entwicklung oder einen gleichen Mechanismus zur Regulation beider vermuten.

2.3. Reninaktivität in der reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmaus

Bei der Vermessung der Blutproben war eine deutlich gesenkte Plasmapreninkonzentration in den TGF- β RII-Knockoutgruppen, verglichen zu den Kontrollgruppen der sich entwickelnden, als auch der bereits ausgereiften Niere zu beobachten. Die Messung des renalen Renin-mRNA-Gehalts ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen, wenngleich auch im konditionalen Knockout eine Tendenz zu gesenkter Reninexpression erkennbar war. Eine fehlende TGF- β -Signaltransduktion nimmt demnach keinen Einfluss auf die basale renale Reninexpression, weder während der Entwicklung noch in der adulten Maus. Anders als im Blut wird bei der mRNA-Messung nur der renale Reningehalt untersucht. Da Renin produzierende Zellen, wenn auch nicht in gleichen Maßen, in anderen Organsystemen vorkommen, ist daher vorstellbar, dass sich die deutlich erniedrigte PRC im Knockout auf eine Summation des geringen negativen Effekts zurückführen lässt. Ebenso denkbar ist, dass dieser Signalweg in einem anderen Organ einen größeren Einfluss auf die Reninexpression als in der Niere nimmt.

2.4. Reninzellrekrutierung in der reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmaus

Die Beobachtungen aus den 3D-Gefäßbaumrekonstruktionen lassen darauf deuten, dass hinsichtlich der Reninzellrekrutierung und -expression, sowie der korrekten Ausbildung des Gefäßbaums einer TGF- β RII vermittelten Signalgebung auf Reninzellen keine Bedeutung zuzumessen ist. Keines der untersuchten 3D-Modelle der unreifen reninzellspezifischen Knockoutnieren zeigte wesentliche Unterschiede zur korrespondierenden RenRenflfl-Maus, weder in der Struktur des Gefäßbaums, noch im entwicklungsspezifischen Reninexpressionsmuster. Im Adultstadium war Renin klassisch in der Wand der afferenten Arteriolen am Eingang zum Glomerulus zu finden. Die Verlagerung Renin exprimierender Zellen aus den großen Arterien über den sich entwickelnden Gefäßbaum hin zu juxtaglomerulärer Position ist demnach von einer direkten TGF- β -Wirkung auf die Reninzelle unabhängig.

Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, dass TGF- β eine wichtige Funktion bei der Entwicklung von vaskulären Glattmuskelzellen einnimmt. Abhängig von der Zelllinie und der Verteilung der TGF- β -Rezeptoren induziert TGF- β in vaskulären Glattmuskelzellen im Hühnerembryo sowohl Proliferation als auch Wachstumsinhibition (*Topouzis & Majesky*,

1996). Liu & Ballermann (1998) kamen zu der Annahme, dass die von ihnen in embryonalem, renalem Rattengewebe detektierten stromalen TGF- β RII immunreaktiven Zellen Glattmuskulzellvorläufer waren, von denen manche Renin produzierten und in der weiteren Entwicklung mit renalen Arterien assoziierten.

Zahlreiche *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien weisen auf eine wichtige Funktion von TGF- β in der Differenzierung von vaskulären Glattmuskelzellen (VSMC) hin (Hirschi KK. et al., 1998, Sinha S. et al., 2004, Carvalho RLC. et al., 2004). Eine direkte Beteiligung von TGF- β in die Entwicklung von VSMCs konnten beispielsweise *In-vivo*-Experimente von Wurdak H. et al. (2005) an konditionalen TGF- β RII-Knockoutmäusen der Neuralleiste erbringen. Unter anderem zeigten diese Tiere im Herz eine defekte Ausbildung von VSMC aus Zellen der TGF- β RII defizienten Neuralleiste stammend.

Auch in der Perizytdifferenzierung scheint TGF- β eine entscheidende Rolle zu spielen. Perizyten bilden zusammen mit Endothelzellen und vaskulären Glattmuskelzellen die Blutgefäße. Hauptsächlich TGF- β 1 ist bei der Anlagerung von Perizyten an entstehende Gefäße beteiligt (Karamysheva AF., 2008). Perizyten und VSMC zählen beide zu den muralen Zellen und es wird angenommen, dass sie nicht nur vom gleichen Zellvorläufer abstammen, sondern im Zuge von Gefäßwachstum und Gefäßumbau auch ineinander überführbar sind (Armulik.A. et al., 2005).

Topouzis & Majesky (1996) gingen aufgrund ihrer Ergebnisse aus dem Hühnerembryo von zwei VSMC-Linien aus, welche gemeinsam das renale Blutgefäßsystem formen. Eine Zelllinie ektodermalen und eine mesodermalen Ursprungs, welche unterschiedlich auf TGF- β -Signale reagieren. Ausschließlich in den vom Mesoderm abstammenden Glattmuskelzellen konnte eine Expression des funktionsfähigen TGF- β -Typ II-Rezeptors gefunden.

Obwohl auch Perizyten verschiedene Abstammungen besitzen können, wird generell von einer mesodermalen Herkunft dieser Zellen ausgegangen. Es wird angenommen, dass Reninzellen und VSMC dem gleichen Zellvorläufer entstammen und beide Zelltypen durch metaplastische Verformung ineinander übergehen können (Sequeira Lopez ML. et al., 2004), wie es auch bei Perizyten im Bezug auf VSMC der Fall ist. Liu & Ballermann konnten in ihrer Arbeit an der Rattenniere 1998 während der Embryogenese Zellen im perirenalen Stroma beobachten, welche sowohl Renin-, TGF- β RII- als auch α -SMA-Immunreaktivität besaßen und später im renalen Stroma wieder zu finden waren. Sie kamen daher zu dem Schluss, dass es sich dabei um die mesodermale VSMC-Linie handeln könnte.

Zusammenfassend legen diese Befunde nahe, dass Reninzellen ebenfalls murale Zellen, der gleichen Zelllinie entstammend, sein könnten. Zwar konnte im hier verwendeten Versuchsaufbau kein Einfluss von fehlender TGF- β -Signalgebung festgestellt werden, aber eine Rolle von TGF- β bei der Differenzierung der Reninzellen lässt sich dennoch nicht ausschließen. Wenn der Reninzellvorläufer erst durch ein TGF- β induziertes Signal zur Reninzelle weiterdifferenziert und so erst die Fähigkeit zur Reninproduktion erlangt, würde das auch bedeuten, dass der Reninpromoter erst nach diesem Vorgang aktiv werden würde. Da beim benutzten Deletionssystem nur eine Aktivierung des Promotors zum konditionalen Knockout des geflochten Gens führt, würde ein TGF- β -Effekt vor der ersten Ablesung des Ren1d-Promotors im Versuchsaufbau nicht mit erfasst. Auch könnte in diesem Zusammenhang der Grund zu finden sein, warum ein Fehlen des TGF- β RII keinen Einfluss mehr auf die Reninzelle hat, obwohl diese den Rezeptor nach *Liu & Ballermann (1998)* noch exprimiert. Wenn man von einem muralen Zellursprung ausgeht, könnte die Expression dieses Rezeptors rudimentär auf einer Funktion in der frühen Entwicklung basieren.

2.5. Die Rolle direkter reninzellspezifischer TGF- β -Signalgebung bei der Entwicklung des renalen Gefäßbaums

Hauptsächlich während der Gefäßentwicklung scheint TGF- β entscheidenden Einfluss auf murale Zellen aber auch endotheliale Zellen zu nehmen (*Gaengel K. et al., 2009*). So zeigen TGF- β RI defiziente Mäuse Störungen der Angiogenese im Dottersack. Unter anderem ist dort ein Fehlen stützender muraler Zellen zu beobachten (*Larsson J. et al., 2001*). Demnach scheint TGF- β eine wichtige Bedeutung bei der korrekten Positionierung muraler Zellen zu haben. Knockoutmäuse, bei denen TGF- β 1 oder der TGF- β RII global deletiert wurde, besitzen Defekte in der Dottersackhämatopoese wie auch -vaskulogenese und sterben in Utero (*Oshima M. et al., 1996*). Auch Knockoutmäuse mit fehlenden Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems zeigen Entwicklungsstörungen des Gefäßbaums (zusammengefasst von *Coffman TM., 1998*). Ob dies jedoch mit einer muralen Herkunft Renin bildender Zellen in Zusammenhang gebracht werden kann, ist äußerst fraglich. Ein primär von TGF- β vermittelter Effekt auf die Reninzelle, welcher die renale Gefäßbaumbildung beeinflusst, ist jedoch auszuschließen. Die 3D-Rekonstruktionen belegen, dass sich die arteriellen

Blutgefäße auch in der konditionalen TGF- β RII-Reninzell-Knockoutmaus wildtypisch entwickeln.

2.6. Der TGF- β RII als essentieller Faktor des TGF- β -Signalwegs

Je nach ihrer Differenzierung und ihrer Ausstattung mit TGF- β -Rezeptoren reagieren Zellen sehr spezifisch auf TGF- β . Für TGF- β induzierte Signale sind 2 Typ I-Rezeptoren, ALK1 und ALK5, von Bedeutung, welche beide TGF- β als Ligand binden, intrazellulär aber unterschiedliche Signalkaskaden und oft gegensätzliche Effekte auslösen. Bei der Aktivierung von ALK5 kommt es im Zellinnern zur Phosphorylierung von Smad 2/3 und damit zur in Gangsetzung des Signalwegs der TGF- β /Aktivin-Gruppe. Über die Aktivierung des ALK1-Rezeptors kann TGF- β allerdings auch Signale über Smad1/5/8 vermitteln, dem Signalweg über den generell die BMP-Gruppe wirkt. Beide Rezeptoren spielen bei der Entwicklung der Gefäße in vaskulären Zellen kontroverse Rollen (*Gaengel K. et al., 2009*). So führt ALK5-Aktivität zur Inhibition der Zellmigration wie -proliferation und zur Stimulation der VSMC-Differenzierung und der Gefäßreifung. Über ALK1 vermittelt, kommt es dagegen zu einer gesteigerten Zellmigration und -proliferation sowie zur Hemmung der Gefäßreifung und VSMC-Differenzierung. *Banas MC. et al (2007)* konnten in ihren Studien an reifen und unreifen humanen und murinen Nieren die Expression aller Smads der Transduktionskaskade der TGF- β -Gruppe (Smad2, 3, 4, 7) in verschiedensten renalen Zelltypen, unter anderem auch in Glattmuskelzellen, nachweisen. TGF- β vermittelt Signale über einen heterotetrameren Komplex aus zwei Typ-I- und zwei Typ-II-Rezeptoren in der Zellmembran. Bei Ligandenbindung werden beide Rezeptortypen in räumliche Nähe zueinander gebracht, was den Typ-II-Rezeptor, welcher eine konstitutive Kinaseaktivität besitzt, dazu befähigt den Typ-I-Rezeptor zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Der nun aktive Rezeptor Typ I phosphoryliert dann wiederum seinerseits ein Rezeptor reguliertes Smad und setzt so die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade in Gang. Man geht davon aus, dass der Typ-II-Rezeptor dabei wesentlich für die Ligandenspezifität, der Typ-I-Rezeptor dagegen für die Smadspezifität verantwortlich ist. Zwar konnten *In-vitro*-Studien zeigen, dass sich der TGF- β RI auch autophosphorylieren kann, *in vivo* konnte dies allerdings bislang nicht bestätigt werden. Eine TGF- β -Signalgebung vermittelt nur über den Typ-II-Rezeptor ohne Typ-I- und Smad-Aktivierung wird allerdings derzeit diskutiert. Da demnach der TGF- β RII essentiell zur TGF- β Signalweiterleitung ist, sowohl in Verbindung mit ALK5 als auch ALK1, kann also davon

ausgegangen werden, dass in der hier durchgeführten Studie die komplette TGF- β -induzierte Signalgebung auf Reninzellen unterbrochen wurde (gesamter Abschnitt: *Shi & Massagué 2003; Massagué J. 1998; Attisano & Wrana 2000*).

Der Rückzug Renin bildender Zellen aus den großen Gefäßen hin zur JG-Position während der Nierenreifung war im reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockouttier vollständig intakt. Daher ist, selbst wenn die primäre Reninzelldifferenzierung von TGF- β abhängig wäre, zumindest eine direkte Wirkung von TGF- β auf das Abschalten der Reninproduktion definitiv auszuschließen.

2.7. TGF- β -Expression unter Stimulation des RAAS

Anders als während der Entwicklung, bei der Renin- und TGF- β -Expression eng korreliert sind, konnte bei der renalen mRNA-Messung der adulten, mit Nidrigsalz und Enalapril behandelten Mäuse zwar die bekannte deutliche Anregung des Reninsystems, aber keine Änderung des TGF- β RII-Levels gemessen werden. Vorausgegangene Arbeiten konnten dagegen nach klassischen stimulatorischen Manövern des RAAS wie Wasserentzug, Nidrigsalzdiät oder pharmakologischer ACE-Inhibition neben einem Anstieg der Renin-expression auch eine gesteigerte TGF- β 2-Abundanz feststellen (*Liu & Ballermann, 1998*). *Horikoshi S. et al.* beschrieben 1991 im Zuge immunhistologischer Arbeiten an der Mausniere eine durch Wasserentzug stimulierte Anreicherung von TGF- β 2 und Co-Lokalisation mit Renin in JG- und Glattmuskelzellen. Auch *Ray PE et al.* konnten 1993 eine TGF- β 2-Induktion in der renalen Vaskulatur von Mäusen nach Kaliumdepletion sowie in Folgearbeiten 1994 TGF- β 2/3 Induktion im JGA und VSMC von Kindern und jungen Ratten belegen. Da TGF- β 2 und 3 mit TGF- β 1 zu den Liganden des TGF- β RII zählen, wäre, anders als hier gemessen, nach Nidrigsalzdiät und ACE-Hemmung auch dessen Expressionsteigerung zu erwarten gewesen. Diesbezüglich ist allerdings zu erwähnen, dass die TGF- β -Signalgebung einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf die eigenen Rezeptoren in der Zielzelle besitzt. Smad7 zählt zu den inhibitorischen Smads. Es bildet zusammen mit Smurf1 und 2 einen Komplex, welcher zur Ubiquitinierung und Degradierung der TGF- β -Rezeptoren an der Zelloberfläche führt. Eine verstärkte Expression des Smad7-Gens wird über Smad3 und Smad4 vermittelt und direkt von TGF- β selbst induziert (*Shi & Massagué, 2003*). In diesem Kontext könnten die angenommenen Diskrepanzen zur in den älteren Arbeiten

beschriebenen TGF- β -Expression und den TGF- β RII-mRNA-Daten der hier durchgeführten Studie auf die direkte TGF- β vermittelte Degradierung des Rezeptors zurückzuführen sein.

2.8. Reninzellrekrutierung in der adulten reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmaus

Die Beobachtungen aus den 3D-Rekonstruktionen der mit Nidrigsalz in Kombination mit ACE-Hemmer behandelten adulten reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockouttiere lassen einen essentiellen direkten Effekt von TGF- β auf die Reninzelle für die Reninzellrekrutierung in der adulten Maus ausschließen. Wenngleich sich in der konditionalen Knockoutmaus Reninzellen, anders als in der korrespondierenden Kontrollniere, nach Stimulation auch vereinzelt in interlobularen Arterien finden ließen, konnte dennoch belegt werden, dass der Rekrutierungsmechanismus Renin bildender Zellen aus der hinteren Gefäßwand generell auch ohne TGF- β -Signale auf die Reninzelle noch vollständig intakt ist. Diese Schlussfolgerung setzt natürlich voraus, dass die rekrutierten Zellen auch TGF- β RII deletiert waren, d.h. beim hier verwendeten Knockoutsystem, dass der Reninpromotor in den rekrutierten Zellen vormals schon einmal aktiv gewesen sein muss. Eine sehr elegante Studie von *Sequeira Lopez ML. et al.*, veröffentlicht 2004, konnte zeigen, dass es sich bei den Zellen in der glatten Gefäßmuskulatur, die im Zuge der Rekrutierung im Adultstadium zusätzlich Renin produzieren, um Zellen handelt, die während der Entwicklung schon einmal dazu im Stande waren. In der Arbeit wurden transgene Mäuse verwendet, die aus Mäusen, die die *Cre*-Rekombinase unter Kontrolle des Reninpromtors hatten, und Reportermäusen gekreuzt waren und in Abhängigkeit von *Cre*-Rekombinase-Aktivität β -Gal oder GFP exprimierten. In den so generierten Tieren waren alle Zellen, die im Laufe ihrer Entwicklung einmal Renin gebildet hatten, gekennzeichnet und ihr späterer Werdegang nachvollziehbar. Auf diese Weise konnte belegt werden, dass Renin bildende Zellen nicht nur zu JG-, sondern auch zu nicht Renin exprimierenden Zellen weiterdifferenzieren. Außerdem wurde gezeigt, dass diese nicht Renin produzierenden Zellen in Situationen erhöhten Reninbedarfs die Fähigkeit zur Reninsynthese besitzen. Demnach kann also davon ausgegangen werden, dass auch in dem hier durchgeführten Versuch die im Adulttier rekrutierten Zellen TGF- β RII defizient waren.

In den Rekonstruktionen der adulten Nierengefäßbäume konnten im reninzellspezifischen TGF- β -Knockouttier auch basal einzelne Stellen, die eine Reninzellbänderung aufwiesen

beobachtet werden. Eine solche Bänderung tritt im Normalfall erst bei Stimulation zur Reninsynthese auf. Dies und die Tatsache, dass unter Nidrigsalz- und Enalapril-verabreichung in der Knockoutmaus die Rekrutierung Renin bildender Zellen verglichen zum Wildtyp in weiter zurückliegende Gefäßabschnitte führte, sprechen dafür, dass ohne reninzellspezifische TGF- β -Signalgebung das Umschalten zur Reninsynthese erleichtert zu sein scheint. Widersprüchlich hierzu sind allerdings die Renin-mRNA-Daten, die in den reninzellspezifischen TGF- β -Knockoutmäusen weder basal, noch unter Stimulation zur Reninsynthese wesentliche Abweichungen zu den Kontrollgruppen aufwiesen.

2.9. Renin als potentieller Regulator TGF- β s

Zwar konnte die hier durchgeführte Studie eine direkte Wirkung von TGF- β auf die Reninexpression weitestgehend ausschließen. Aber nicht zuletzt das sehr ähnliche, entwicklungsspezifische Expressionsprofil und die in älteren Arbeiten gefundene, starke Präsenz von TGF- β -Signalwegskomponenten in Renin bildenden Zellen lassen ein Zusammenspiel beider Faktoren vermuten.

Durchaus denkbar ist auch umgekehrt, dass Renin die TGF- β -Expression beeinflusst. Vorausgegangene Arbeiten bestätigen, dass Komponenten des Reninsystems auf die TGF- β -Synthese einwirken können. So ist beispielsweise ein stimulatorischer Effekt von ANGII auf die TGF- β 1-Synthese in VSMC, renalen Epithel- und Mesangialzellen beschrieben (*Liu & Ballermann 1998; Weber H. et al., 1994; Wolf G. et al., 1993; Kagami S. et al., 1994*). Allerdings konnten *Ray PE. et al. (1994)* bei Versuchen an der Ratte unter ACE-Inhibition eine gesteigerte TGF- β 2-Expression in JG-Zellen und damit eine dort von ANGII unabhängige Regulation der TGF- β Produktion feststellen. Wie von *Huang Y. et al. (2006)* kürzlich beschrieben, ist rekombinantes Renin *in vitro* in physiologischen Konzentrationen dazu im Stande, in Mesangialzellen von Mensch und Ratte die TGF- β 1-Expression zu steigern. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Renin die TGF- β 1-Expression in Mesangialzellen durch einen Rezeptor vermittelten, ANGII unabhängigen Mechanismus reguliert. Diese Studie belegt, dass Renin prinzipiell dazu in der Lage ist, einen direkten Einfluss auf TGF- β zu nehmen, und legt außerdem nahe, dass dies auch *in vivo* von Bedeutung sein könnte. Für diese These spricht auch, dass die TGF- β RII-Immunreaktivität dem Abklingen der Reninimmunreaktivität hinterherhinkt (*Liu & Ballermann, 1998*). Wie von *Carvalho RLC. et al. (2004)* in der Endothelzelle beschrieben, können TGF- β produzierende Zellen neben dem

Effekt auf andere Zellen autoregulatorische Regulationsmechanismen besitzen. So führen TGF- β -Signale ausgehend von Endothelzellen nicht nur zur Induktion der Differenzierung umliegender Mesenchymalzellen zu VSMC, sondern beeinflussen auch gleichzeitig die TGF- β -Expression in der Ausgangszelle selbst. Daher wäre eine TGF- β RII-Expression in TGF- β -produzierenden Reninzellen, wie von *Liu & Ballermann* (1998) in JG-Zellen beobachtet, zur Autoregulation der TGF- β -Produktion durchaus denkbar.

Neben positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen als Erklärung für die enge Korrelation der TGF- β RII- und Reninesynthese darf auch ein möglicher gemeinsamer regulatorischer Faktor nicht außer Acht gelassen werden. In diesem Zusammenhang vorstellbar wäre beispielsweise Stickstoffmonoxid, welcher sowohl mit der Regulation der Reninexpression, als auch mit TGF- β in Verbindung gebracht und dessen Synthese auch in Macula-densa-Zellen nachgewiesen werden konnte (*Castrop H. et al., 2010; Liu & Ballermann, 1998*).

2.10. TGF- β -Signalgebung auf Reninzellen – Resümee und Ausblick

Abschließend ist zu sagen, dass nicht nur die enge zeitliche Expressionskorrelation der beiden Faktoren, sondern zahlreiche Hinweise für eine Verbindung zwischen Renin und TGF- β sprechen.

Mit Hilfe der hier durchgeführten Studie konnte TGF- β zumindest als essentieller, direkter Signalgeber auf Reninzellen im Hinblick auf die Reninproduktion basal wie auch unter Stimulation ausgeschlossen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass TGF- β -Signale auf die Reninzelle für die Ausbildung des entwicklungsspezifischen Reninexpressionsmusters und für eine korrekte Gefäßbaumentwicklung sowie für die Reninzellrekrutierung im Adulttier nicht ausschlaggebend sind.

Ob umgekehrt allerdings Renin direkt oder indirekt auf die TGF- β -Expression einwirkt oder ob die Expression beider Proteine von einem gemeinsamen regulatorischen Faktor gesteuert wird, ist offen. Auch der direkte Beweis, dass Renin bildende Zellen tatsächlich TGF- β -RII exprimieren, bleibt, sei es immunhistologisch oder molekularbiologisch, noch zu erbringen.

Zusammenfassung

Renin bildende Zellen befinden sich typischerweise in juxtaglomerulärer Position in der Wandung der afferenten Arteriolen unmittelbar am Eingang zum Glomerulus. Während der murinen Nierenentwicklung aber variiert die Verteilung Renin bildenden Zellen in einem zeitlich-räumlichen, uniformen Muster. So kann Reninexpression ab dem Embryonaltag 15 zunächst in den Gefäßwänden der arcuaten Arterien beobachtet werden. Von dort zieht sie sich über den sich entwickelnden arteriellen Gefäßbaum aus den großen Gefäßen über die kleinen Arterien auf ihre klassische juxtaglomeruläre Position in der adulten Niere zurück. Auch im Adultstadium ist die Reninexpression plastisch. Ausgelöst durch Manöver zur Stimulation der Reninbildung, wie z.B. Nidrigsalzdiät und ACE-Inhibition, erfolgt zur verstärkten Reninsynthese am vaskulären Pol eine retrograde Rekrutierung Renin produzierender Zellen entlang des Vas afferens. Welche Faktoren diese Rekrutierungsmechanismen während der Nephrogenese und im Adultstadium beeinflussen, ist bislang unklar.

In den letzten Jahren erstarkte die These, dass durch die Cyclooxygenase-2 (COX-2) generierte Prostanoidoide maßgeblich Einfluss auf die renale Reninexpression nehmen. So wird die COX-2-Synthese von den gleichen Parametern beeinflusst, die auch die Synthese des Renins kontrollieren. Prostanoidsignale werden über G-Protein gekoppelte Rezeptoren ins Zellinnere geleitet und stimulieren die Reninexpression über den cAMP-Signalweg. Neueste Studien konnten belegen, dass eine intakte cAMP-Signalkaskade in Reninzellen essentiell für die Reninzellrekrutierung ist.

Als weiterer denkbarer Kandidat zur Steuerung der Reninzellrekrutierung kommt der Differenzierungsfaktor TGF- β in Frage. TGF- β übernimmt bei der Differenzierung von glatten Muskelzellen eine wichtige Funktion. Es wird angenommen, dass Glattmuskelzellen auch in Renin bildende Zellen transformieren können (vice versa) und dass dieser Prozess bei der Reninzellrekrutierung eine entscheidende Rolle spielt. Arbeiten an Ratten belegen zudem,

dass Reninzellen den TGF- β RII exprimieren und dass dessen Expression mit der des Renins in Zeiten aktiver Reninzellrekrutierung einhergeht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher die Prostanoidsynthase COX-2 und der Differenzierungsfaktor TGF- β als mögliche Faktoren zur Steuerung der Reninzellrekrutierung untersucht. Hierfür wurden Studien an globalen COX-2- und reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmäusen vorgenommen. Bei dem TGF- β RII handelt es sich um eine unverzichtbare Komponente des TGF- β vermittelten Signalwegs, dessen Fehlen die TGF- β -Signalgebung auf die Zielzelle komplett unterbricht. Da eine globale Deletion dieses Gens zur Letalität der Tiere bereits in Utero führt und um eine direkte Wirkung von TGF- β auf die Reninzelle im Speziellen betrachten zu können, wurden konditionale reninzellspezifische Knockoutmäuse benutzt.

Zur detaillierten Analyse des Reninzellverteilungsmusters wurden 3D-Rekonstruktionen arterieller Nierengefäßbäume mit räumlich dargestellter Reninexpression angefertigt. Rekonstruiert wurden Modelle von repräsentativen Entwicklungsstadien beider Knockoutstämme sowie von adulten, unstimulierten und stimulierten Knockoutmäusen und deren korrespondierenden Kontrollen. Zu Lokalisationsstudien dienten immunhistologische Fluoreszenzfärbungen. Auf molekularbiologischer Ebene wurden Realtime-PCR-Messungen zur Analyse der Renin-, COX-2- sowie TGF- β RII-mRNA-Abundanz durchgeführt. Außerdem wurde in den reninzellspezifisch deletierten TGF- β RII-Mäusen die Plasmapareninaktivität mittels RIA-Messungen bestimmt.

In der COX-2 defizienten Maus konnte in allen Entwicklungsstadien immunhistologisch wie auch auf mRNA-Ebene eine im Vergleich zum Wildtyp wesentlich schwächere Reninexpression festgestellt werden. Trotz der reduzierten Reninabundanz waren jedoch weder pränatal noch postpartal oder im Adultstadium Abweichungen bezüglich des zeitlich-räumlichen Reninverteilungsmusters zu beobachten. Eine Co-Lokalisation von Renin- und COX-2-Expression ließ sich zu sämtlichen untersuchten Entwicklungszeitpunkten ausschließlich im Bereich der Macula densa finden. Auffällig in den Modellen der COX-2-Knockoutmäuse waren stark ausgeprägte Malformationen des arteriellen Gefäßbaums, welche schon in frühen postpartalen Stadien ihre Ansätze finden. Nach chronischer Stimulation des RAAS zeigte sowohl die 3D-Analyse als auch die Renin-mRNA-Abundanz,

dass die Rekrutierung von Renin bildenden Zellen in der adulten COX-2-Knockoutmaus völlig normal stattfindet.

Trotz einer im Vergleich zum Wildtyp gesenkten Plasmareninaktivität in den reninzellspezifischen TGF- β RII-Knockoutmäusen während der Entwicklung zeigten die zugehörigen Analysen der renalen Renin-mRNA-Abundanz lediglich eine Tendenz zu erniedrigter Reninexpression. Obwohl die Renin- und TGF- β RII-Expression im Verlauf der Nephrogenese eng miteinander korrelieren, konnten bezüglich des räumlich-zeitlichen Reninexpressionsmusters während der Entwicklung keine Unterschiede in den Knockout-tieren festgestellt werden. Auch zeigte sich der arterielle Gefäßbaum in sämtlichen untersuchten Nierenstadien hinsichtlich des Entwicklungsgrades und der Architektur in den konditionalen TGF- β RII-Knockouts vergleichbar zu den Wildtypkontrollen. Im adulten Knockouttier war kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen im Renin-expressionsmuster sowie im renalen Renin-mRNA-Gehalt weder unter Standardbedingungen noch unter Stimulation des RAAS festzustellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl COX-2 als auch TGF- β über TGF- β RII keine essentiellen Faktoren für den Reninzellrekrutierungsmechanismus während der Entwicklung und im Adultstadium darstellen. Zwar beeinflusst COX-2-Aktivität die Reninexpression, für die korrekte Reninzellpositionierung ist sie jedoch nicht von Bedeutung. Beide Faktoren scheinen vielmehr eine „Enhancer“-Funktion auf den basalen Reninspiegel auszuüben, COX-2 dabei in einer stärkeren Weise als TGF- β . Bei der murinen Nierenentwicklung dagegen, im Besonderen für das kortikale Wachstum, spielt COX-2 offensichtlich eine wesentliche Rolle.

abstract

Renin producing cells are normally located in juxtaglomerular (JG) position in the afferent arterioles at the glomerular entrance. During kidney development the renin distribution pattern varies in a uniform temporal spatial manner. Renin appears first at embryonic day 15 within the A. arcuatae, from where it migrates along the developing arterial tree to the proximal vessels, to be finally localized at its classical JG position in adulthood.

Under renin expression stimulation maneuvers like low salt (LS) diet and ACE inhibition, cells from the upper vessel wall are recruited in a retrograde manner to finally enhance renin production at the vascular pole. The factors influencing this shift of renin expressing cells during nephrogenesis and in adulthood are still unknown.

The last few years there has been growing evidence indicating that cyclooxygenase-2 (COX-2) has a strong impact on renin expression. Prostanoid signals are mediated via G-protein coupled receptors and stimulate renin expression through cAMP. Recent studies showed that an intact cAMP-Pathway is essential for renin cell recruitment.

Moreover, previous experiments indicate that the differentiation factor TGF- β could be involved in renin cell recruitment. TGF- β is known to play an important role in vascular smooth muscle cell (VSMC) differentiation. It is assumed that VSMC are able to transform into renin producing cells (vice versa) and that this process is important for the renin cell recruitment as well. In rats it was found that renin cells express TGF- β RII and that its mRNA-abundance is co-regulated with renin, starting already during nephrogenesis, a time of active renin cell recruitment.

The aim of this study was to investigate whether the prostaglandin synthase COX-2 or the differentiation factor TGF- β are two potential factors influencing the renin cell recruitment. For this purpose studies in global COX-2 and renin cell specific TGF- β RII knockout mice were performed. TGF- β RII is a crucial component of TGF- β pathway and its absence completely interrupts TGF- β signaling on target cells. Since a global deletion of this receptor leads to an

early lethality of the animals in utero and to investigate a direct TGF- β effect on renin cells, conditional renin cell specific TGF- β RII knockout mice were used.

To study the spatial renin distribution pattern in detail 3D renal arterial tree reconstructions showing the renin expression from representative developmental stages of the two knockout strains as well as from unstimulated and stimulated adult knockouts and their corresponding controls were analyzed. For localization studies immunohistochemical stainings were used. To analyze the mRNA expression levels realtime PCRs were performed. In addition, the plasma renin activity of the renin cell specific TGF- β RII knockouts was determined using RIA measurements.

In all developmental stages of COX-2 deficient mice a significantly lower renin expression was found both immunohistochemically and on mRNA-level. In spite of the reduced renin abundance, there was no difference in the spatiotemporal renin expression pattern, neither in prenatal nor postpartal or adult knockout mice. A co-localization of renin and COX-2 expression was found exclusively at the macula densa region in all examined developmental stages. Strikingly the COX-2 knockouts exhibited strong malformations of the arterial tree, which were already detectable in postpartal kidney stages. After chronic stimulation, both the 3D analysis and the renin mRNA-measurements showed a normal recruitment of renin producing cells in the adult COX-2 knockout mouse.

In spite of a lowered plasma renin activity found in the renin cell specific TGF- β RII knockout mice during development, the corresponding renal renin mRNA-levels were only lowered with a slight tendency, but not significantly. Although the renin and TGF- β RII expression are correlating during nephrogenesis, no differences in the spatiotemporal renin expression pattern could be observed. Also, there were no irregularities to the corresponding wildtype regarding to the architecture and development of the conditional knockout animals. In the adult knockout there was no significant difference to the control group concerning renin expression pattern and mRNA-abundance, equally at standard conditions and with stimulation of the RAAS with LS and Enalapril.

These findings show that both COX-2 and TGF- β mediated by the TGF- β RII are not essential for the mechanism of renin cell recruitment during development and in adulthood. Indeed COX-2 activity has an influence on renin expression, but it is not necessary with a view to a

correct renin cell positioning. The two factors rather seem to act as an enhancer for basal renin expression with COX-2 acting stronger than TGF- β . In contrast, during murine kidney development particularly the cortical one, COX-2 appears to play a crucial role.

Literaturverzeichnis

Ando T, Okuda S, Yanagida T, Fujishima M. Localization of TGF-beta and its receptors in the kidney. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24(2-3):149-53.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 2005 Sep 16;97(6):512-23.

Attisano L, Wrana JL. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Apr;12(2):235-43.

Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 2002 May 31;296(5573):1646-7.

Bader M, Ganten D. Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med.* 2000;78(3):130-9.

Banas MC, Parks WT, Hudkins KL, Banas B, Holdren M, Iyoda M, Wietecha TA, Kowalewska J, Liu G, Alpers CE. Localization of TGF-beta signaling intermediates Smad2, 3, 4, and 7 in developing and mature human and mouse kidney. *J Histochem Cytochem.* 2007 Mar;55(3):275-85.

Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol.* 1979 Nov;237(5):F333-43.

Beierwaltes WH. The role of calcium in the regulation of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 January; 298(1): F1-F11.

Breyer MD, Breyer RM. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Jul;279(1):F12-23.

Campean V, Theilig F, Paliege A, Breyer M, Bachmann S. Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 285:F19-F32.

Cantin M, Araujo-Nascimento MD, Benchimol S, Desormeaux Y. Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *Am J Pathol.* 1977; 87: 581-602.

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

Carvalho RLC, Jonker L, Goumans MJ, Larsson J, Bouwman P, Karlsson S, Dijke PT, Arthur HM, Mummery CL. Defective paracrine signalling by TGFbeta in yolk sac vasculature of endoglin mutant mice: a paradigm for hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Development.* 2004 Dec;131(24):6237-47.

Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A. Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 867-874.

Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev.* 2010 Apr;90(2):607-73.

Cha JH, Kim YH, Jung JY, Han KH, Madsen KM, Kim J. Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Jul;12(7):1410-21.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Oct 15;99(21):13926-31.

Chen L, Kim SM, Oppermann M, Faulhaber-Walter R, Huang Y, Mizel D, Chen M, Lopez ML, Weinstein LS, Gomez RA, Briggs JP, Schnermann J. Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein Gs α in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jan;292(1):F27-37.

Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, McKanna JA, Harris RC. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest*. 1999 Apr;103(7):953-61.

Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, McKanna JA, Harris RC. Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Mar;280(3):F449-56.

Cheng HF, Wang SW, Zhang MZ, McKanna JA, Breyer R, Harris RC. Prostaglandins that increase renin production in response to ACE inhibition are not derived from cyclooxygenase-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Sep;283(3):R638-46.

Cheng HF, Harris RC. Does cyclooxygenase-2 affect blood pressure? *Curr Hypertens Rep*. 2003 Feb;5(1):87-92

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

Chytil A, Magnuson MA, Wright CV, Moses HL. Conditional inactivation of the TGF- β type II receptor using Cre:Lox. *Genesis*. 2002 Feb;32(2):73-5.

Coffman TM. Gene targeting in physiological investigations: studies of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol*. 1998 Jun;274(6 Pt 2):F999-1005.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*. 2003 Oct 9;425(6958):577-84.

Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*. 1995 Nov 23;378(6555):406-9.

Friis UG, Stubbe J, Uhrenholt TR, Svenningsen P, Nusing RM, Skott O, Jensen BL. Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289: F989–F997.

Fuchs S, Germain S, Philippe J, Corvol P, Pinet F. Expression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promoter/LacZ transgenic mouse. *Am J Pathol*. 2002 Aug;161(2):717-25.

Fujino T, Nakagawa N, Yuhki K, Hara A, Yamada T, Takayama K, Kuriyama S, Hosoki Y, Takahata O, Taniguchi T, Fukuzawa J, Hasebe N, Kikuchi K, Narumiya S, Ushikubi F. Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I2 receptor IP. *J Clin Invest* . 2004; 114: 805–812.

Fuson AL, Komlosi P, Unlap TM, Bell PD, Peti-Peterdi J. Immunolocalization of a microsomal prostaglandin E synthase in rabbit kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 285: F558–F564.

Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 May;29(5):630-8.

Georgas K, Rumballe B, Valerius MT, Chiu HS, Thiagarajan RD, Lesieur E, Aronow BJ, Brunskill EW, Combes AN, Tang D, Taylor D, Grimmond SM, Potter SS, McMahon AP, Little MH. Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment. *Dev Biol.* 2009 Aug 15;332(2):273-86.

Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol.* 1989 Nov;257(5 Pt 2):F850-8

Gomez RA, Sequeira Lopez ML, Fernandez L, Chernavvsky DR, Norwood VF. The maturing kidney: development and susceptibility. *Ren Fail.* 1999 May-Jul;21(3-4):283-91.

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

Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F. The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res.* 2006 Nov 24;99(11):1197-206. Epub 2006 Oct 26.

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 1990 Oct;70(4):1067-116.

Hao CM, Breyer MD. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:357-77.

Harding P, Sigmon DH, Alfie ME, Huang PL, Fishman MC, Beierwaltes WH, Carretero OA. Cyclooxygenase-2 mediates increased renal renin content induced by low-sodium diet. *Hypertension.* 1997 Jan;29(1 Pt 2):297-302.

Harding P, Carretero OA, Beierwaltes WH. Chronic cyclooxygenase-2 inhibition blunts low sodium-stimulated renin without changing renal haemodynamics. *J Hypertens.* 2000 Aug;18(8):1107-13.

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest.* 1994; 94: 2504-2510.

Harris RC. COX-2 and the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47 Suppl 1:S37-42.

Harris RC. An update on cyclooxygenase-2 expression and metabolites in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008 Jan;17(1):64-9.

Hartner A, Cordasic N, Goppelt-Strube M, Veelken R, Hilgers KF. Role of macula densa cyclooxygenase-2 in renovascular hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284: F498-F502.

Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol.* 1998;141:805-814.

Höcherl K, Wolf K, Castrop H, Ittner KP, Bucher M, Kees F, Grobecker HF, Kurtz A. Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. *Pflugers Arch.* 2001 Sep;442(6):821-7.

Höcherl K, Kammerl MC, Schumacher K, Endemann D, Grobecker HF, Kurtz A. Role of prostanoids in regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Aug;283(2):F294-301.

Holmer S, Eckardt KU, LeHir M, Schricker K, Riegger G, Kurtz A. Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Pflugers Arch.* 1993 Oct;425(1-2):62-7.

Horikoshi S, McCune BK, Ray PE, Kopp JB, Sporn MB, Klotman PE. Water deprivation stimulates transforming growth factor-beta 2 accumulation in the juxtaglomerular apparatus of mouse kidney. *J Clin Invest.* 1991 Dec;88(6):2117-22.

Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor beta and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney. Int.* 2006;69:105-113.

Jensen BL, Schmid C, Kurtz A. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1996; 271: F659–F669.

Jensen BL, Kurtz A. Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int.* 1997 Nov;52(5):1242-9.

Jensen BL, Stubbe J, Madsen K, Nielsen FT, Skøtt O. The renin-angiotensin system in kidney development: role of COX-2 and adrenal steroids. *Acta Physiol Scand.* 2004 Aug;181(4):549-59.

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1994 Jun;93(6):2431-7.

Kammerl MC, Nüsing RM, Richthammer W, Krämer BK, Kurtz A. Inhibition of COX-2 counteracts the effects of diuretics in rats. *Kidney Int.* 2001a Nov;60(5):1684-91.

Kammerl MC, Nusing RM, Schweda F, Endemann D, Stubanus M, Kees F, Lackner KJ, Fischereder M, Kramer BK. Low sodium and furosemide-induced stimulation of the renin system in man is mediated by cyclooxygenase 2. *Clin Pharmacol Ther.* 2001b; 70:468-474,.

Kaplan BS, Restaino I, Raval DS, Gottlieb RP, Bernstein J. Renal failure in the neonate associated with in utero exposure to non-steroidal anti-inflammatory agents. *Pediatr Pathol.* 1994; 8:700–704.

Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2008 Jul;73(7):751-62.

Kashiwagi M, Shinozaki M, Hirakata H, Tamaki K, Hirano T, Tokumoto M, Goto H, Okuda S, Fujishima M. Locally activated renin-angiotensin system associated with TGF-beta1 as a major factor for renal injury induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Apr;11(4):616-24.

Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, Alden CL. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol.* 1998 Sep-Oct;26(5):612-20.

Khan KN, Stanfield KM, Dannenberg A, Seshan SV, Baergen RN, Baron DA, Soslow RA. Cyclooxygenase-2 expression in the developing human kidney. *Pediatr Dev Pathol.* 2001 Sep-Oct;4(5):461-6.

Kim J, Lee GS, Tisher CC, Madsen KM. Role of apoptosis in development of the ascending thin limb of the loop of Henle in rat kidney. *Am J Physiol.* 1996 Oct;271(4 Pt 2):F831-45.

Kim SM, Chen L, Mizel D, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J. Low plasma renin and reduced renin secretory responses to acute stimuli in conscious COX-2-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Jan;292(1):F415-22.

Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nusing RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1997; 272: F460–F468.

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

Kömhoff M, Wang JL, Cheng HF, Langenbach R, McKanna JA, Harris RC, Breyer MD. Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development. *Kidney Int.* 2000a; 57, 414-422.

Kömhoff M, Reinalter SC, Gröne HJ, Seyberth HW. Induction of microsomal prostaglandin E2 synthase in the macula densa in children with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Pediatr Res.* 2004 Feb;55(2):261-6.

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

Kurtz A. Cellular Control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1989; 113:1-40.

Kurtz A, Wagner C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 2):F849-62.

Larsson J, Goumans MJ, Sjöstrand LJ, van Rooijen MA, Ward D, Leve'en P, Xu X, ten Dijke P, Mummery CL, Karlsson S. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J.* 2001;20:1663-1673

Little MH, Brennan J, Georgas K, Davies JA, Davidson DR, Baldock RA, Beverdam A, Bertram JF, Capel B, Chiu HS, Clements D, Cullen-McEwen L, Fleming J, Gilbert T, Herzlinger D, Houghton D, Kaufman MH, Kleymenova E, Koopman PA, Lewis AG, McMahon AP, Mendelsohn CL, Mitchell EK, Rumballe BA, Sweeney DE, Valerius MT, Yamada G, Yang Y, Yu J. A high-resolution anatomical ontology of the developing murine genitourinary tract. *Gene Expr Patterns.* 2007 Jun;7(6):680-99.

Liu A, Ballermann BJ. TGF-beta type II receptor in rat renal vascular development: localization to juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 1998 Mar;53(3):716-25.

Machura K, Steppan D, Neubauer B, Alenina N, Coffman TM, Facemire CS, Hilgers KF, Eckardt KU, Wagner C, Kurtz A. Developmental renin expression in mice with a defective renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Nov;297(5):F1371-80.

Mackay K, Striker LJ, Stauffer JW, Doi T, Agodoa LY, Striker GE. Transforming growth factor-beta. Murine glomerular receptors and responses of isolated glomerular cells. *J Clin Invest.* 1989 Apr;83(4):1160-7.

Mangat H, Peterson LN, Burns KD. Hypercalcemia stimulates expression of intrarenal phospholipase A2 and prostaglandin H synthase-2 in rats. Role of angiotensin II AT1 receptors. *J Clin Invest.* 1997 Oct 15;100(8):1941-50.

Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67, 753-791.

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

Minuth M, Hackenthal E, Poulsen K, Rix E, Taugner R. Renin immunocytochemistry of the differentiating juxtaglomerular apparatus. *Anat Embryol (Berl).* 1981;162(2):173-81.

Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA, Smithies O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell.* 1995 Nov 3;83(3):473-82.

Nantel F, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters KM, Giaid A. Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. *FEBS Lett.* 1999; 457: 475-477.

Nasrallah R, Clark J, Hébert RL. Prostaglandins in the kidney: developments since Y2K. *Clin Sci (Lond).* 2007 Oct;113(7):297-311.

Neubauer B, Machura K, Chen M, Weinstein LS, Oppermann M, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA, Schnermann J, Castrop H, Kurtz A, Wagner C. Development of vascular renin expression in the kidney critically depends on the cyclic AMP pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 May;296(5):F1006-12.

Norwood VF, Morham SG, Smithies O. Postnatal development and progression of renal dysplasia in cyclooxygenase-2 null mice. *Kidney Int.* 2000 Dec;58(6):2291-300.

Obermüller N, Kunchaparty S, Ellison DH, Bachmann S. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J Clin Invest.* 1996 Aug 1;98(3):635-40.

Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol.* 1996 Oct 10;179(1):297-302.

Pentz ES, Lopez ML, Kim HS, Carretero O, Smithies O, Gomez RA. Ren1d and Ren2 cooperate to preserve homeostasis: evidence from mice expressing GFP in place of Ren1d. *Physiol Genomics.* 2001 Jun 6;6(1):45-55.

Pentz ES, Moyano MA, Thornhill BA, Sequeira Lopez ML, Gomez RA. Ablation of renin-expressing juxtaglomerular cells results in a distinct kidney phenotype. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Mar;286(3):R474-83.

Pentz ES, Lopez ML, Cordaillat M, Gomez RA. Identity of the renin cell is mediated by cAMP and chromatin remodeling: an in vitro model for studying cell recruitment and plasticity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Feb;294(2):H699-707.

Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol.* 2003 Nov 1; 552(Pt 3):667-71.

Peters J, Clausmeyer S. Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Dec; 34(12):1561-8.

Peti-Peterdi J, Komlosi P, Fuson AL, Guan Y, Schneider A, Qi Z, Redha R, Rosivall L, Breyer MD, Bell PD. Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells. *J Clin Invest.* 2003 Jul;112(1):76-82.

Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH. Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 287: F329-F335.

Ray PE, McCune BK, Gomez RA, Horikoshi S, Kopp JB, Klotman PE. Renal vascular induction of TGF-beta 2 and renin by potassium depletion. *Kidney Int.* 1993 Nov;44(5):1006-13.

Ray PE, McCune B, Gomez RA, Bruggeman LA, Klotman PE. Induction of transforming growth factor-beta 2-3 in the juxtaglomerular apparatus and renal vascular smooth muscle cells of young rats and infants. *Exp Nephrol.* 1994 Mar-Apr;2(2):129.

Reddi V, Zaglul A, Pentz ES, Gomez RA. Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Jan;9(1):63-71.

Reese J, Brown N, Paria BC, Morrow J, Dey SK. COX-2 compensation in the uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantation period. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 Apr 25;150(1-2):23-31.

Reinalter SC, Jeck N, Brochhausen C, Watzer B, Nüsing RM, Seyberth HW, Kömhoff M. Role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *Kidney Int.* 2002 Jul;62(1):253-60.

Richoux JP, Amsaguine S, Grignon G, Bouhnik J, Mernard J, and Corvol P. Earliest renin-containing cell differentiation during ontogenesis in the rat. An immunocytochemical study. *Histochemistry.* 1987;88(1):41-6.

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

Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int.* 2008 Jan;73(1):43-51.

Schmitt R, Ellison DH, Farman N, Rossier BC, Reilly RF, Reeves WB, Oberbäumer I, Tapp R, Bachmann S. Developmental expression of sodium entry pathways in rat nephron. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 2):F367-81.

Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol.* 1998 Feb;274(2 Pt 2):R263-79.

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

Schweda F, Klar J, Narumiya S, Nusing RM, Kurtz A. Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 287: F427-F433.

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

Schweda F, Segerer F, Castrop H, Schnermann J, Kurtz A. Blood pressure-dependent inhibition of Renin secretion requires A1 adenosine receptors. *Hypertension.* 2005 Oct;46(4):780-6.

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA. Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Aug;281(2):F345-56.

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell.* 2004 May;6(5):719-28.

Shankland SJ, Pippin J, Pichler RH, Gordon KL, Friedman S, Gold LI, Johnson RJ, Couser WG. Differential expression of transforming growth factor-beta isoforms and receptors in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int.* 1996 Jul;50(1):116-24.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):685-700.

Sinha S, Hoofnagle MH, Kingston PA, McCanna ME, Owens GK. Transforming growth factor-beta1 signaling contributes to development of smooth muscle cells from embryonic stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C1560-C1568.

Stubbe J, Jensen BL, Bachmann S, Morsing P, Skøtt O. Cyclooxygenase-2 contributes to elevated renin in the early postnatal period in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 May;284(5):R1179-89.

Takahashi N, Lopez ML, Cowhig JE Jr, Taylor MA, Hatada T, Riggs E, Lee G, Gomez RA, Kim HS, Smithies O. Ren1c homozygous null mice are hypotensive and polyuric, but heterozygotes are indistinguishable from wild-type. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jan;16(1):125-32. Epub 2004 Nov 24.

Taugner R, Buhrle CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R. Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms. *Contrib Nephrol.* 1984;43:76-101.

Taugner R, Buhrle CP, Nobiling R. Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res.* 1984;237(3):459-72.

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

Taugner R, Hackenthal E. The Juxtaglomerular Apparatus. Springer Verlag, Heidelberg. 1989

Theilig F, Câmpean V, Paliege A, Breyer M, Briggs JP, Schnermann J, Bachmann S. Epithelial COX-2 expression is not regulated by nitric oxide in rodent renal cortex. *Hypertension.* 2002 Apr;39(4):848-53.

Therland KL, Stubbe J, Thiesson HC, Ottosen PD, Walter S, Sørensen GL, Skøtt O, Jensen BL. Cyclooxygenase-2 is expressed in vasculature of normal and ischemic adult human kidney and is colocalized with vascular prostaglandin E2 EP4 receptors. *J Am Soc Nephrol.* 2004 May;15(5):1189-98.

Topouzis S, Majesky MW. Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo. Two types of aortic smooth muscle cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor-beta. *Dev Biol.* 1996; 178:430-445.

Van der Heijden BJ, Carlus C, Narcy F, Bavoux F, Delezoide AL, Gubler MC. Persistent anuria, neonatal death, and renal microcystic lesions after prenatal exposure to indomethacin. *Am J Obstet Gynecol.* 1994 Sep;171(3):617-23.

Veersema D, de Jong PA, van Wijck JA. Indomethacin and the fetal renal nonfunction syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1983 Oct;16(2):113-21.

Villarreal D, Freeman RH, Davis JO, Verburg KM, Vari RC. Renal mechanisms for suppression of renin secretion by atrial natriuretic factor. *Hypertension.* 1986; 8: 1128-35.

Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, Masferrer JL. Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. *Hypertension.* 1997; 30: 687-692.

Voyer LE, Drut R, Méndez JH. Fetal renal maldevelopment with oligohydramnios following maternal use of piroxicam. *Pediatr Nephrol.* 1994 Oct;8(5):592-4.

Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 1998a **102**:1576-1582.

Wagner C, Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A. Control of the renal renin system by local factors. *Kidney Int Suppl.* 1998b Sep;67:S78-83.

Wagner C, Godecke A, Ford M, Schnermann J, Schrader J, Kurtz A. Regulation of renin gene expression in kidneys of eNOS- and nNOS-deficient mice. *Pflügers Arch.* 2000 Mar;439(5):567-72.

Wagner C, Vitzthum H, Castrop H, Schumacher K, Bucher M, Albertin S, Coffman TM, Arendshorst WJ, Kurtz A. Differential regulation of renin and Cox-2 expression in the renal cortex of C57Bl/6 mice. *Pflugers Arch.* 2003 Nov;447(2):214-22.

Wang JL, Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension.* 1999 Jul;34(1):96-101.

Weber H, Taylor DS, Molloy CJ. Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin Invest.* 1994 Feb;93(2):788-98.

Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J Clin Invest.* 1993 Sep;92(3):1366-72.

Wolf K, Castrop H, Hartner A, Goppelt-Strube M, Hilgers KF, Kurtz A. Inhibition of the renin-angiotensin system upregulates cyclooxygenase-2 expression in the macula densa. *Hypertension.* 1999; 34: 503-507.

Wurdak H, Ittner LM, Lang KS, Leveen P, Suter U, Fisher JA, Karlsson S, Born W, Sommer L. Inactivation of TGFbeta signaling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome. *Genes Dev.* 2005;19:530-535.

Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1998;274: F481-F489.

Yang T, Endo Y, Huang YG, Smart A, Briggs JP, Schnermann J. Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Nov;279(5):F819-25.

Yang T, Huang YG, Ye W, Hansen P, Schnermann JB, Briggs JP. Influence of genetic background and gender on hypertension and renal failure in COX-2-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jun;288(6):F1125-32.

Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Dec;3(12):1011-22.

Zhang MZ, Wang JL, Cheng HF, Harris RC, McKanna JA. Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol.* 1997 Dec;273(6 Pt 2):F994-1002.

Zhang MZ, Harris RC, McKanna JA. Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) in rat renal cortex by adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 21;96(26):15280-5.

Zhang MZ, Wang SW, Cheng H, Zhang Y, McKanna JA, Harris RC. Regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 in young rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Nov;285(5):F881-8.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1	Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.....	8
Abb.1.2	Schematische Darstellung eines Glomerulums mit detaillierter Beschreibung des juxtaglomerulären Apparats	9
Abb.1.3	Schematische Darstellung der Nierengefäßbaumentwicklung und Reninzellrekrutierung	10
Abb.1.4	Abstammung der JG-Zellen.....	11
Abb.1.5	Allgemeiner Mechanismus der TGF- β -Rezeptor- und Smad-Aktivierung	16
Abb.2.1	Schema zur Methode der 3D-Rekonstruktion	33
Abb.3.1	Renin- und COX-2-Expression während der Entwicklung in C57Bl/6 Mäusen.	40
Abb.3.2	Reninexpression in COX-2-Knockoutmäusen während der Entwicklung.	41
Abb.3.3	Amira 3D-Gefäßbaumrekonstruktionen von COX-2 -/- an Embryonaltag 18	44
Abb.3.4	Amira 3D-Gefäßbaumrekonstruktionen von COX-2 -/- an Postpartaltag 1	45
Abb.3.5	Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen von COX-2 -/- an Postpartaltag 3 und 10.....	47
Abb.3.6	Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer adulten COX-2 -/-	48
Abb.3.7	Renin-mRNA-Abundanz in adulten unbehandelten COX-2 -/- und stimulierten COX-2 -/- Mäusen.....	49
Abb.3.8	Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer adulten stimulierten COX-2 -/-.....	50
Abb.3.9	Renin- und α SMA-Immunfluoreszenzaufnahmen einer adulten COX-2 -/- Niere...	51
Abb.3.10	Längenmessung superfizieller afferenter Arteriolen von COX-2 -/-	52
Abb.3.11	Immunfluoreszenzfärbungen von COX-2, Renin und α -SMA in Wildtypnieren- schnitten unterschiedlicher Entwicklungsstadien.	53
Abb.3.12	Schematische Einteilung des komma- und S-förmigen Körperchens mit Expressionsverteilung von Wt1 und Cdh6.....	55
Abb.3.13	Immunfluoreszenzfärbungen mit Nephronabschnittsmarkern und COX-2 in postpartalen Wildtypnierenschnitten.	56
Abb.3.14	Agarosegel zum Deletionsnachweis des geflochten TGF- β RII-Genteilbereichs.	58
Abb.3.15	TGF- β RII- und Reninexpression in TGF- β RII RenRenflfl Kontrollmäusen während der Entwicklung	59

Abb.3.16 Plasmeninkonzentration in TGF- β RII RenCreffl Mäusen während der Entwicklung	60
Abb.3.17 Reninexpression von TGF- β RII RenCreffl und -RenRenffl Mäusen während der Entwicklung	62
Abb.3.18 Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer TGF- β RII RenCreffl an Embryonaltag 18.	63
Abb.3.19 Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen von TGF- β RII RenCreffl an Postpartaltag 1.	64
Abb.3.20 Amira 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen von adulten TGF- β RII RenCreffl	65
Abb.3.21 Renin- und α -SMA- Immunfluoreszenzfärbung einer adulten TGF- β RII RenCreffl Maus.	66
Abb.3.22 Renin- und TGF- β RII-Expression von adulten TGF- β RII RenRenffl Mäusen unter Stimulation des RAAS.	67
Abb.3.23 Reninexpression in mit LS und Enalapril behandelten TGF- β RII RenCreffl Mäusen.	67

Abkürzungsverzeichnis

Die Kenntnis chemischer Elementensymbole und Stoffverbindungen sowie von SI-Maßeinheiten und gängigen, in den Naturwissenschaften und in der Medizin gebrauchten Begriffsabkürzungen wurden in dieser Arbeit als Fachwissen vorausgesetzt.

3D – dreidimensional	gDNA – genomische DNA
A. – Arteria (e)	G-Protein – Guaninnucleotid bindendes Protein
Abb – Abbildung	I.E. – internationale Einheit
ACE – Angiotensin-Converting-Enzyme	Ig – Immunglobulin
ALK – activin like kinase	IP – Prostacyclin-Rezeptor
ANGI – Angiotensin I	JG – juxtaglomerulär
ANGII – Angiotensin II	JGE – juxtaglomeruläre Epitheloidzellen
α-SMA – α -Glattmuskelaktin (α -smooth muscle actin)	LS – Nidrigsaldzdiät (Low salt)
AT-Rezeptoren – Angiotensin-II-Rezeptoren	MC – methanephrotische Mesenchymalzellen
BMP – bone morphogenetic protein	MD – Macula Densa
BSA – bovine serum albumin	NKCC-2-Kotransporter – Na-K-2Cl-Kotransporter
cAMP – cyclisches Adenosinmonophosphat	NSAIDs – Non steroidal anti inflammatory drugs
Cdh6 – Cadherin 6 (K-Cadherin)	PBS – phosphate buffered saline
cDNA – copy DNA	PG – Prostaglandin
COX – Cyclooxygenase	PGI₂ – Prostacyclin
COX-2 -/- – COX-2 Knockoutmaus	PKA – Proteinkinase A
COX-2 +/+ – COX-2 Wildtypmaus	pp – postpartaler Tag
CSB – komma-förmiges Körperchen (comma-shaped body)	PRC – Plasmareninkonzentration
Cy – Carbocyanin	PTGS – Prostaglandinsynthase G ₂ /H ₂
DEPC – Diethylpyrocarbonat	RAAS – Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
E – embryonaler Tag	RGB – rot-grün-blau-Farbpalette
EP1-4 – Prostaglandin-E-Rezeptor 1-4	RIA – Radioimmunoassay
	RT – Raumtemperatur

SEM – Standardfehler des Mittelwerts

SMC – Glattmuskelzelle (smooth muscle cell)

SSB – S-förmiges Körperchen (S-shaped body)

TAL – dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife
(Thick ascending limb of Henle)

TGF- β – transforming growth factor beta

TGF- β RI/II – TGF- β -Rezeptor-Typ I/II

TGF- β RII RenCreflfl (RC-/-) – reninzellspezifische
TGF- β RII-Knockoutmaus

TGF- β RII RenRenflfl (RR+/+) – Wildtypkontrolle
zu reninzellspezifischer TGF- β RII-Knockoutmaus

THP – Tamm Horsfall Glycoprotein

TRIS – Tris-(hydroxy-methyl-) amino-methan

TRITC – Tetramethylrhodamin

TxA₂ – Thromboxan A₂

VSMC – vaskuläre Glattmuskelzellen
(vascular smooth muscle cell)

w/w – weight per weight

WT – Wildtyp

WT1 – Wilms' Tumor 1 Protein

Bisherige Veröffentlichungen

Wagner C, de Wit C, Gerl M, Kurtz A, Höcherl K. Increased expression of cyclooxygenase 2 contributes to aberrant renin production in connexin 40-deficient kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Nov;293(5):R1781-6.

Wurm S, Neumeier M, Weigert J, Wanninger J, Gerl M, Gindner A, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C. Insulin induces monocytic CXCL8 secretion by the mitogenic signalling pathway. *Cytokine.* 2008 Oct;44(1):185-90.

Kurtz L, Gerl M, Kriz W, Wagner C, Kurtz A. Replacement of connexin 40 by connexin 45 causes ectopic localization of renin-producing cells in the kidney but maintains in vivo control of renin gene expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Aug;297(2):F403-9.

Desch M, Harlander S, Neubauer B, Gerl M, Germain S, Castrop H, Todorov VT. cAMP target sequences enhCRE and CNRE sense low-salt intake to increase human renin gene expression in vivo. *Pflügers Arch.* 2011 May;461(5):567-77.

Höcherl K, Gerl M, Schweda F. Proteinase-activated receptors 1 and 2 exert opposite effects on renal Renin release. *Hypertension.* 2011 Oct;58(4):611-8.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner, die mir während der ganzen Zeit der Promotion, bei Fragen und Problemen mit ihrem Rat zur Seite stand. Bedanken möchte ich mich dafür, dass sie mir nicht nur immer genügend Freiraum für eigene Ideen gelassen, sondern mich auch stets dabei ermutigt und unterstützt hat. Liebe Charlotte, vielen lieben Dank, dass du immer hinter mir gestanden hast. Du hast mir nicht nur fachlich sehr viel mit auf den Weg gegeben. Du bist für mich auch ein großes Vorbild.

Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz, an dessen Lehrstuhl ich promovieren durfte. Lieber Herr Kurtz, herzlichsten Dank für Ihr stets großes Interesse und Engagement, welches sie jedem einzelnen von uns entgegen bringen.

Bedanken möchte ich mich auch ganz besonders bei meiner Familie, die in der Zeit dieser Arbeit meine üblen Launen tapfer ertragen hat: bei meinen Eltern, Irene und Norbert Gerl, die mein ganzes Leben lang darauf bedacht waren, mir stets alle Türen offen zu halten, und ohne die ich heute nicht da wäre, wo ich jetzt bin; bei meinem Bruder Robert, auf dessen tatkräftige Hilfe ich mich stets verlassen kann; auch bei Rosalinde, Harald und Annett Weiche, denen ich nicht nur wegen der ständigen Essenslieferungen großen Dank schuldig bin. Es ist wunderbar zu wissen, dass es Menschen in meinem Leben gibt, die alles für mich tun würden und auf die ich mich immer verlassen kann, egal, was kommt. Auch wenn Ihr es nicht immer leicht mit mir habt, ich weiß es wirklich zu schätzen, welch riesen Glück es ist, Euch zu haben. Danke, dass Ihr für mich da seid.

Ein Herzliches Dankeschön gilt auch meinen Kollegen. Ganz besonders Katharina Machura, Björn Neubauer und Dominik Steppan, die mir stets mit Rat und Tat zu Seite standen und die nicht nur Bürokollegen, sondern auch gute Freunde geworden sind. Außerdem danke ich unseren technischen Assistentinnen, Gerda Treuner, der weltbesten Gelefrau, und Anna M'Bangui, unserer Histokoryphäe, für ihre tatkräftige und kompetente Unterstützung. Dankeschön für die gute Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt ein riesen Dank an meine Mädels, die mit mir durch dick und dünn gehen, für all meine Sorgen jederzeit ein offenes Ohr haben und mich selbst an schwärzesten Tagen noch zum Lachen bringen. Dafür, dass sie sich die Zeit zum Korrekturlesen genommen haben möchte ich mich bei Beate Hasenreiter, Martina Kürzinger und Tanja Hofbauer bedanken. Auch herzlichst bedanken möchte ich mich bei Ramona Mogge, meiner Moni, auf die ich mich immer 100 % verlassen kann, ohne die es in der Arbeit nicht mal halb so schön wäre und auf die ich nicht mehr verzichten möchte. Bleibt nur noch eins zu sagen, wer braucht schon tausend andere, wenn er doch euch hat. Schön, dass es euch gibt, danke für eure Freundschaft.

Abschließend möchte ich mich noch bei all den Menschen bedanken, die hier nicht namentlich erwähnt wurden und mir während der Zeit dieser Arbeit zur Seite gestanden oder mir ihre Hilfe angeboten haben. Herzlichen Dank.