

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PHYSIOLOGIE  
PROF. DR. ARMIN KURTZ  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**RENALE VERTEILUNG DES AT<sub>1</sub>-REZEPTORS IN EMBRYONALEN  
ENTWICKLUNGSSTADIEN VON MÄUSEN,  
IMMUNHISTOCHEMISCHE UND DREIDIMENSIONALE  
DARSTELLUNG**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Johannes Ermer

JAHR 2013





AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PHYSIOLOGIE  
PROF. DR. ARMIN KURTZ  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**RENALE VERTEILUNG DES AT<sub>1</sub>-REZEPTORS IN EMBRYONALEN  
ENTWICKLUNGSSTADIEN VON MÄUSEN,  
IMMUNHISTOCHEMISCHE UND DREIDIMENSIONALE  
DARSTELLUNG**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Johannes Ermer

JAHR 2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Armin Kurtz

2. Berichterstatter: PD. Dr. Sebastian Hahnel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2013, 8:30 Uhr

**Hinweis:**

Die im Text genannten Gebrauchsspuren, Handelsnamen und Warenzeichen sind zum Teil patent- und urheberrechtlich geschützt. Aus dem Fehlen eines besonderen Hinweises bzw. des Sonderzeichens <sup>®</sup> darf nicht geschlossen werden, dass kein Schutz besteht.



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	6
1 Einleitung .....	8
1.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) .....	9
1.2 Renin .....	10
1.3 Angiotensin II-Rezeptoren .....	12
1.3.1 Primäre Struktur der AT <sub>1</sub> - und AT <sub>2</sub> -Rezeptoren.....	12
1.3.2 Signaltransduktion des AT <sub>1</sub> -Rezeptors .....	14
1.3.3 Funktion des AT <sub>1</sub> -Rezeptors .....	16
1.3.4 Funktion des AT <sub>2</sub> -Rezeptors .....	16
1.4 Systemische Eingriffe in Komponenten des RAAS.....	17
1.5 Embryogenese .....	17
1.6 Blutgefäßbildung.....	20
1.7 Blutgefäße in der Mäuseniere .....	21
1.8 Zielsetzung der Arbeit .....	22
2 Material und Methoden .....	23
2.1 Materialien .....	24
2.1.1 Geräte .....	24
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	25
2.1.3 Chemikalien .....	26
2.1.4 Antikörper .....	27
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	28
2.1.6 Computersoftware .....	29
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Versuchstiere .....	29
2.2.2 Organentnahme und Fixierung des Nierengewebes.....	30
2.2.3 Einbettung von Nierengewebe in Paraffin .....	30
2.2.4 Immunhistochemische Färbungen.....	31
2.2.5 3D-Rekonstruktion .....	32

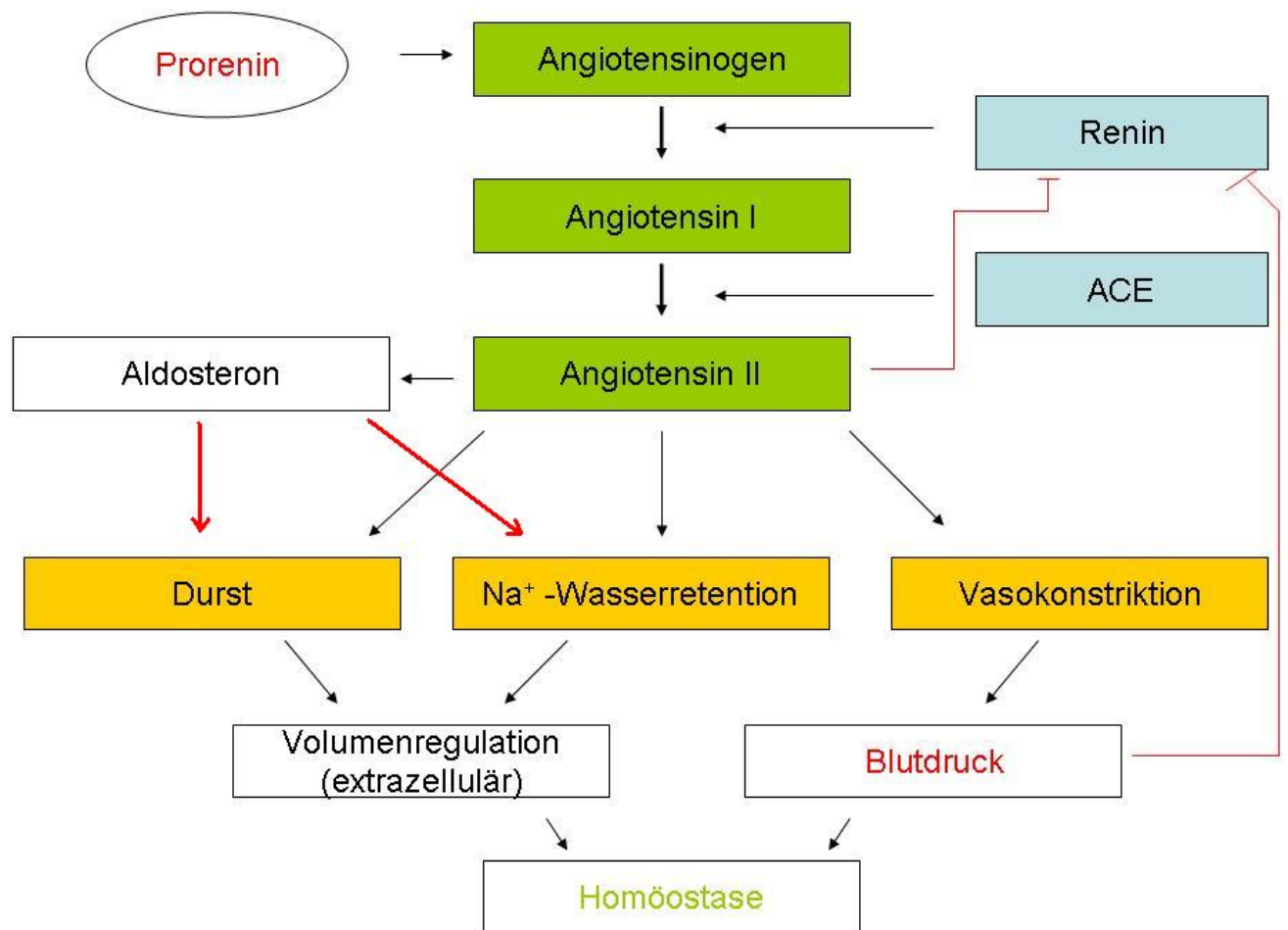
3	Ergebnisse .....	35
3.1	Lokalisation des Angiotensin II-Rezeptors Typ I (AT <sub>1</sub> -Rezeptor) in Mäusenieren während der Entwicklung.....	36
3.1.1	Verteilung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors am Embryonaltag 17 .....	37
3.1.2	Verteilung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors am Embryonaltag 19 .....	40
3.1.3	Verteilung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors am Tag 1 nach der Geburt (pp1).....	42
3.1.4	Verteilung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors am Tag 3 und 5 nach der Geburt (pp3/ pp5).....	45
3.1.5	Verteilung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors im adulten Tier.....	46
3.2	Lokalisationsbestimmung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors .....	49
3.2.1	Lokalisationsbestimmung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors im Glomerulus .....	49
3.2.2	Lokalisationsbestimmung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors im Tubulussystem.....	52
3.3	Untersuchung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors in AT defizienten Mäusen .....	55
3.3.1	Auftreten des AT <sub>1</sub> -Rezeptors in AT <sub>1a</sub> -Rezeptor-KO-Mäusen .....	55
3.3.2	Auftreten des AT <sub>1</sub> -Rezeptors in AT <sub>(1a+b)</sub> -KO-Mäusen.....	56
3.3.3	Auftreten des AT <sub>1</sub> -Rezeptors in AT <sub>2</sub> -KO Mäusen.....	57
4	Diskussion .....	58
4.1	Verteilung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors während der Entwicklung .....	59
4.2	Verteilung des AT <sub>1</sub> -Rezeptors in der adulten Mausniere.....	60
4.3	Lokalisation des AT <sub>1</sub> -Rezeptors in verschiedenen Tubulusabschnitten .....	61
4.4	Verteilung in AT defizienten Mäusen .....	62
5	Ausblick .....	63
6	Abbildungsverzeichnis .....	64
7	Quellenverzeichnis .....	66
8	Abkürzungsverzeichnis .....	77
9	Danksagung.....	79
10	Lebenslauf .....	80

## **1 Einleitung**

## 1.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS)

Eine Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes ist für alle Lebewesen auf dem Land, insbesondere für den Menschen, von zentraler Bedeutung. Um dabei auf jegliche Umwelteinflüsse reagieren zu können, verfügt die Niere über ein empfindliches System aus Wasser- und Natriumretention und -freigabe, um den Blutdruck und die Homöostase regulieren zu können. Wichtige Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) sind zum einen die Aspartylprotease Renin und das Glykoprotein Angiotensin, zum anderen das Steroidhormon Aldosteron. Im Plasma befindliches Renin spaltet dabei von dem aus der Leber stammenden Oligopeptid Angiotensinogen das Angiotensin I (AngI) ab (Abb. 1.1). Dabei handelt es sich zunächst um ein biologisch inaktives Dekapeptid, welches durch das im Lungenepithel gebildete ACE (Angiotensin-Converting-Enzym) in Angiotensin II (AngII) überführt wird. Dieses Oktapeptid stellt die vasokonstriktorische Komponente des RAAS dar (Hackenthal et al., 1990). Eine Signalweiterleitung des AngII erfolgt über seine Rezeptoren, Angiotensin II-Rezeptor Typ I und II (AT<sub>1</sub>- / AT<sub>2</sub>-Rezeptor). Diese Rezeptoren befinden sich sowohl in Zellen des kardiovaskulären, endokrinen und Endothelsystems (Unger et al., 1996, Ardaillou, 1999; Grobecker, 1999). Durch eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor wird die vasokonstriktorische Komponente des AngII erzielt. Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor hingegen ist wesentlich schwächer ausgeprägt; zu finden ist er ausschließlich in Reproduktionsorganen und im Herzen (Wang et al., 1998), aber auch in den Nebennieren (Martineau et al., 1999). Seine genaue Struktur und Funktion sind noch nicht vollends aufgeklärt. Im zentralen Nervensystem löst AngII ein Durstgefühl aus und bewirkt in der Nebennierenrinde die Ausschüttung des Hormons Aldosteron, welches seinerseits durch eine Wasser- und Natriumrückresorption zu einer Erhöhung des Blutvolumens und dadurch bedingt zu einer Erhöhung des Blutdruckes führt (Hackenthal et al., 1990). Nachweislich abhängig ist die Aktivität des RAAS von der Expression und Sekretion des Renins in den juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen). Im Normalfall sind Angiotensinogen und ACE im Überfluss vorhanden, sodass dem Renin im RAAS eine regulierende Rolle zukommt (Kurtz, 1989; Peters und Clausmeyer, 2002; Mercure et al., 1998). Die Reninfreisetzung und -rückresorption ist auch Angriffspunkt einer Feedbackhemmung. Abhängig vom systemischen Blutdruck, renalen Perfusionsdruck und tubulären Kochsalzspiegel wird dadurch Renin freigesetzt oder gespeichert (Hackenthal et al., 1990). Neben diesem organübergreifenden RAAS, ausgehend von der Niere sind im Herzen, Auge und Gehirn isolierte Renin-Angiotensin Systeme nachweisbar. Über diese ist insgesamt wenig bekannt.



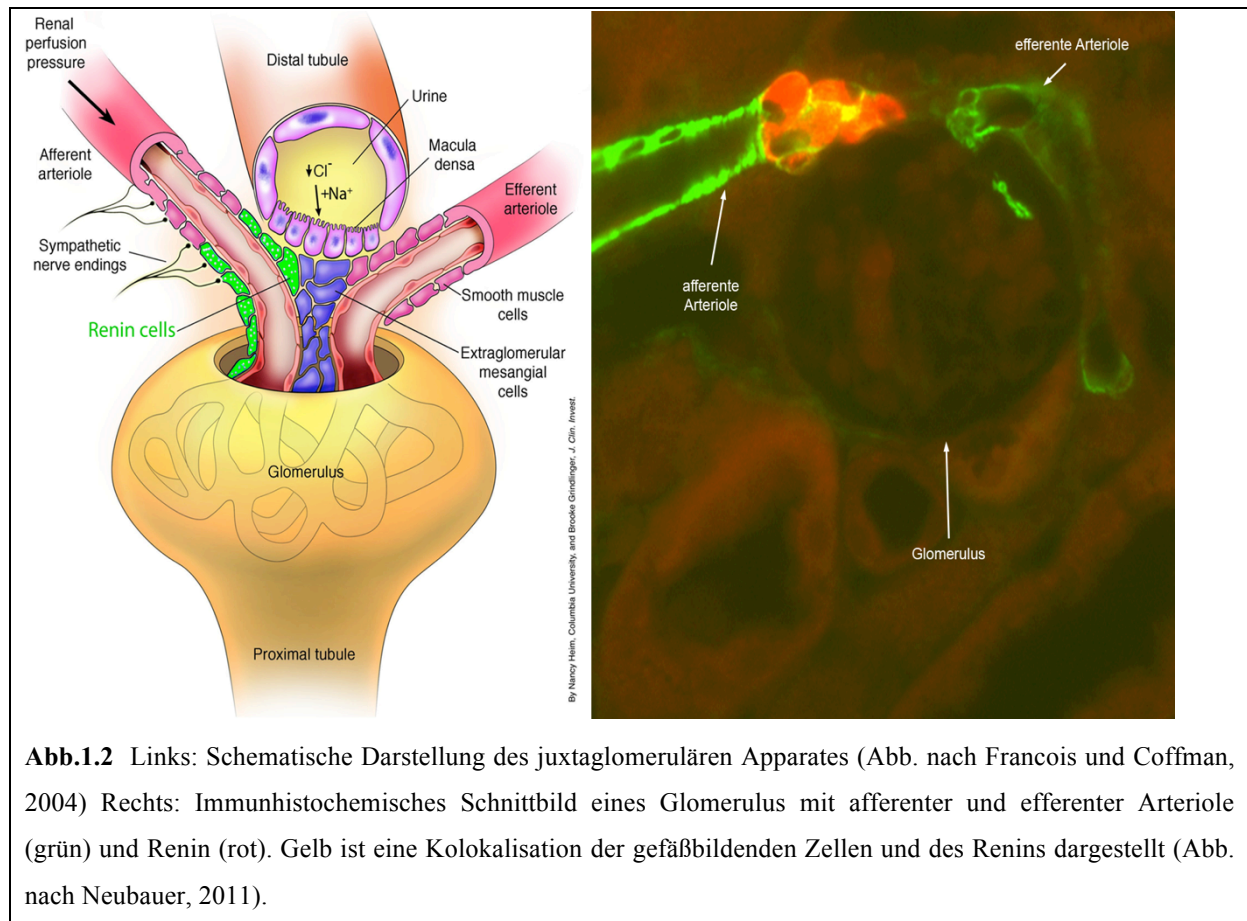


**Abb.1.1** Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems

## 1.2 Renin

Neben Herz, Gehirn und Nebennieren wird das zirkulierende Renin größtenteils in der Media der afferenten Arteriolen (terminaler Pol) gebildet und gespeichert (Latta et al., 1987, Barajas et al., 1986; Mc Gowan et al., 1980, Taugner et al., 1979).

Renin wird aus Präprorenin gebildet. Nach Abspaltung der Präsequenz entsteht das inaktive Prorenin, welches im Golgi-Apparat in Vesikel verpackt wird. Hier findet die Aktivierung statt, indem vom N-Terminus 46 Aminosäuren abgespalten werden. Bis zur Freisetzung in die Zirkulation wird es dort gespeichert und bei Bedarf freigesetzt (Barajas et al., 1986, Taugner et al., 1987, Taugner, 1979). Durch zahlreiche Granulen bilden die Reninzellen eine epitheloide Form. Am vaskulären Pol des Glomerulus überlagern sich die JG-Zellen (juxtaglomeruläre Epitheloidzellen) mit den typischen Glattmuskulzellen der Arteriolen. Diese stehen auch in engem Kontakt zu den Zellen der Macula Densa (MD-Zellen). Die JG-Zellen, die MD-Zellen, die extraglomerulären Mesangialzellen und die Glattmuskulzellen bilden zusammen den juxtaglomerulären Apparat (JGA) (Taugner et al., 1984) (Abb.1.2).



In den Mediazellen der efferenten Arteriolen und den extraglomerulären Mesangialzellen findet sich nur selten Renin (Kon, 1999). Während der Entwicklung ist Renin nicht nur auf den vaskulären Pol beschränkt, sondern erstreckt sich nahezu über den gesamten Gefäßbaum (Sauter et al., 2007, Minuth et al., 1981, Richoux et al., 1986).

Die Zahl der reninbildenden Zellen in der Niere verhält sich dabei auch im adulten Tier nicht konstant. So kann es beispielsweise mit fortschreitendem Alter oder bei Erkrankungen, wie Diabetes, zu einem Rückgang der JG-Zellen kommen (Sequeira Lopez et al., 2001). Daneben führen Störungen des Herz-Kreislaufsystems, wie z.B. arterielle Hypotonie, zur vermehrten Reninexpression. Auch Versuchstiere auf Niedersalzdiet zeigten ein ähnliches Bild. Das retrograde Anschalten von Reninzellen entlang der afferenten Arteriolen bezeichnet man als Rekrutierung; ein genauer Mechanismus diesbezüglich ist noch nicht vollends aufgeklärt. Neueste Studien zeigen, dass dabei z.B. NO über den NO-solublen Guanylatzyklase-cGMP-Signalweg von Bedeutung ist (Neubauer et al., 2013).

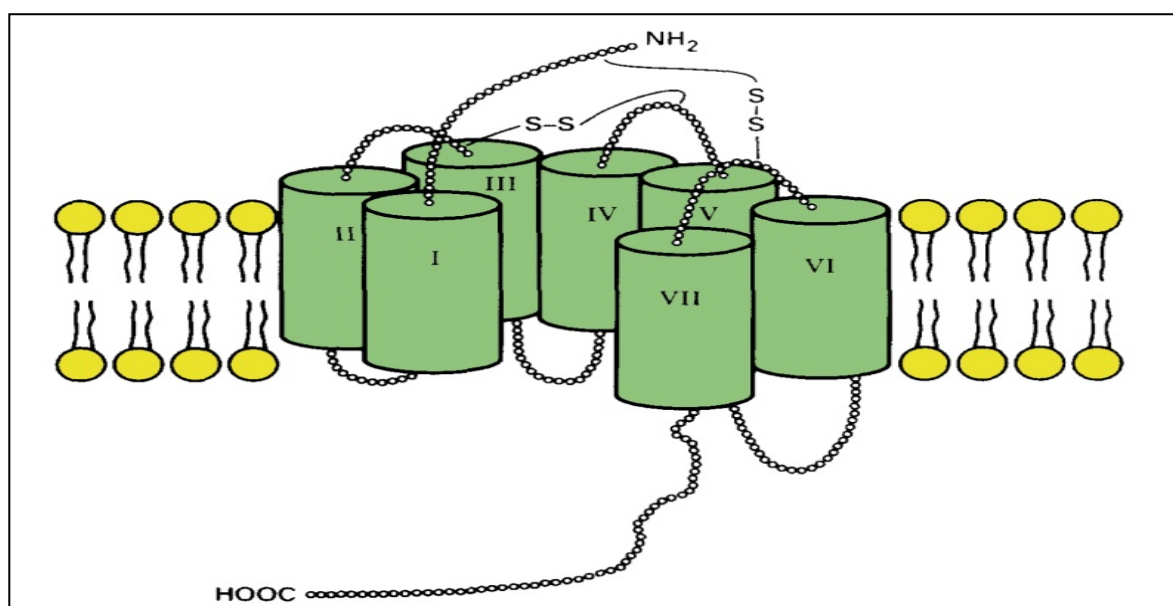
### 1.3 Angiotensin II-Rezeptoren

Angiotensin II (AngII) ist ein multifunktionelles Hormon und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutdruckes und der kardiovaskulären Homöostase. Vermittelt wird dessen Effekt vor allem durch seine Rezeptoren Angiotensin II-Rezeptor Typ I (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) und Angiotensin II-Rezeptor Typ II (AT<sub>2</sub>-Rezeptor) (Dien T. Dinh et al., 2001).

Dabei sind AT<sub>1</sub>-Rezeptoren vor allem in adulten Spezies vorzufinden, wohingegen AT<sub>2</sub>-Rezeptoren überwiegend in fetalen, vereinzelt aber auch in adulten Geweben anzutreffen sind. Hierzu zählen vor allem die Nebennieren, die Ovarien, der Uterus und das Gehirn. Die von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren ausgelösten Effekte von AngII werden über die von AT<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelten reguliert (Ardaillou et al., 1999).

#### 1.3.1 Primäre Struktur der AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren

Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor wurde zum ersten Mal in Rattenglattmuskelaktin (Murphy et al., 1991) und Nebenniere in Rindern (Sasaki et al., 1991) kloniert. Seine Größe beläuft sich auf 359 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 40,9kD entspricht. Sein reales Gewicht steigert sich nach posttransskriptionaler Glykosylierung. Er gehört zur Familie der 7-Transmembrandomänrezeptoren (Abb.1.3). Eine wichtige Rolle für die Bindung von AngII spielt sein extrazellulärer N-Terminus und die Transmembrandomänen (Hunyady et al., 1996). Die Bindungsstelle für AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker unterscheidet sich von der des AngII; diese interagieren vorwiegend mit der Transmembran bzw. der zentralen Region des Rezeptors (Grolewski et al., 1995).

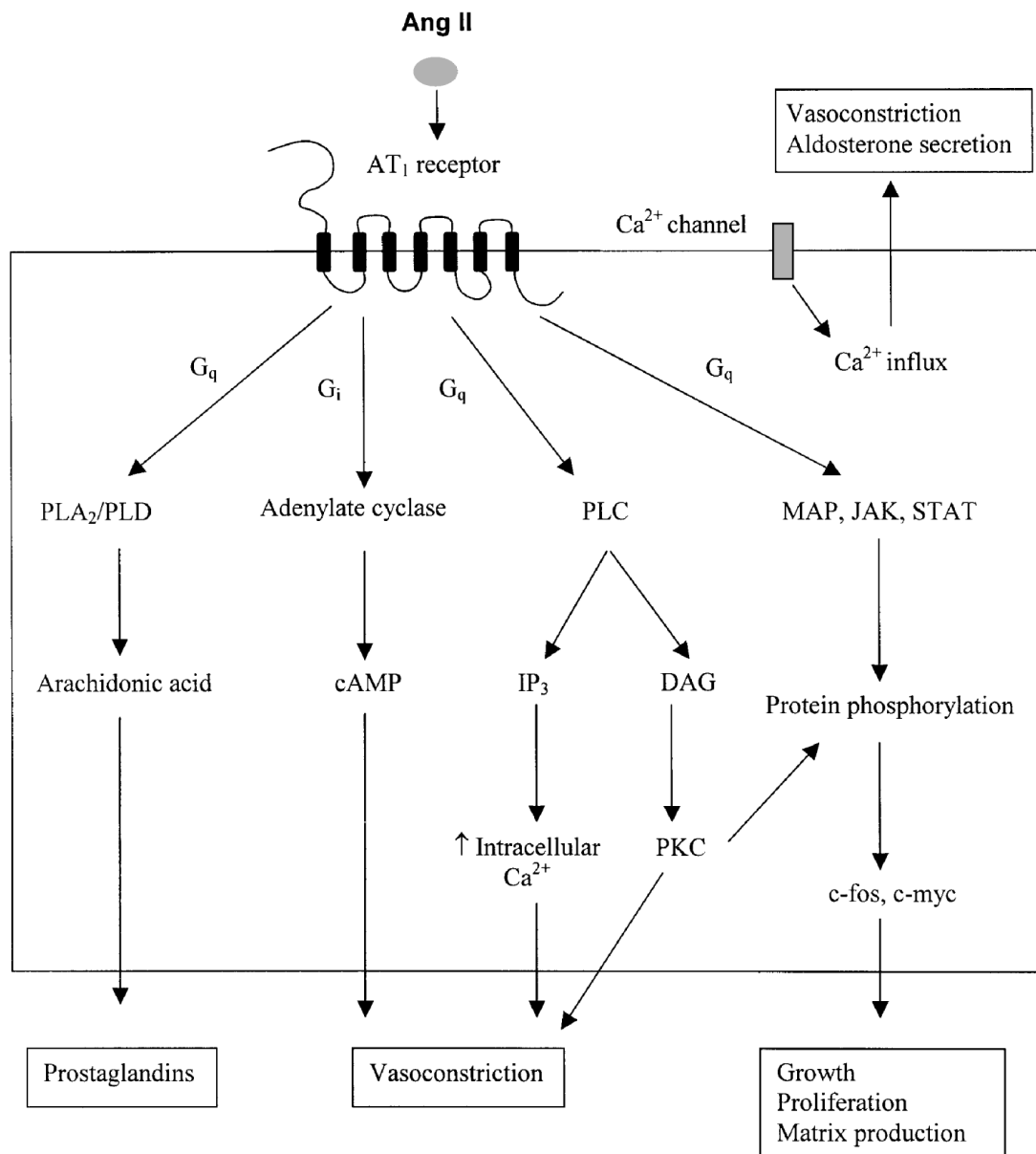


**Abb.1.3** Schematische Darstellung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors; grün dargestellt sind die mit I-VII nummerierten Transmembrandomänen mit Disulfidbrücken (Abbildung nach Sandberg, 1994)

Es gibt jeweils zwei Isoformen des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, AT<sub>1a</sub> und AT<sub>1b</sub> (Iwai et al., 1992; Lewis, 1993). Dabei befindet sich in der Ratte das Gen für AT<sub>1a</sub> auf Chromosom 17, das Gen für AT<sub>1b</sub> ist auf Chromosom 2 lokalisiert (Lewis, 1993). Beim Menschen existiert nur ein Gen für AT<sub>1</sub>. Dieses befindet sich auf Chromosom 3 (Guo et al., 1994). AT<sub>1a</sub>-Rezeptoren sind vornehmlich in der Niere, Leber, Lunge und Gefäßglattmuskelaktin zu finden, wohingegen AT<sub>1b</sub> hauptsächlich in der Nebenniere exprimiert wird. Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor wurde in verschiedenen Spezies, darunter im Menschen, der Maus und der Ratte, geklont. Bei diesem Rezeptor handelt es sich ebenfalls um einen 7-Transmembrandomänrezeptor mit einem spezifischen Gewicht von 41kD und einer Zusammensetzung aus 363 Aminosäuren. Von seinem Aufbau und seiner Zusammensetzung ähnelt er dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor nur zu 34% (Mukoyama et al., 1993). Beim Menschen liegt er auf dem X-Chromosom. Genauer über die Bindung von AngII an den AT<sub>2</sub>-Rezeptor ist nicht bekannt.

### 1.3.2 Signaltransduktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors

Es gibt fünf klassische Wege der Signaltransduktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors. Die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, der Phospholipase C, der Phospholipase D, die Aktivierung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vom L-Typ und die Blockierung der Adenylatzyklase (Abb.1.4).



**Abb.1.4** Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege und physiologischer Effekte des AT<sub>1</sub>-Rezeptors (Abb. aus Diem T. Dinh., 2001); Abkürzungen: PLA (Phospholipase A), PLC (Phospholipase C), JAK (Janus Kinase), STAT (signal transducers and activators of transcription), IP<sub>3</sub> (Inositoltriphosphat), DAG (Diazylglycerol), PKC (Protein-Kinase C)

Die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) über den  $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptor ( $G_q$ ) ist dabei einer der am meist beschriebenen Mechanismen. Diese Aktivierung führt über Hydrolyse von Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) zu einem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und letztlich zu Vasokonstriktion. Zudem induziert Diazylglycerol (DAG) die Proteinkinase C Aktivität, was zudem gefäßverengend wirkt. Eine Aktivierung der Phospholipasen  $A_2$  ( $PLA_2$ ) und D (PLD) führt zur Neubildung von Arachidonsäure, einem Vorläufermolekül zur Bildung von Prostaglandinen (Griendling et al., 1996; Capponi, 1996, De Gasparo et al. 2000). Eine Bindung von AngII an einen  $G_i$  gekoppelten  $AT_1$ -Rezeptor hemmt die Bildung der Adenylatzyklase in der Niere. Es kommt dadurch im Anschluss zur verminderten Freisetzung von cAMP in diesen Organen, was letztlich vasokonstriktorisch wirkt (Jard, 1981; Pobiner, 1985). Ein weiterer Mechanismus ist das Öffnen  $Ca^{2+}$ -gesteuerter Kanäle. Ein rascher Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen in die Zelle stimuliert die Freisetzung und den Abtransport von Aldosteron aus der Zelle. Aldosteron wirkt auf den Organismus drucksteigernd (Apfeldorf et al., 1988).

Ein weiterer wichtiger Weg ist die  $G_q$  gekoppelte Aktivierung der mitogen aktivierten Protein Kinase (MAP), der Janus Kinase (JAK) und des STAT-Proteins. Diese führen über eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung zur Ausschüttung der Wachstumsfaktoren c-fos und c-myc, zur Gewebeneubildung und Wachstum (Sadoshima et al., 1993).

### 1.3.3 Funktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors

Eine Aktivierung der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren in Blutgefäßen durch AngII führt zur Vasokonstriktion bedingt durch eine Erhöhung des peripheren Gefäßtonus und des systemischen Blutdruckes (Hughes, 1998; Ribeiro et al., 1985). AngII reguliert über AT<sub>1</sub>-Rezeptoren an Kardiomyozyten den positiv inotropen und chronotropen Effekt des Herzens (Moravec et al., 1990). AngII beeinflusst zudem das Zellwachstum und die Proliferation der Kardiomyocyten, Fibroblasten und gefäßbildenden Zellen. Es induziert die Expression von endogenen Wachstumsfaktoren, inklusive TGF  $\beta_1$  und PGDF (Huckle et al., 1994; Rosendorff, 1996).

Folgende Auflistung zeigt die über AT<sub>1</sub> vermittelten Effekte von AngII auf die Niere nach Ardaillou, 1999:

- Vasokonstriktion der renalen Blutgefäße, im Speziellen der afferenten und efferenten Arteriolen einhergehend mit einer Abnahme des kortikalen Plasmaflusses
- Kontraktion der Mesangialzellen mit Abnahme des Ultrafiltrationskoeffizienten ( $K_f$ ) und der glomerulären Filtration (GFR)
- Stimulation des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers im proximalen Tubulus
- Hemmung der Reninsekretion
- Trophische Effekte, wie z.B. Zellhypertrophie, Hyperplasie vor allem der Mesangialzellen und der Zellen des proximalen Tubulus
- Einfluss auf die Entwicklung der fetalen Niere

### 1.3.4 Funktion des AT<sub>2</sub>-Rezeptors

Auflistung der AT<sub>2</sub> abhängigen Effekte in der Niere nach Ardaillou, 1999:

- Einfluss auf die Zelldifferenzierung in der fetalen Niere
- Generelle Hemmung der Zellproliferation
- Induktion von Apoptose
- Kontrolle der natriuretischen Antwort auf den Perfusionsdruck

## **1.4 Systemische Eingriffe in Komponenten des RAAS**

Experimente an Knock-Out Mäusen, bei denen bestimmte Gene einzelner Komponenten des RAAS (ACE, Angiotensin II-Rezeptor Typ I und II) während der Entwicklung deletiert wurden, zeigten morphologische und funktionelle Missbildungen der Niere (Esther et al., 1996; Nagata et al., 1996; Tsuchida et al., 1998). Dies lässt Rückschlüsse zu, dass die einzelnen Komponenten des RAAS bereits während der Nierenentwicklung bestimmten Expressionsmustern unterlegen sind. Eine Deletion des Gens für AT<sub>1a</sub> reduziert unter anderem signifikant den Blutdruck des Versuchstieres (Ito et al., 1995; Sugaya et al., 1995). Im Gegensatz dazu spielt die Deletion des Gens für AT<sub>1b</sub> für die Senkung des Blutdruckes eine eher untergeordnete Rolle (Chen et al., 1997).

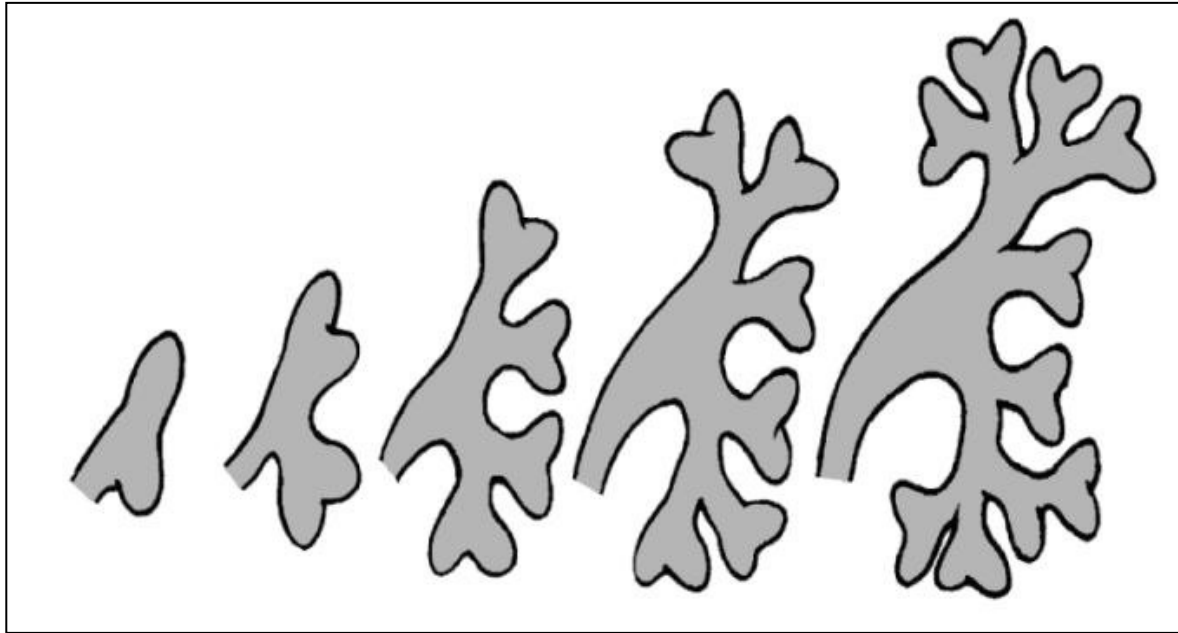
Im Gegensatz zu ACE oder Angiotensinogen Knock-Out-Mäusen spielt die Deletion der Gene für AT<sub>1a</sub> und AT<sub>1b</sub> eine untergeordnete Rolle hinsichtlich des Überlebens der Versuchstiere. AT<sub>1</sub> Knock-Out-Mäuse zeigen jedoch deutlich verkürzte und vor allem auch verdickte Gefäße (Ito et al., 1995; Sugaya et al., 1995; Oliveiro et al., 1998).

## **1.5 Embryogenese**

Bei Säugetieren, wie auch bei anderen Lebewesen, vollzieht sich die Nierenentwicklung in drei Generationen, die zeitlich und räumlich voneinander getrennt sind. Es handelt sich dabei um die Vorniere (Pronephros), die Urnieren (Mesonephros) und die Nachnieren (Metanephros) (Langman et al., 1985). Gebildet werden diese Nierenanlagen aus dem Nephrotom. Dabei handelt es sich um die dorsale Wand des embryonalen Mesoderms. Während der Pronephros zeitlebens nicht funktionsfähig ist und der Mesonephros lediglich kurzzeitig exkretorisch wirkt, entwickelt sich aus dem Metanephros letztlich die funktionsfähige Niere (Saxen et al., 1987).

Nachdem sich Vornieren und Urnieren wieder zurückgebildet haben, bildet sich die Nachnieren am Ende des Urnierenganges (Wolff'scher Gang). Dort entsteht eine Ausstülpung, welche sich nach dorsal ausbreitet. Diese wird als Uretherknospe bezeichnet. Eine Interaktion aus Zellen der Uretherknospe und umliegendem metanephrogenen Blastem (locker gebildeter Zellverband) bildet die Grundlage für die Entstehung des Metanephros (Herzlinger, 1994).

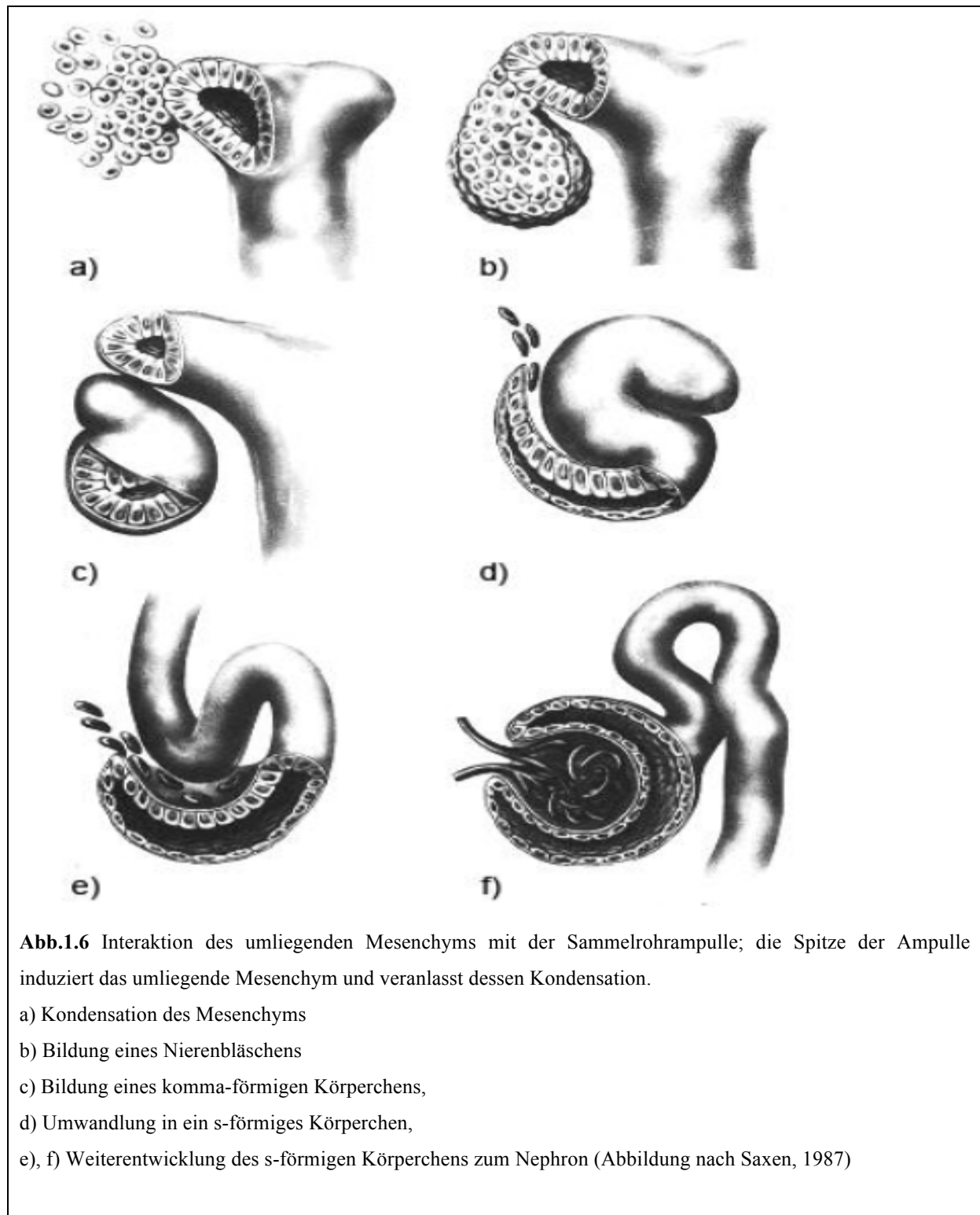




**Abb.1.5** Schematische Darstellung der Uretherknospe (dichotome Aufteilung) im metanephrogenen Blastem (Abbildung nach Saxén, 1987)

Nach Berührung von Uretherknospe und metanephrogenem Blastem kommt es zu dichotomen Verzweigungen, deren Lumina die Grundlage für die weitere Entwicklung des Sammelrohres und Nierenbeckens darstellen (Abb.1.5).

Während die Uretherknospe stetig ins metanephrogene Blastem einwächst, veranlasst sie im Bereich ihrer Spitzen das Mesenchym zur Nephronbildung (Saxen et al., 1987; Horster et al., 1997). Es handelt sich dabei um verdichtetes Zellgewebe, gefolgt von einer Umwandlung von Mesenchymzellen in Epithelzellen und der Bildung eines Nierenbläschens. Aus dem Bläschen entwickelt sich zunächst ein komma-, später ein s-förmiges Körperchen.



In der weiteren Nierenentwicklung entsteht aus dem s-förmigen Körperchen der proximale und der distale Tubulus sowie die Henle' Schleife (Saxén, 1987; Taugner und Hackenthal, 1989; Sorokin et al., 1992) (Abb.1.6). Am unteren peripheren Pol des s-Körperchens kommt es zu einer Einziehung, aus der sich im weiteren Verlauf der Entwicklung die Bowman'sche Kapsel entwickelt. In diese Vertiefung wachsen in Folge Blutgefäße ein, die zu Vasa afferentiae und Vasa efferentiae differenzieren.

## 1.6 Blutgefäßbildung

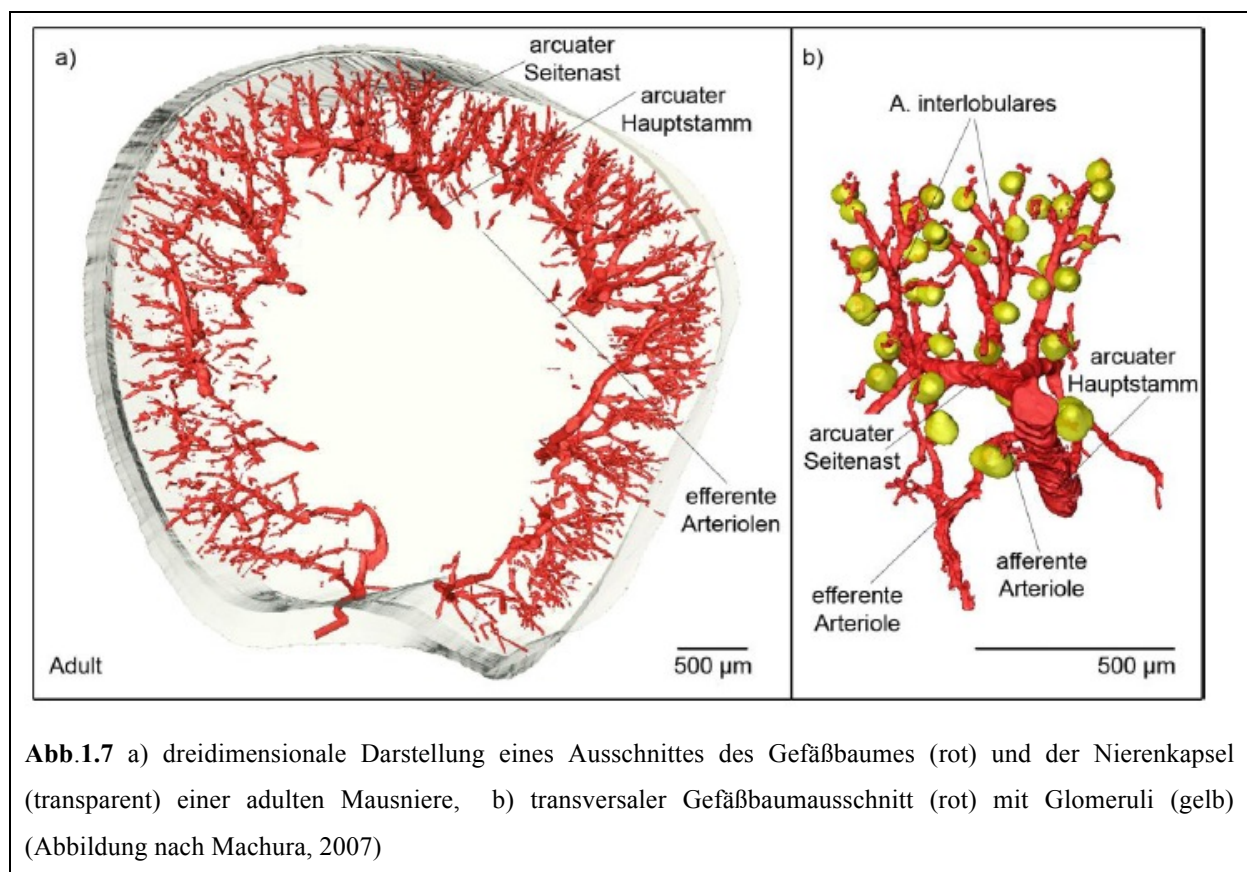
Die Bildung der Blutgefäße ist zeitlich eng mit der Nierenentwicklung verbunden (Sariola, 1991). Hierfür werden grundsätzlich zwei verschiedene Prozesse beschrieben. Zum einen handelt es sich um die Angiogenese. Hierbei sprossen Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen aus (Risau et al., 1988). Es eröffnet sich die Basalmembran, was ein Einstromen von Endothelzellen zur Folge hat. Nach deren Proliferation bilden sich schließlich röhrenähnliche Strukturen, die dann die Grundlage für neue Blutgefäße bilden (Folkman, Shing, 1992). Dem gegenüber steht die Vaskulogenese. Hier werden Blutgefäße aus sog. Angioblasten, d.h. endothelialen Vorläuferzellen, gebildet. Noden (1989) beschrieb zunächst die Bildung von Clustern und Vesikeln, die letztlich zu vaskulären Kanälchen ausdifferenzieren. Trotz dieser beider Modelle ist die Gefäßbildung noch nicht vollends aufgeklärt und gänzlich nachvollziehbar. Sowohl Angio- als auch Vaskulogenese sind für die Nierenentwicklung beschrieben. Saxen fand 1987 heraus, dass die Angiogenese in der Mäuseniere von der embryonalen Aorta ausgeht. Die Gefäße wachsen während der Nierenentwicklung entlang des Urethers ins metanephrogene Mesenchym und ziehen dann über eine löffelförmige Vertiefung in das s-förmige Körperchen, wo sie letztlich Vas afferens und efferens des Glomerulus bilden. Diese Überlegung deckt sich mit Untersuchungen von Ekblom et al. von 1982 und Sariola von 1983. Ihnen gelang es, nicht differenziertes, nicht vaskularisiertes Nierengewebe in Wachtelgewebe zu transplantieren. Nach einiger Zeit konnten sie vaskularisierte Glomeruli auffinden. Die Gefäßzellen waren dabei eindeutig dem Wirt zuordenbar.

Gomez et al. konnten 1997 ihrerseits jedoch endotheliale Vorläuferzellen aus metanephritischem Gewebe isolieren, ohne jedoch die eigentliche Gefäßbildung feststellen zu können. Ein wichtiger Faktor für die Bildung von Endothelzellen im Metanephros ist dabei VEGF (vascular endothelial growth factor) mit seinen Rezeptoren Flk 1 und Flt 1 (Mattot et al., 2002). Die Wichtigkeit dieses Faktors wird in Flt1 defizienten Mäusen deutlich. Sie sterben in der frühen Embryonalphase aufgrund des fehlenden bzw. fehlerhaften vaskulären Systems (Carmeliet et al., 1996, Ferrara et al., 1996).

Ein weiterer wichtiger Faktor scheint in diesem Zusammenhang PDGF- $\beta$  (platelet derived growth factor beta) zu sein. Er dient der Stabilisierung von neugebildeten Kapillaren durch den Einbau von Perizyten und Glattmuskelzellen (Lindahl et al., 1998). Unterstützt wird dieser Prozess von Ephrin-2 (Takahashi et al., 2002).

## 1.7 Blutgefäße in der Mäuseniere

Die A. renalis bildet die Hauptblutzufuhr der adulten Mausnieren. Sie tritt am Hilus der Niere ein und teilt sich im Sinus renalis in die beiden A. interlobares, welche ins Nierenparenchym einziehen. Aus diesen zweigen sich die arcuaten Arterien ab, die entlang der Mark-Rinden-Grenze ziehen und sowohl die Medulla als auch den Kortex versorgen. Die arcuaten Arterien lassen sich in Haupt- und Seitenäste einteilen (Abb.1.7). Im Kortex entspringen aus den arcuaten Arterien die A. interlobulares, aus welchen wiederum in unregelmäßigen Abständen die afferenten Arteriolen in die Glomeruli einziehen. Hier findet die Ultrafiltration des Blutes statt.



Um den glomerulären Filtrationsdruck konstant zu halten, zweigen aus den Kapillarschlingen die efferenten Arteriolen ab. Sie sind vom Gefäßdurchmesser wesentlich kleiner und teilen sich wiederum auf. Den Glomeruli in der Niere kommen aufgrund ihrer Lage verschiedene Aufgaben zu. Entsprechend gibt es auch zwei verschiedene Arten von afferenten Arteriolen. Gefäße aus den oberflächlichen Glomeruli bilden ein Netzwerk aus, das sich um die Tubuli im Kortex erstreckt (superfizielle afferente und efferente Arteriolen). Die in Richtung Nierenmark gelegenen Gefäße werden als juxtamedulläre afferente und efferente Arteriolen

bezeichnet. Kapillaren aus juxtamedullären Glomeruli (juxtamedulläre efferente Arteriolen) münden in die Vasa recta, die in den langen Kapillarschlingen ins Nierenmark ziehen. Von hier aus läuft das Blut über die V. interlobulares in die V. arcuatae und die V. interlobares abschließend in die Vena renalis (Junqueira et. al., 2002; Klinker und Silbernagel, 1996). Die Durchblutungsrate der Niere ist als eher unregelmäßig zu bezeichnen. Der größte Teil (80%) entfällt dabei auf den Kortex, 15% juxtamedullär und lediglich 5% auf die Medulla (Aukland, 1975).

Inwieweit die Bildung des renalen Gefäßsystems kontrolliert bzw. beeinflusst wird, ist noch nicht gänzlich geklärt. Eine Beteiligung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) ist wahrscheinlich (Gomez, 1998).

## **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

In zahlreichen Spezies findet man während der Nephrogenese differenzierte Verteilungsmuster des Angiotensin II-Rezeptors Typ I. Ist er zu Beginn der Entwicklung vorwiegend in den s-förmigen Körperchen und teilweise ausdifferenzierten Glomeruli zu finden, wird er im adulten Tier vorwiegend in großen Gefäßen angetroffen. Seine zeitliche und räumliche Expression hängt eng mit der Differenzierung und Proliferation der Zellen des extraglomerulären Mesangiums und dessen Tubuli zusammen (Kakuchi et al., 1995). Die bisherigen Ergebnisse über die Lokalisation und das Auftreten des Rezeptors beruhen dabei auf mRNA Messungen, in situ Hybridisation oder immunhistochemischen Färbungen. Mithilfe dreidimensionaler Rekonstruktion lässt sich nun erstmals Aufschluss über die genaue Verteilung und vor allem Lokalisation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors geben. Ziel der Arbeit ist, die Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in Mäusenieren in verschiedenen Entwicklungsstadien und im adulten Tier darzustellen und genauen Aufschluss über die Lage dieses Rezeptors zu geben.

Als Referenz dazu dient die Rekonstruktion des renalen Gefäßbaumes sowie des Immunsignals für Renin.

Zur Bestimmung der Lokalisation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors werden Rekonstruktionen von Nieren im Entwicklungsstadium Embryonaltag 17, Embryonaltag 19, Postpartalstadium 1, 3, 5 und von der adulten Maus angefertigt und ausgewertet. Zur genauen Darstellung werden zusätzlich immunhistochemische Kofärbungen mit verschiedenen Antikörpern gegen Zellen des juxtaglomerulären Apparates hergestellt. Verglichen werden die Ergebnisse abschließend mit immunhistochemischen Färbungen in Nieren der entsprechenden Knock-Out Mäuse.

## **2 Material und Methoden**

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Autoklav</b>	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
<b>Computer</b>	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main, Precision T 7500
<b>Eismaschine</b>	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
<b>Filtersets</b>	
<b>TRITC-Filter:</b> Anregung 533-558nm Emission 570-640nm	Filter set 43, Zeiss, Jena
<b>Cy2-Filter:</b> Anregung 450-490nm Emission 500-550nm	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
<b>Cy5-Filter:</b> Anregung 625-655nm Emission 665-715nm	Filter set 50, Zeiss, Jena
<b>Fluoreszenzlampe</b>	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
<b>Inkubationsschrank</b>	Modell B6200, Heraeus, Hanau
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
<b>Kamera</b>	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
<b>Magnetrührer</b>	MR 80, Heidolph, Schwabach
<b>Mikroskope</b>	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
<b>Mikrotom</b>	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
<b>pH-Meter</b>	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
<b>Pipetten</b>	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
<b>Schüttler</b>	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
<b>Vakuummikrozentrifuge</b>	Univapo 150 H UniEquip, Martinsried

<b><i>Gerät</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>
<b>Autoklav</b>	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
<b>Computer</b>	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main, Precision T 7500
<b>Eismaschine</b>	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
<b>Vortexgeräte</b>	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York USA REAX1, Heidolph, Schwabach
<b>Waagen</b>	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen
<b>Wärmeplatte</b>	HI 1220, Leica, Wetzlar
<b>Wärmeschrank</b>	Modell 300, Memmert, Schwabach
<b>Wärmetopf</b>	PSI, HOT POT 1.411.80/l
<b>Wasserbäder</b>	Modell W13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
<b>Zentrifugen</b>	Labofuge 400, Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

<b><i>Produkte</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>
<b>Auslaufpipetten 5ml, 10ml,</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Deckgläschen</b>	Labonord, Mönchengladbach
<b>Filter</b>	Schleicher & Schuell, Dassel
<b>Gewebe-Einbettkassetten</b>	Labonord, Mönchengladbach
<b>Handschuhe</b>	Hartmann, Heidenheim
<b>Niedrigsalzfutter 0,02% NaCl</b>	Ssniff, Soest
<b>Objektträger, Superfrost Plus</b>	Menzel-Gläser, Braunschweig
<b>Paraffin</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Parafilm</b>	American National Can, Greenwich, USA
<b>Pipettenspitzen mit und ohne Filter</b>	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
<b>Präparatekästen</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Silikonkautschuk Gießformen</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Skalpellklingen</b>	Feather, Köln



### 2.1.3 Chemikalien

<b><i>Produkt</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>
<b>Ethanol p.a.</b>	Merck, Darmstadt
<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Glycergel Mounting Medium</b>	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%</b>	Merck, Darmstadt
<b>Isopropanol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Isotone NaCl-Lösung 0,9%</b>	B. Braun, Melsungen
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O</b>	Merck, Darmstadt
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck, Darmstadt
<b>Methanol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</b>	Merck, Darmstadt
<b>NaOH 1N</b>	Merck, Darmstadt
<b>NaCl</b>	Merck, Darmstadt
<b>Paraformaldehyd</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>Pferdeserum (Horse Serum)</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>Phenol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Phenylhydrazin Hydrochlorid, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub> x HCl</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>Rinderserumalbumin (BSA)</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>Sevofluran SEVOrane</b>	Abbott, Wiesbaden
<b>Xylol</b>	Merck, Darmstadt

### 2.1.4 Antikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
chicken anti- <b>Renin</b> -IgG	polyklonal	Davids Biotech, Regensburg	1:400
mouse anti- <b>Glattmuskelaktin</b> -IgG	polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg	1:50
rabbit anti-AT <sub>1</sub> - <b>Rezeptor</b> -IgG	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, California	1:50
goat anti- <b>CD 31</b> -IgG	polyklonal	R&D Systems	1:50
goat anti- <b>CD 34</b> -IgG	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology California	1:100
goat anti- <b>Desmin</b> -IgG	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology California	1:100
goat anti- <b>Calbindin</b> -IgG	polyklonal	Swant, Bellinzona	1:200
goat anti- <b>ROMK 1</b> -IgG	polyklonal	Santa Cruz, Biotechnology California	1:50

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

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Alle im Folgenden aufgeführten Lösungen und Chemikalien wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  hergestellt.

#### Fixierlösung (Methyl-Carnoy-Lösung)

Methanol	60%
Chloroform	30%
Eisessig	10%

#### Fixierlösung für Perfusion

PBS	
Paraformaldehyd	3%

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

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	10,1 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,8 mM

#### PBS-Otto-Puffer, pH 7,4

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	10 mM
NaCl	140 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10 mM

#### Waschpuffer

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1%

#### Blockierlösung

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1%
HS	10%

### 2.1.6 Computersoftware

Zur Bildbearbeitung der jeweiligen immunhistochemischen Bilder wurde *Adobe Photo Shop CS 2* und *Image J* (Wayne Rasband, NIH, USA) verwendet. Mikroskopiert wurde mit *AxioVison Rel.4.7* der Firma Zeiss. Die dreidimensionale Rekonstruktion der jeweiligen Nieren erfolgte mit *Amira 4.1 visualization software* (VSG, USA).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere

Um Nierengewebe definierten Alters zu erhalten, wurden für die Versuche C57/Bl6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) zeitlich miteinander verpaart. Die Tiere wurden artgerecht bei 12h Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Freier Zugang zu Futter und Wasser war gewährleistet (*ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*). Um eine genaue Aussage über das Alter der Tiere treffen zu können, wurden jeweils Männchen und Weibchen für exakt 24h zusammengesetzt und das Trennen der Geschlechter als Embryonaltag 1 bewertet.

Entnommen wurden fötale Nieren am Embryonaltag 17 (E17) und 19 (E19), von Neugeborenen am ersten (pp1), dritten (pp3) und fünften Tag (pp5) nach der Geburt und von adulten Mäusen. Die embryonalen Nieren wurden umgehend nach der Entnahme in Fixierlösung gegeben. Das Nierengewebe der postpartalen und adulten Mäuse wurde nach Freilegung und Präparation retrograd perfundiert.

Grundlage für die jeweiligen Versuche waren folgende Tierstämme:

Tierstamm	genetischer Hintergrund	Herkunft
C57/Bl6	C57/Bl6	Charles River, Sulzfeld
AT <sub>1a</sub> -KO	129/SV	Michael Bader, MDC, Berlin
AT <sub>(1a+b)</sub> -KO	129/SV	Thomas Coffman, Duke University, NC, USA
AT <sub>2</sub> -KO	129/SV	Michael Bader, MDC, Berlin

### Low-Salt / Enalaprilbehandlung:

Um das RAAS der adulten Mäuse zu stimulieren, wurden sie für sieben Tage mit salzarmem Futter (0,02% NaCl) gefüttert. Das Trinkwasser der Versuchstiere wurde nach drei Tagen durch eine Lösung des ACE-Inhibitors Enalapril (0,1mg/ml entsprechend 10mg/kg<sub>BW</sub> x d) ausgewechselt und bis zum Ende des Versuches beibehalten.

### **2.2.2 Organentnahme und Fixierung des Nierengewebes**

Eine Fixierung des Gewebes soll autokatalytische Abbauprozesse stoppen; dies erhält die ursprüngliche Zellstruktur. Zudem wird das Gewebe härter und lässt sich leichter schneiden. Ausschlaggebend dafür ist eine Stabilisierung der Proteine durch Quervernetzungen der Proteinmoleküle (Hess und Sinowatz, 2000).

Um Serienschnitte anfertigen zu können, wurden die embryonalen Nieren zur Fixierung für 24h in Methyl-Carnoy-Lösung gegeben. Das Gewebe wurde bei 4°C 24h fixiert. Für eine retrograde Perfusion der postpartalen und adulten Nieren war es zunächst notwendig, die Mäuse mittels eines Anästhetikums, kombiniert aus Ketamin (80mg/kg KG i.p.) und Xylazin (16mg/kg KG i.p.) zu betäuben und anschließend das Abdomen zu öffnen. Nach Präparation der Bauchaorta wurde das Gewebe mit 3% Paraformaldehyd perfundiert. Die frisch präparierten Nieren wurden bis zur Einbettung in Paraffin in 70% Methanol bei 4°C gelagert.

### **2.2.3 Einbettung von Nierengewebe in Paraffin**

Bevor die Nieren in Paraffin überführt werden konnten, wurden sie in spezielle Gewebeeinbettkassetten gegeben und anschließend in einer Methanolreihe mit aufsteigender Konzentration (zweimal 70%, zweimal 80%, zweimal 90% und zweimal 100%, jeweils für 30 min) entwässert. Daraufhin wurde zweimal mit Isopropanol absolut bei Zimmertemperatur und einmal mit Isopropanol absolut im Wärmeschrank bei 45°C für je 30 min gespült. Anschließend wurden die Präparate in ein 1:1-Gemisch aus Isopropanol und Paraffin bei 55°C für weitere 30 min gegeben. Im Folgenden wurden die Nieren zweimal für mindestens 24h im Wärmeschrank bei 60°C inkubiert und abschließend bei Endtemperatur in heißem Paraffin in Silikonformen eingebettet. Nach dem Abkühlen bei Zimmertemperatur über Nacht konnten die gehärteten Blöcke auf Holzblöckchen aufgeklebt und mittels eines Rotationsmikrotoms 5µm dicke Paraffinschnitte angefertigt werden. Diese wurden zum Entfalten in ein 40°C warmes Wasserbad gelegt und auf Superfrost Objektträger gezogen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet. So konnten die Objektträger langfristig gelagert werden.

## 2.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Färbungen auf Basis der Immunhistochemie beruhen darauf, dass antigene Komponenten auf den Nierenschnitten mittels eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden können. Die Antigene werden hierfür zunächst mit einem primären Antikörper inkubiert, der spezifisch deren Oberfläche erkennt. Ein weiterer sekundärer Antikörper bindet nun an den Fc-Teil des ersten Antikörpers. Der zweite Antikörper ist mit einem Fluorophor gekoppelt. Mithilfe von Licht entsprechender Wellenlänge kann das Fluorophor des Antigen-Antikörper-Komplexes angeregt werden und beginnt schließlich zu leuchten.

Alle rot markierten Antikörper in der Liste *Antikörper* wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

### Entparaffinieren:

Mithilfe einer Alkoholreihe wurden die Gewebeschnitte zunächst vom Paraffin befreit:

- 2x 10 min Waschen der Präparate in Xylol
- 3x 5 min Waschen der Präparate in Isopropanol
- kurzes Schwenken in PBS

### Färbeprotokoll:

- 3x 5 min waschen der Präparate in PBS-Puffer auf dem Schüttler
- 20 min Blockieren mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (optional nur bei Embryonalnieren)
- 30 min Blockieren mit 10% HS und 1% BSA in PBS bei RT (Abschwächung unspezifischer Bindungen)
- Inkubation der 1. AK üN bei 4°C in einer geschlossenen, feuchten Kammer (Verdünnung der 1. AK in Blockierlösung)
- am folgenden Tag: 3x 5 min Waschen der Schnitte in PBS mit 1% BSA
- Inkubation der 2. AK 2h bei RT im Dunkeln (Verdünnung der 2. AK in PBS/1%BSA)
- 3x 5 min Waschen der Präparate in PBS im Dunkeln

Abschließend wurden die Präparate auf den Objektträgern mit Glycergel eingedeckelt. Der in der Liste *Antikörper* grün unterlegte Antikörper ROMK 1 wurde nach dem Waschen in PBS-Puffer zusätzlich für 40 min in Tris-EDTA Lösung bei 95°C gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit ihm gemäß Färbeprotokoll verfahren.

### 2.2.5 3D-Rekonstruktion

#### Bildaufnahme und Digitalisierung

Nierenschnitte von embryonalen, postpartalen und adulten Mäusen wurden, wie oben beschrieben, angefertigt und mittels primären und sekundären Antikörpern dreifach immunofluoreszent gegen Aktin, Renin und Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT<sub>1</sub>) angefärbt. Die Bilder wurden an einem Axiovert200M-Mikroskop mit motorisierter Objektauflage, einer Schwarz-Weiß CCD-Kamera (AxioCam MRm) und der Software Axiovision Rel.4.7 von Zeiss aufgenommen.

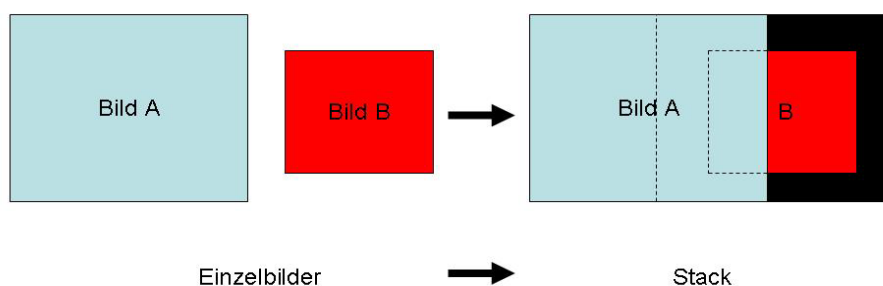
Die Serienschnitte für die Rekonstruktionen wurden mit einer 100-fachen (Objektiv 10x / Kamera 10x) Vergrößerung aufgenommen, Detailansichten mit 200- und 400-facher Vergrößerung.

Ab einer bestimmten Größe von Mäusen entsprechenden Alters konnte der Nierenschnitt nicht mehr auf ein einzelnes Bild projiziert werden. Es wurden mehrere Bilder desselben Schnittes von Axiovision mit einer Überlappung von mindestens 15% zusammengesetzt. Dieser Vorgang wird als *Stiching* bezeichnet.

Zudem verfügt das verwendete Mikroskop über diverse Fluoreszenzfilter zur Anregung der jeweiligen Fluorophore der sekundären Antikörper. Bei der Verwendung von Cy2 wurden die jeweiligen Fluoreszenzen mit Licht der Wellenlänge 450-490nm angeregt, das jeweilige Signal war bei einer Emission von 500-550nm in grün sichtbar. Entsprechend erschien ein Signal unter Verwendung des Rhodamin-(TRITC)-Filters als rot (Emission 570-640nm), wenn die Fluoreszenzen mit Licht der Wellenlänge 533-558nm angeregt wurden. Es entstanden dabei je nach Wellenlänge entsprechende 1-Kanal Bilder, die dann von der Software zu einem Gesamtbild zusammengefügt wurden. Gespeichert wurde das so entstandene Bild als *tagged image file* Datei, kurz *TIF*.

### Bildstapelerstellung mittels Image J

Um aus den verschiedenen Bildserien eine exakte Rekonstruktion der Niere mittels *Amira* herstellen zu können, war es notwendig, die Aufnahmen zunächst auf Bildstapel gleicher Größe und Abmessung, den sogenannten *stacks*, zu bringen. Kleineren Bildern im *stack* wurde dabei ein schwarzer Rahmen angefügt (Abb.2.1). Die Bilderabfolge wurde als sogenannte *Image Sequence* gespeichert.



**Abb. 2.1** Schematische Darstellung der Bildung eines Stacks

Nach der Entstehung einer entsprechenden *Image Sequence* wurde der Gesamtstapel durch die *RGB.Split*-Funktion des Image J Programms in drei Stapel für die jeweiligen Einzelsignale zerlegt, um in *Amira* durch die Grauwertabstufung der Signale in den einzelnen Stapeln eine exakte Rekonstruktion erstellen zu können.

### 3D-Rekonstruktion mit Amira

Die erstellten Bildstapel der einzelnen Signale wurden in die *Amira 4.1.2 Visualization Software* importiert. Um die zweidimensionalen Bildstapel in eine dreidimensionale Grafik umzuwandeln, musste die tatsächliche Bildgröße (in  $\mu\text{m}$ ) der Größe der jeweiligen Pixel angepasst werden. Dieses Verhältnis ist abhängig von Kamera und Objektiv. Bei einer zehnfachen Vergrößerung entspricht ein Pixel einer Abmessung von  $1 \times 1 \mu\text{m}$ . Somit ließ sich mithilfe der Ausdehnung des *stacks* (entspricht der Länge und Breite der jeweiligen Bilder), der Bilderanzahl und der Schichtdicke des jeweiligen Gewebes (in diesem Fall handelte es sich um  $5 \mu\text{m}$  dicke Schnitte) die maximale Ausdehnung des Datensatzes in allen Raumebenen festlegen. Dieser wird als *BoundingBox* bezeichnet. In diesem Zusammenhang wird auch nicht mehr von Pixel, sondern von Voxel gesprochen. Ein Voxel entspricht somit dem Wert  $1 \times 1 \times 5 \mu\text{m}$ . Für eine genaue Rekonstruktion der Niere ist es notwendig, dass die Schnitte exakt



übereinanderliegen. Hierfür wurde mithilfe des *Glattmuskelaktin*-Bildstapels Aufnahme für Aufnahme exakt zueinander in allen Orientierungen ausgerichtet. Der *Aktin*-Bildstapel ist dafür gut geeignet, da er aufgrund der zahlreichen aktinpositiven Bereiche einen passenden Hintergrund bietet, die Schnitte genau übereinander zu projizieren. Dieser Bildstapel diente nun als Referenz zum Ausrichten des *Renin*- und *AT<sub>I</sub>*-Bildstapels. Dieser Schritt geschah in der Regel automatisch, wurde jedoch auf eventuelle Verzerrungen in den jeweiligen Aufnahmen überprüft und gegebenenfalls von Hand korrigiert.

Nach dem Ausrichten der Bilder mussten die Daten segmentiert (gelabelt) werden. Dafür standen verschiedene Tools, wie z.B. *Magic Wand* oder *Brush* zum Markieren der einzelnen Signale oder *Fill Holes* zum Füllen von Löchern in den einzelnen Markierungen zur Verfügung. Erschien die Rekonstruktion als zu kantig, gab es die Möglichkeit mithilfe von *Smooth Labels* die Oberfläche zu glätten. War ein Schnitt unvollständig oder fehlte gänzlich, gab es die Möglichkeit, mittels des Tools *Interpolate* das fehlende Signal ergänzen zu lassen. Markierte Signale werden als *Labels* bezeichnet, alle Signale aus einem 1-Kanalbildstapel als *Labelfield*. Grundlage für die Markierungen waren die unterschiedlichen Graustufen der einzelnen Signale. Diese wurden mit dem Tool *Surface Gen* in eine dreidimensionale Oberfläche umgewandelt. Aus dem *Aktin*-Labelfield entstand auf diese Weise eine 3D-Rekonstruktion des Nierengefäßbaumes. Generierte man die Oberflächen für die Signale des *Renin* und *AT<sub>I</sub>*-Bildstapels dazu, ließen sich Aussagen über deren Häufigkeit, Verteilung und Lagebeziehung in den jeweiligen Entwicklungsstadien treffen. Der *Aktin*-Datensatz bot zudem einen weiteren Vorteil; durch die Eigenfluoreszenz des Gewebes ließen sich Strukturen wie Glomeruli, die Nierenkapsel oder auch der Urether markieren und rekonstruieren. Hierfür wurden die Labels als separates *Labelfield* in einem weiteren Material gespeichert. Jeder so entstandenen Oberfläche konnten eine entsprechende Farbe und Transparenz zugeordnet werden, was eine später folgende eingehende Auswertung der Daten erleichtern sollte.

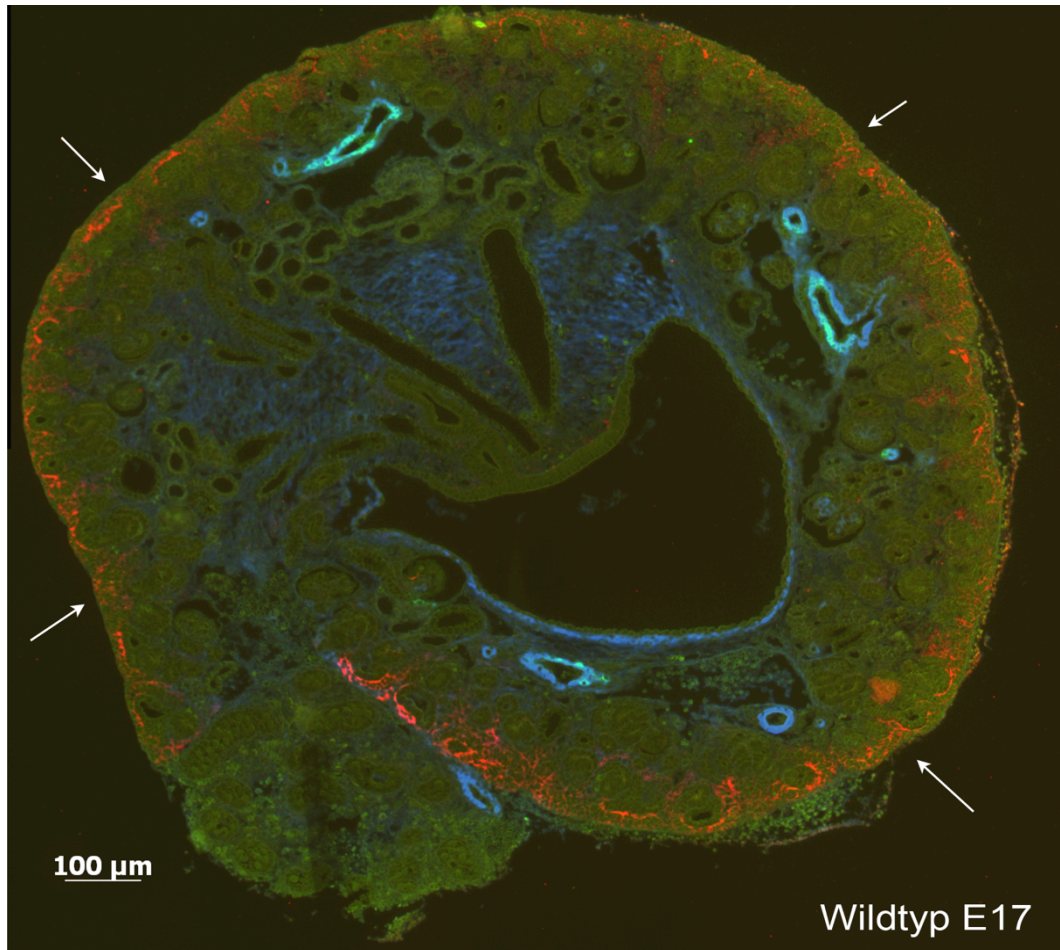
### **3 Ergebnisse**

### **3.1 Lokalisation des Angiotensin II-Rezeptors Typ I (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) in Mäusenieren während der Entwicklung**

Um die Lokalisation und die Expression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors räumlich und zeitlich genauer bestimmen zu können, wurden immunhistochemische Präparate von Mäusenieren herangezogen und daraus 3D-Rekonstruktionen verschiedener Entwicklungsstadien angefertigt. Verwendet wurde ein kommerziell angebotener Antikörper gegen AT<sub>1</sub> der Firma Santa Cruz (sc-1173). Zur besseren Orientierung wurden die Präparate neben AT<sub>1</sub> auch mit einem Antikörper gegen Glattnuskelaktin (Marker für Gefäße) und Renin angefärbt. Die 3D-Rekonstruktion des renalen Gefäßbaumes und die räumliche Darstellung von Renin bildeten die Grundlage des Vergleiches. Alle Antikörper wurden zusammen auf die jeweiligen Nierenserienschnitte aufgetragen und anschließend als Fluoreszenzsignal detektiert. Mithilfe der Rekonstruktionssoftware *Amira* konnten die einzelnen Signale zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden, aus welchem sich Rückschlüsse auf die Verteilung und Häufigkeit während der Entwicklung schließen ließen. Untersucht wurden Mausnieren am Embryonaltag 17 und 19, Nieren von Mäusen am Tag 1, 3, 5 nach der Geburt sowie Nieren von adulten Tieren. Um sich einen genaueren Überblick verschaffen zu können, wurden zudem Rekonstruktionen einzelner Arterien in den jeweiligen Entwicklungsstadien erstellt. Für Einblicke auf zellulärer Ebene dienten histologische Färbungen. Für die Rekonstruktion wurden C57/Bl6 Wildtypiere verwendet. Außerdem wurde auf AT<sub>1</sub>-KO zurückgegriffen, um eine genauere Aussage über die Spezifität des Antikörpers treffen zu können.

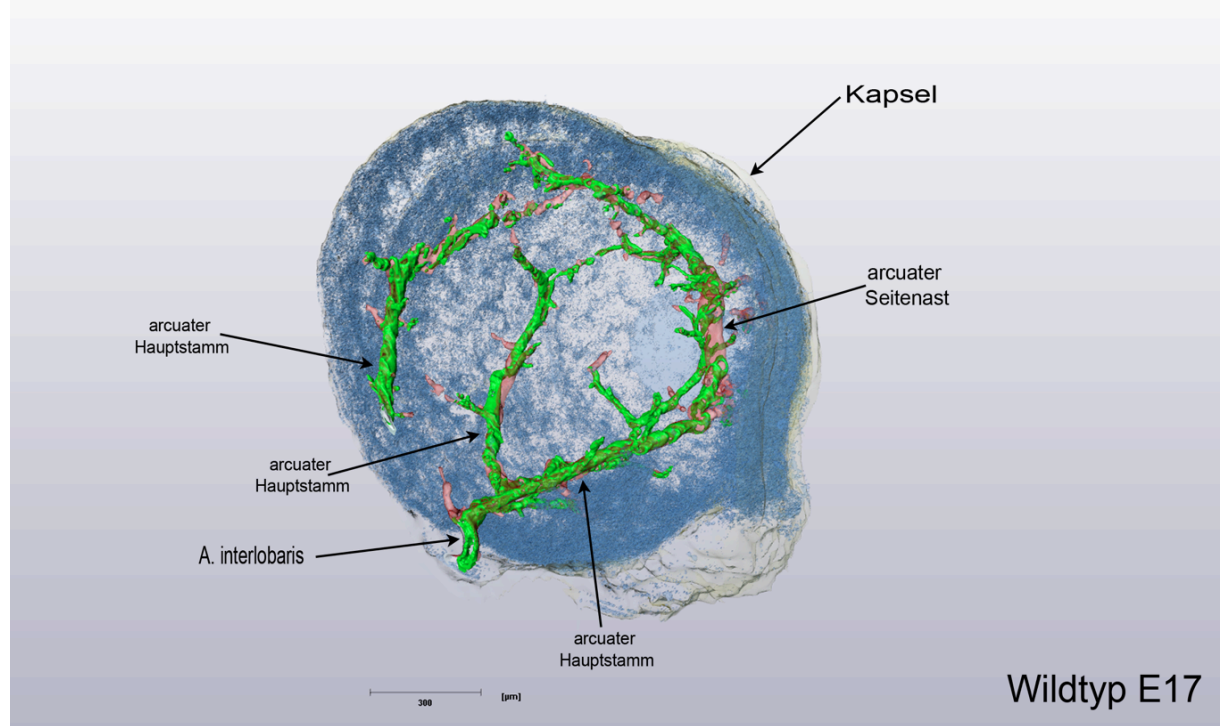
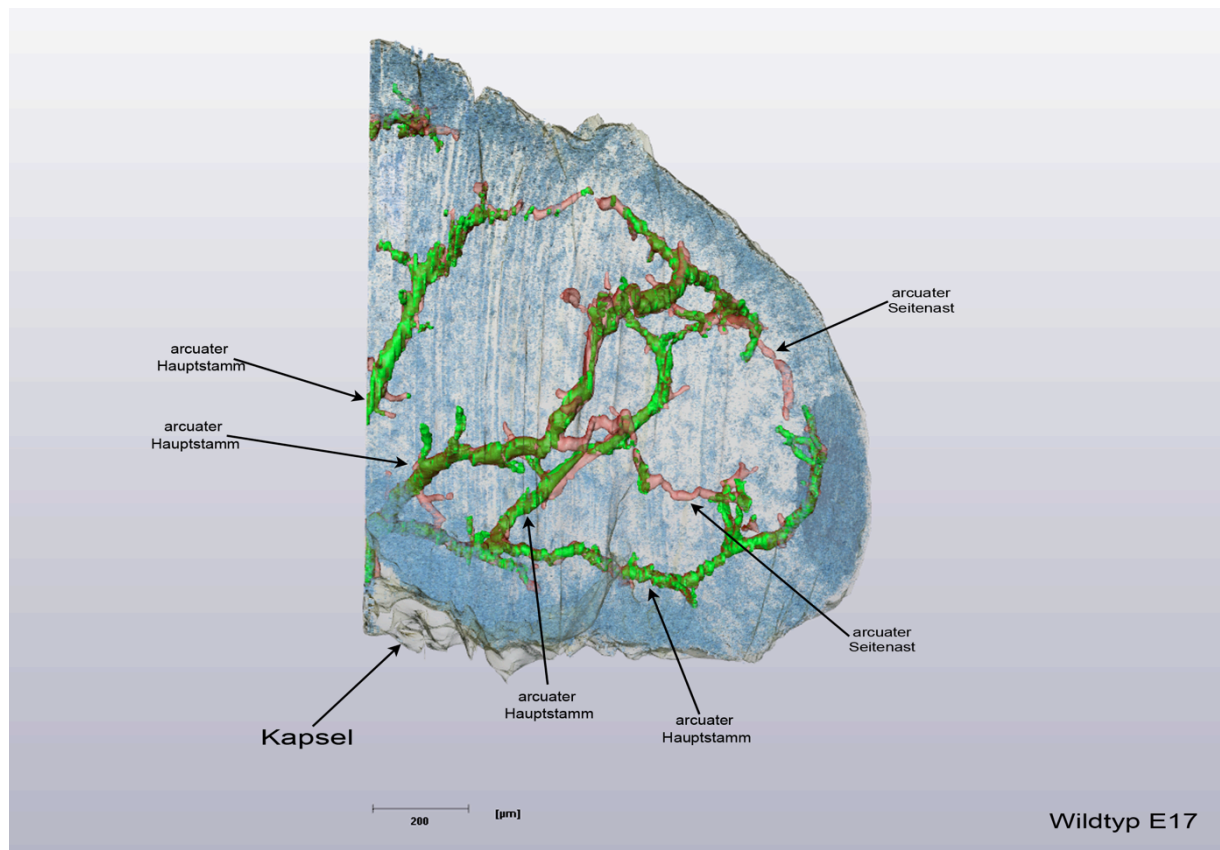
### 3.1.1 Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors am Embryonaltag 17

Wie in Abbildung 3.1 zu sehen, ist in der Niere am Embryonaltag 17 (E17) eine deutliche Expression des Signals unterhalb der Kapsel in der sogenannten nephrogenen Zone erkennbar (s.h. Pfeile).



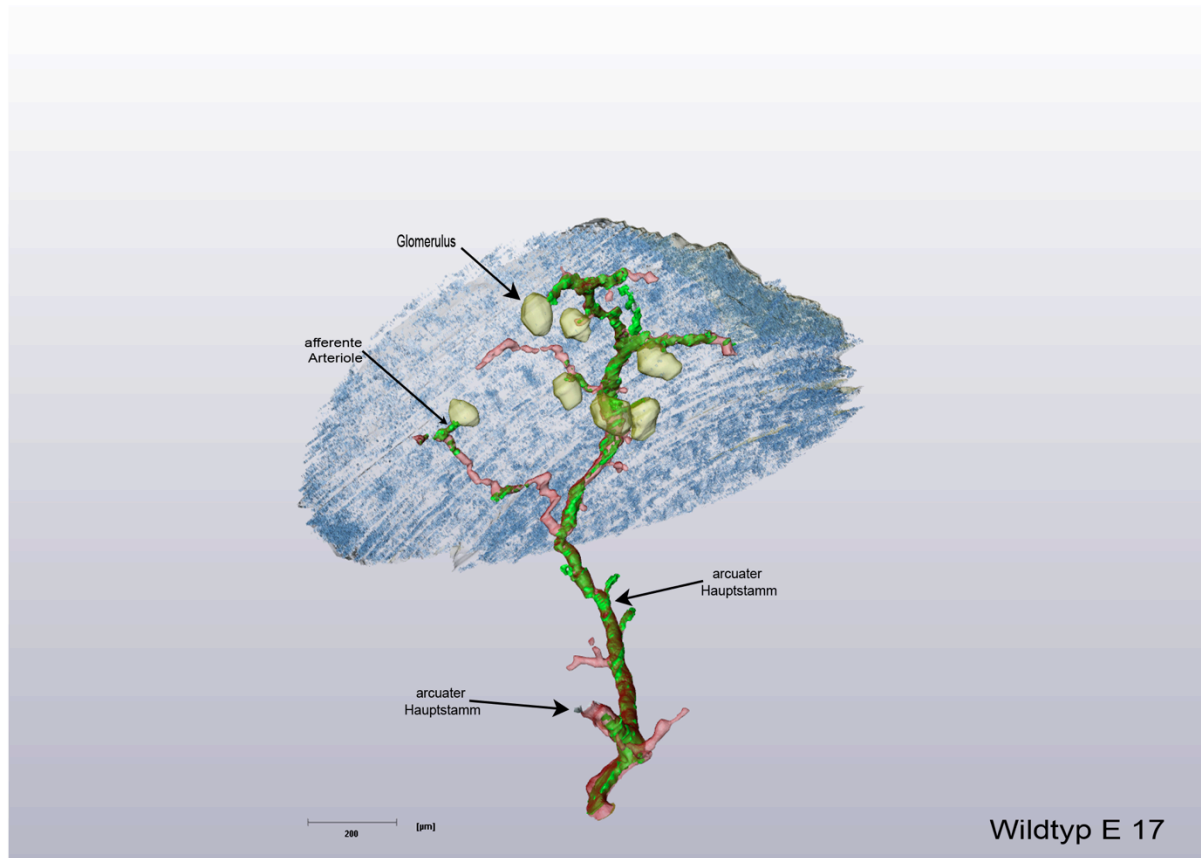
**Abb.3.1** Immunfluoreszenzdreifachfärbung an Paraffinschnitten einer Niere einer E17-Wildtypmaus. Rot, mit Pfeilen markiert, das Signal des AT<sub>1</sub>-Rezeptors beschränkt auf die nephrogene Zone. Blau dargestellt ist Glattmuskelaktin, grün Renin. Die reninbildenden Zellen liegen in der Mediaschicht der Arterien. Somit kommt es in der Färbung zu einer Überlagerung der Signale blau und grün, beide erscheinen türkis. Die Größe des Maßstabsbalkens beträgt 100µm.

In der dreidimensionalen Rekonstruktion (Abb.3.2) zeigt sich deutlich, dass sich der Rezeptor am E17 ausschließlich in der nephrogenen Zone unterhalb der Nierenkapsel und weder im Nierenkortex noch am Gefäßbaum oder den Glomeruli exprimiert wird.



**Abb.3.2** 3D-Modell einer Mausniere am Embryonaltag 17 in der Seitenansicht (oben, Maßstab=200µm) und der Frontalansicht (unten, Maßstab=300µm). Rekonstruiert wurden der Gefäßbaum (rot) mit dazugehörigem Renin (grün) und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor (blau). Erkennbar ist eine Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors ausschließlich innerhalb der nephrogenen Zone.

Die Rekonstruktion einer einzelnen Arteria arcuata verdeutlicht, dass sich die Verteilung des  $AT_1$ -Rezeptors in diesem Entwicklungsstadium auf die nephrogene Zone beschränkt (Abb.3.3). Renin erstreckt sich in diesem Stadium nahezu über den gesamten Gefäßbaum, eine Kolo­kalisation sowohl zwischen Renin und  $AT_1$  als auch zwischen Aktin und  $AT_1$  ist nicht erkennbar.

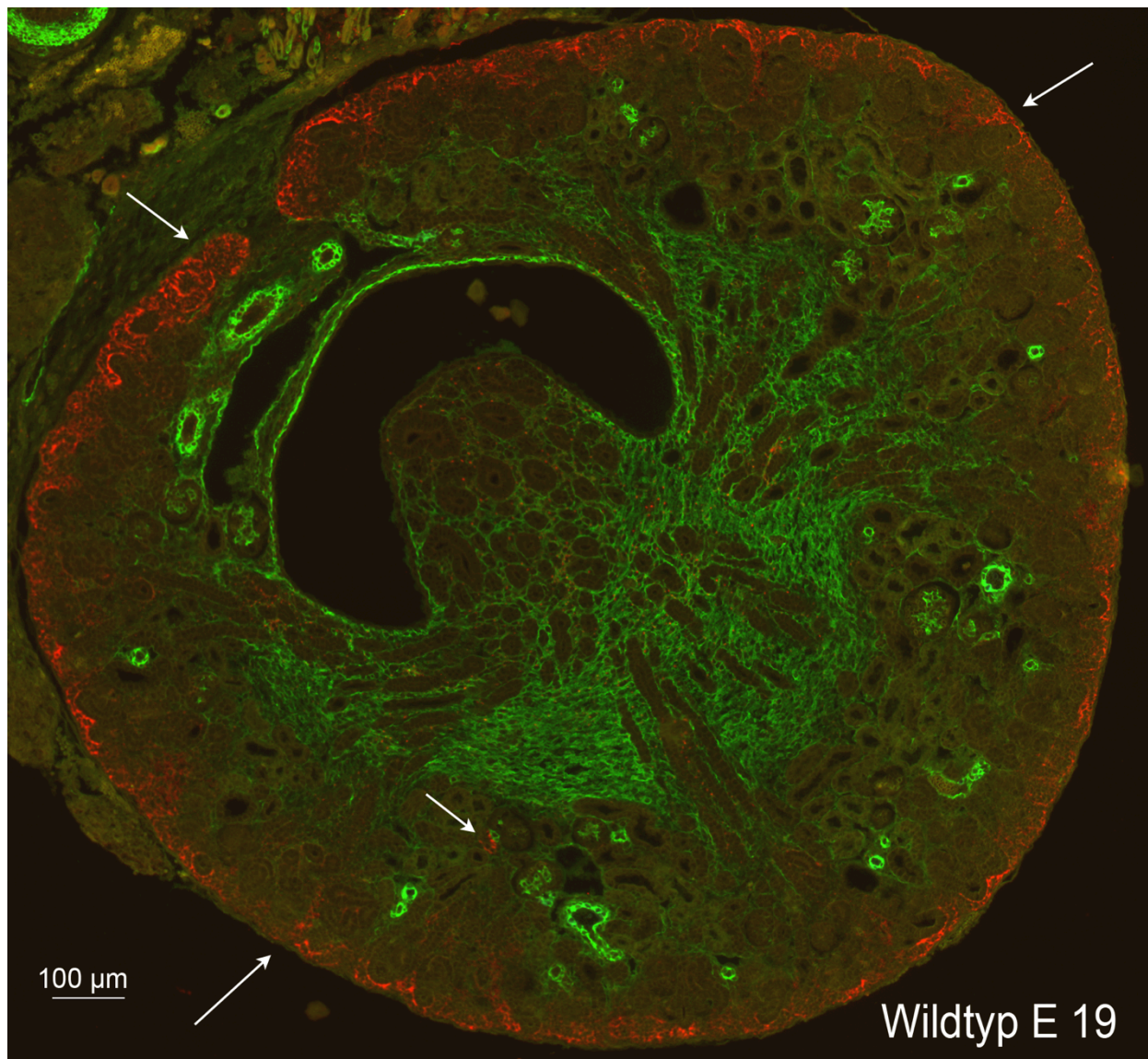


**Abb.3.3** Teilrekonstruktion einer Arteria arcuata (rot) mit dazugehörigen Glomeruli (gelb), grün dargestellt ist Renin. Der  $AT_1$ -Rezeptor (blau) ist lediglich über dem Gefäßbaum in der nephrogenen Zone erkennbar.



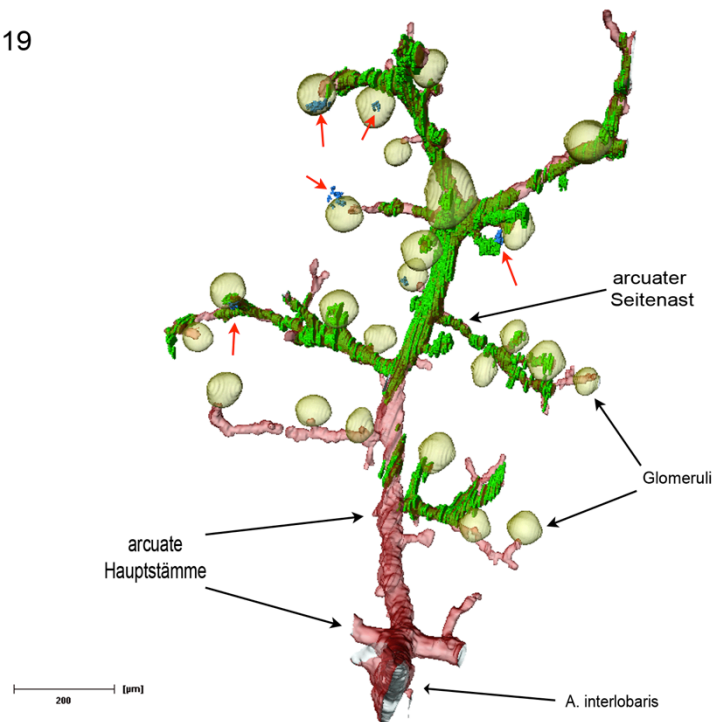
### 3.1.2 Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors am Embryonaltag 19

Am Embryonaltag 19 (E19) findet man das Signal des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, wie schon zuvor am Embryonaltag 17, ebenfalls in der nephrogenen Zone (Abb.3.4, randständige Pfeile). Zusätzlich treten die Signale in den Tubuli distal gelegener Glomeruli der arcuaten Seitenäste auf (Abb.3.5). Wie am Embryonaltag 17 erstreckt sich Renin auch an Tag 19 nahezu über den gesamten Gefäßbaum. Eine Kolokalisation zwischen Renin und AT<sub>1</sub> bzw. Aktin und AT<sub>1</sub> ist aber auch in diesem Entwicklungsstadium nicht feststellbar.

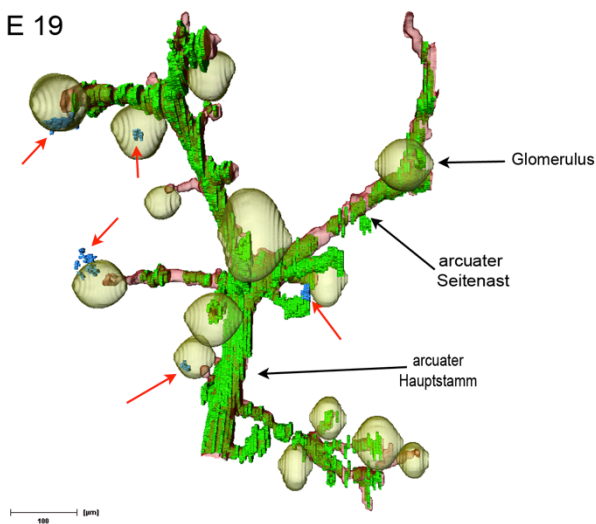


**Abb.3.4** Immunfluoreszenzdoppelfärbung histologischer Nierenschnitte einer Wildtyp E19-Maus. Erkennbar sind Immunreaktionen von Glattmuskelaktin in grün und des AT<sub>1</sub>-Rezeptor in rot. Neben Signalen in der nephrogenen Zone (randständige Pfeile) sind in diesem Stadium Reaktionen an Tubuli im Kortex erkennbar. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Wildtyp E 19



Wildtyp E 19

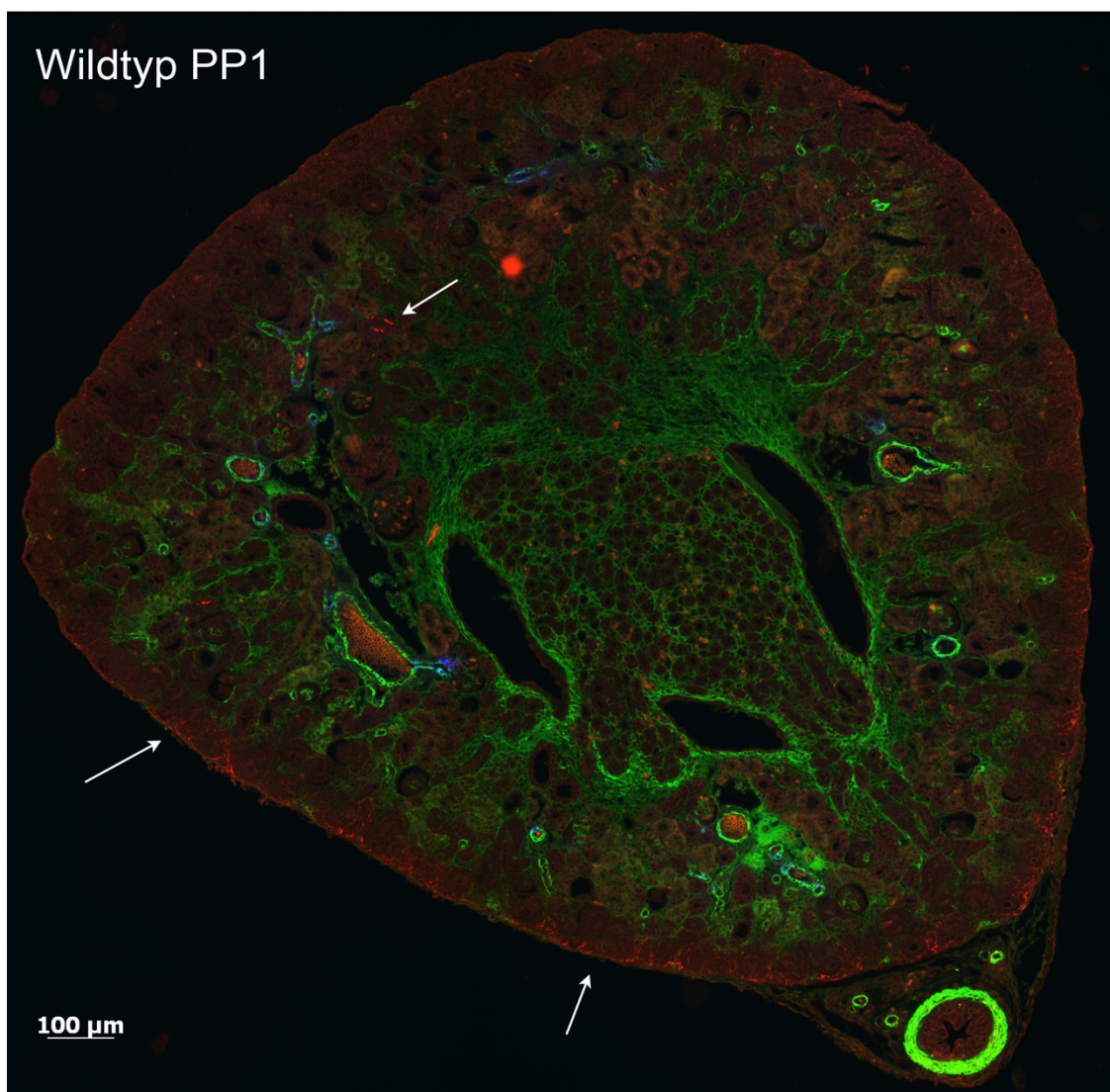


**Abb.3.5** 3D-Teilrekonstruktion eines arcuaten Astes (rot) am Embryonaltag 19. Vereinzelt ist der AT<sub>1</sub>-Rezeptor (blau) in Tubuli der Glomeruli arcuater Seitenäste nachweisbar (rote Pfeile). Maßstab=200μm oberes Bild bzw. 100 μm unten. Die Reninexpression ist grün dargestellt. Zur besseren Übersicht wurde auf die Darstellung des AT<sub>1</sub>-Rezeptorsignals in der nephrogenen Zone verzichtet.

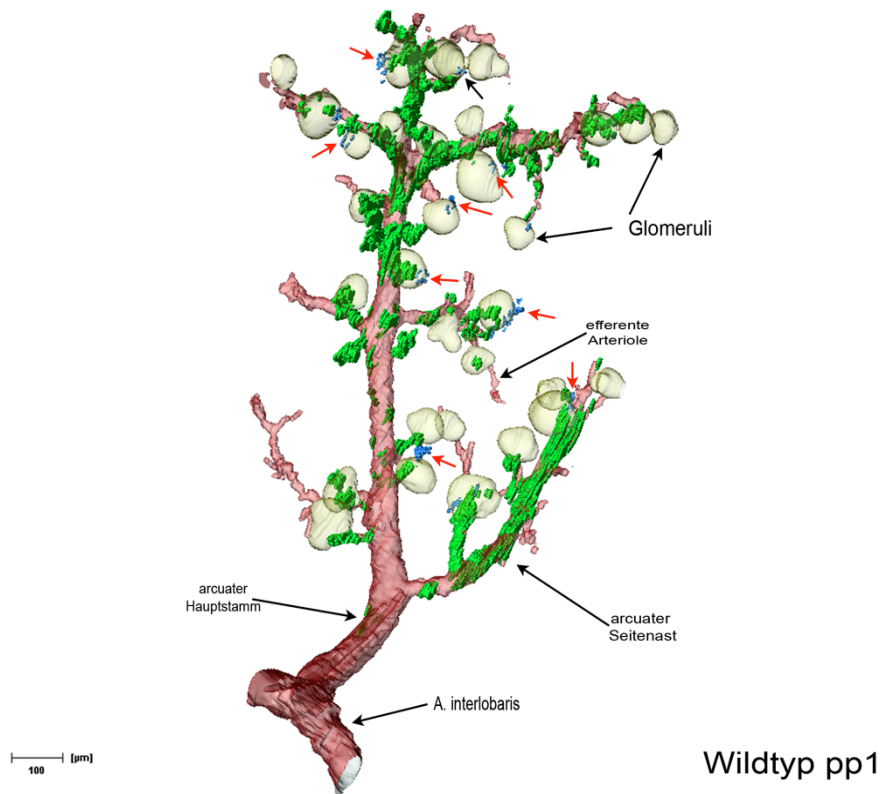


### 3.1.3 Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors am Tag 1 nach der Geburt (pp1)

Im Entwicklungsstadium pp1 befindet sich der AT<sub>1</sub>-Rezeptor in der nephrogenen Zone. Im Vergleich zum Embryonaltag 19 zeigt sich aber eine deutlich schwächer ausgeprägte AT<sub>1</sub>-Rezeptorexpression (Abb.3.6). Wurde der Rezeptor im Entwicklungsstadium E19 überwiegend in Tubuli distal gelegener Glomeruli exprimiert, ist er in pp1 auch proximal vorzufinden. Neben einer Veränderung der Lokalisation ist auch ein deutlicher Anstieg der AT<sub>1</sub>-Rezeptorexpression im Kortex feststellbar (Abb.3.7). Auch in diesem Stadium kommt es zu keiner Kolo­kalisation zwischen Renin und AT<sub>1</sub> bzw. Aktin und AT<sub>1</sub>.



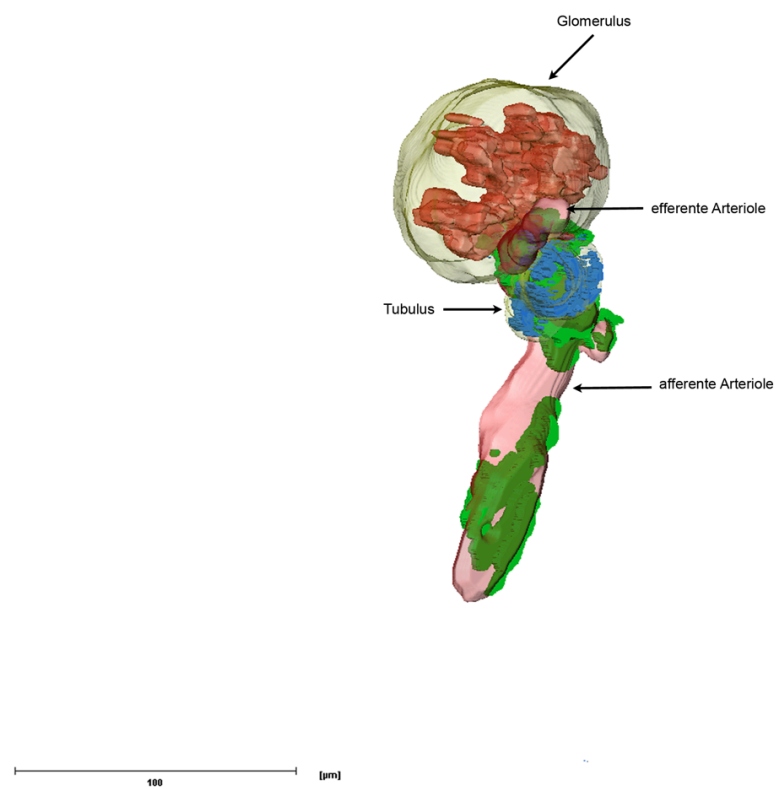
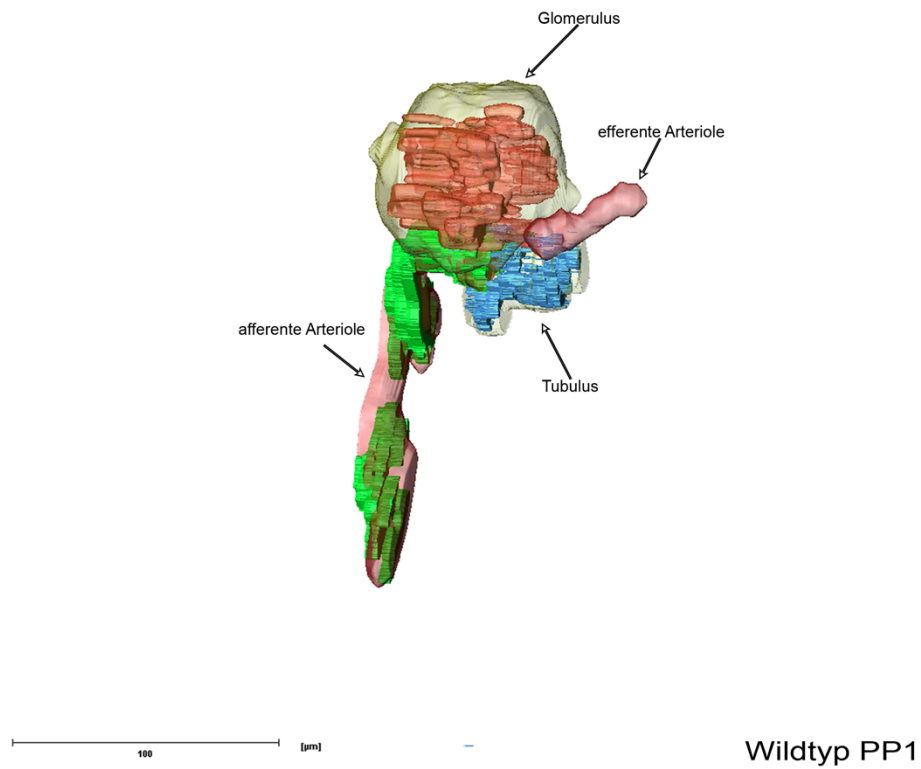
**Abb.3.6** Immunfluoreszenzdreifachfärbung eines Nierenschnittes einer pp1-Wildtypmaus. Hundertfach vergrößert aufgenommen. Die Abbildung zeigt Immunreaktionen von Glattmuskelaktin in grün und Renin in blau. Die randständige Reaktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors ist hierbei schwächer ausgeprägt als im Stadium E19. Auch im Nierenkortex sind Signale zu erkennen (siehe Pfeile).



**Abb.3.7** 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumschnitts (rot) mit dazugehörigen Glomeruli (gelb) und Reninexpression (grün). Rote Pfeile zeigen die Expression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors (blau). Auf die Darstellung der AT<sub>1</sub>-Rezeptorexpression in der nephrogenen Zone wird hier verzichtet.

### 3.1.3.1 3D-Detailansicht eines Glomerulus im Entwicklungsstadium pp1

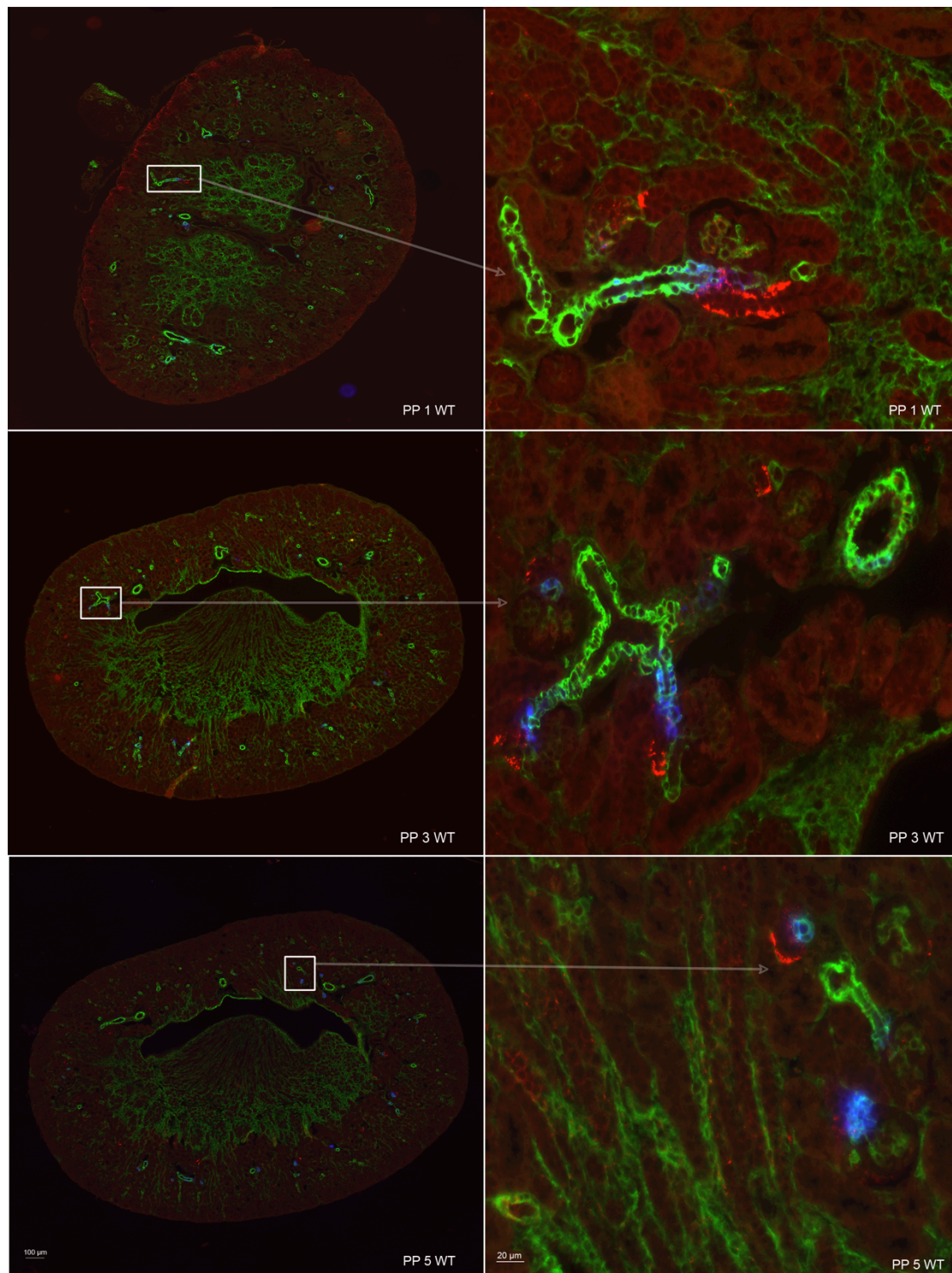
In der 3D-Ansicht des rekonstruierten Glomerulus zeigt sich, dass der AT<sub>1</sub>-Rezeptor zirkulär um den sich in der juxtaglomerulären Zone befindlichen Tubulus exprimiert wird (Abb.3.8). Die afferente und die efferente Arteriole sind dabei nicht betroffen. Aus dem Tubulus erstreckt sich der Rezeptor zudem in das extraglomeruläre Mesangium des Glomerulus. Eine Kolokalisation mit Renin ist in der Rekonstruktion nicht erkennbar.



**Abb.3.8** 3D-Rekonstruktion eines Glomerulus (gelb) mit zugehöriger afferenter und efferenter Arteriole und Kapillaren (rot). Der  $AT_1$ -Rezeptor ist zirkulär über den kompletten juxtaglomerulären Tubulus verteilt. Es besteht keine Assoziation zu den Reninzellen (grün) am Vas afferens. Maßstab=100μm.



### 3.1.4 Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors am Tag 3 und 5 nach der Geburt (pp3/ pp5)



**Abb.3.9** Immunfluoreszenzdreifachfärbung von Nierengewebeschnitten von Nieren 3 und 5 Tage alter Wildtypmäuse. Die linke Spalte zeigt Übersichtsaufnahmen in einer hundertfachen Vergrößerung, die rechte in einer vierhundertfachen Vergrößerung. Zu sehen sind Immunreaktionen von Glattmuskelaktin in grün, Renin in blau und AT<sub>1</sub>-Rezeptor in rot. Es besteht keine Überlagerung der AT<sub>1</sub>- mit den Aktin- oder Reninsignalen.

### Postpartaler Tag 3

Betrachtet man zunächst die Übersichtsaufnahme in Abb.3.9 (hundertfache Vergrößerung), so fällt auf, dass am dritten Tag nach der Geburt keine Immunreaktion für den AT<sub>1</sub>-Rezeptor in der nephrogenen Zone vorhanden ist. Lediglich im Nierenkortex finden sich Reaktionen, die vergleichbar sind mit denjenigen am ersten Tag nach der Geburt. Auf zellulärer Ebene betrachtet, ist festzuhalten, dass sich die Immunreaktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors innerhalb der Tubuluszellen vor allem auf deren basalen Pol beschränkt, sich aber gleichmäßig auf alle Zellen innerhalb eines Tubulus verteilt (vierhundertfache Vergrößerung).

### Postpartaler Tag 5

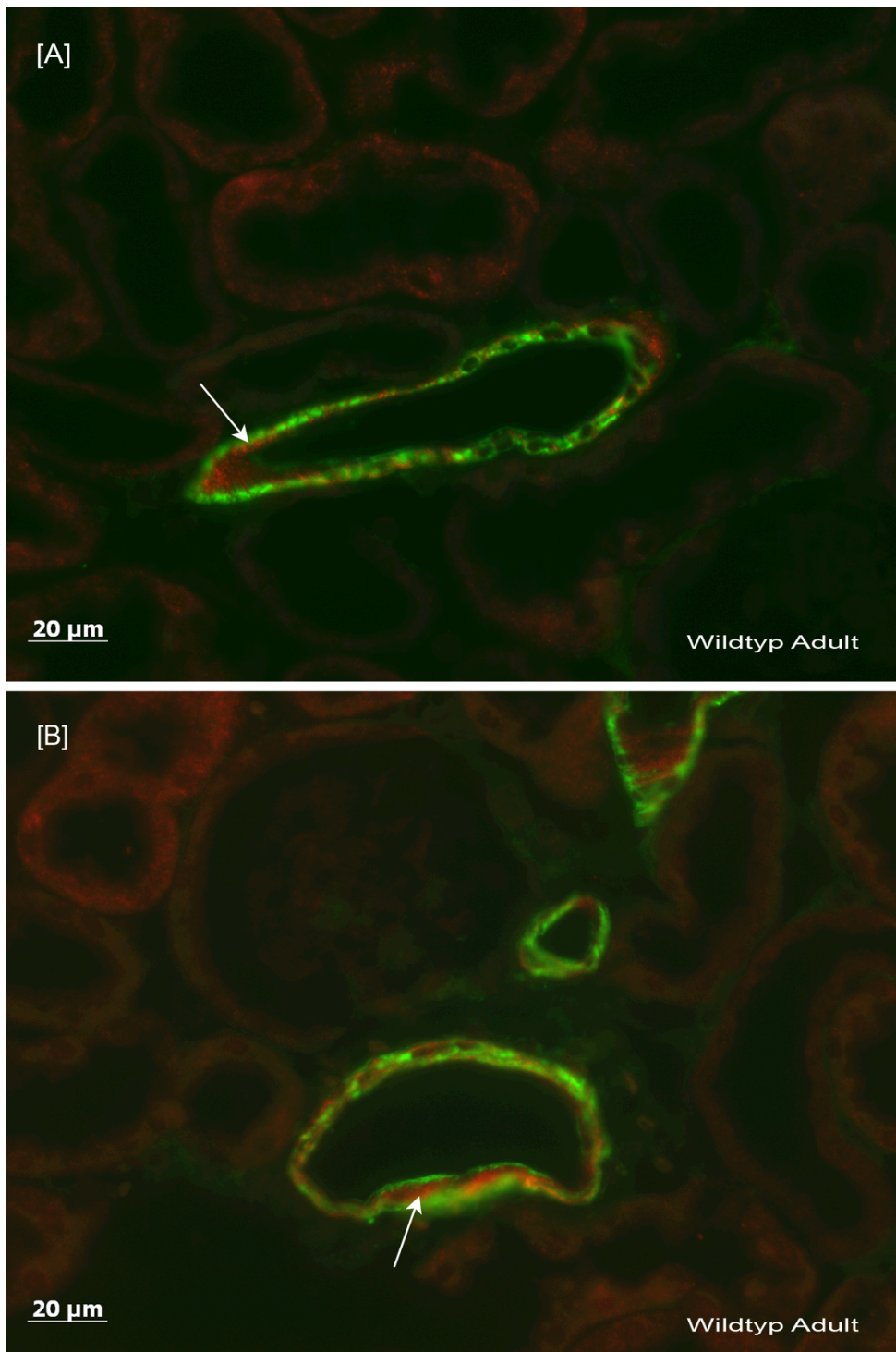
Im Vergleich zu pp3 gibt es am postpartalen Tag 5 keine Unterschiede, was die Lokalisation und Häufigkeit des AT<sub>1</sub>-Rezeptors betrifft. Es findet sich keine Immunreaktion in der nephrogenen Zone (histologische Aufnahme in hundertfacher Vergrößerung). Die Signale im Kortex liegen in den glomerulusnahen Tubuli (vierhundertfache Vergrößerung).

In der Auswertung der histologischen Bilder ist, wie bereits in den Entwicklungsstadien zuvor, keine Kolo-kalisation der Signale von AT<sub>1</sub> und Renin oder AT<sub>1</sub> und Aktin erkennbar.

### **3.1.5 Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors im adulten Tier**

In der adulten Wildtypmaus ist im Vergleich zu den Entwicklungsstadien keine AT<sub>1</sub>-Expression in den Tubuli feststellbar. War der Rezeptor dort vor allem in der juxtaglomerulären Zone vorzufinden, wird er in der ausgewachsenen Maus ausschließlich in großen Gefäßen exprimiert. Dabei ist festzustellen, dass es an den Arteriae arcuatae zu einer stärkeren Rezeptoranreicherung kommt. Geht man über die Arteriae interlobulares weiter zu den afferenten Arteriolen, so ist ein kontinuierlicher Rückgang des Rezeptors erkennbar (Abb.3.10 [A]). In den Gefäßen rund um die juxtaglomeruläre Zone sind keine Signale des AT<sub>1</sub>-Rezeptors sichtbar. In den afferenten Arteriolen ist lediglich eine Anhäufung reninbildender Zellen auszumachen (Abb.3.10 [B]). Die Verteilung des Rezeptors verläuft ohne erkennbares Muster zirkulär um die jeweiligen Gefäße. Desweiteren wurde, um eine entsprechende Kolo-kalisierung zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor und Renin zu untersuchen, ein Wildtyp mit stimuliertem RAAS verwendet.

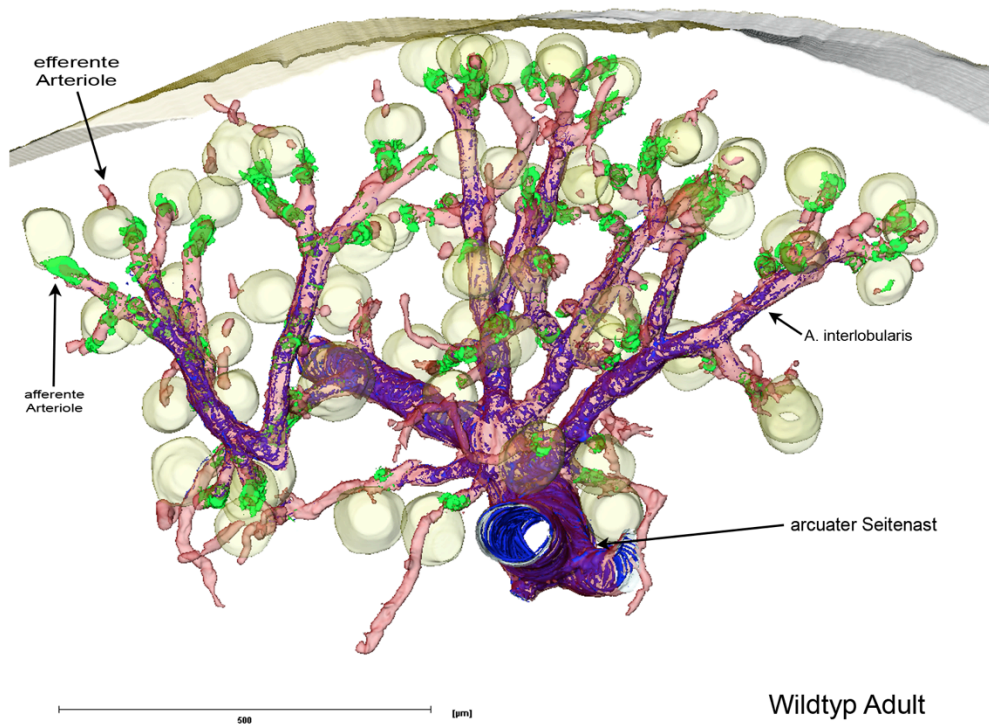
Auf zellulärer Ebene betrachtet findet man den AT<sub>1</sub>-Rezeptor in der Media der Blutgefäße.



**Abb.3.10** Immunfluoreszenzdoppelfärbung eines Nierengewebeschnitts einer adulten Maus. Auf den Abbildungen sind Immunnreaktionen für Glattmuskelaktin in grün und des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in rot zu erkennen. Der Rezeptor ist vor allem in großen Gefäßen nachweisbar (Pfeil). Kleinere, glomerulusnahe Gefäße dagegen sind frei von AT<sub>1</sub>-Rezeptorsignalen.

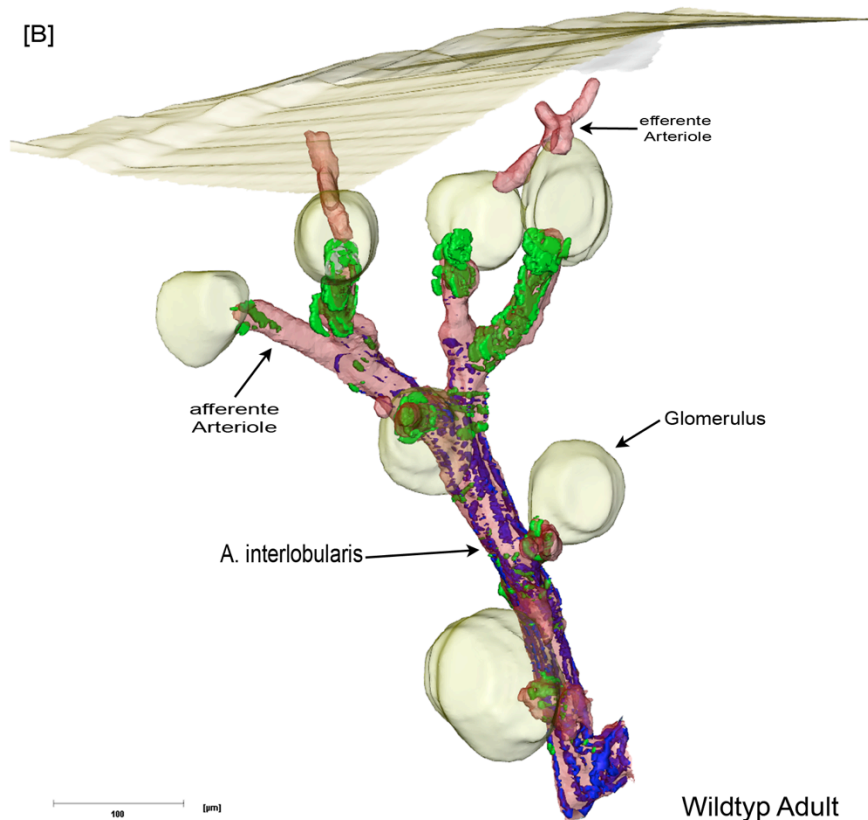


[A]



Wildtyp Adult

[B]



Wildtyp Adult

**Abb.3.11** 3D-Teilrekonstruktion eines Gefäßbaumes (rot) einer adulten Maus mit stimuliertem RAAS mit dazugehörigen Glomeruli (gelb) und Reninexpression (grün). Die  $AT_1$ -Rezeptorexpression (blau) ist vor allem in den großen Gefäßen (Arteriae arcuatae und Arteriae interlobularis) deutlich erkennbar.

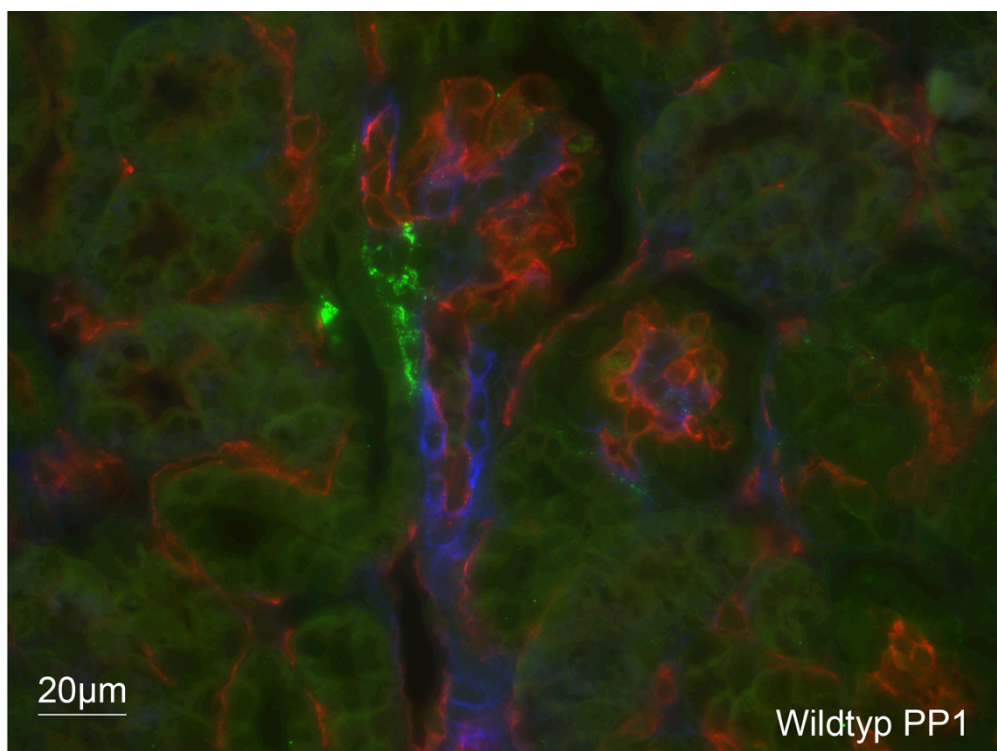
## 3.2 Lokalisationsbestimmung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors

Im Folgenden sollte eine genaue Bestimmung der Lokalisation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors im Glomerulus und im umliegenden Tubulussystem erfolgen. Dazu wurden Kofärbungen mit entsprechenden Markern für die jeweiligen Nierenabschnitte angefertigt.

### 3.2.1 Lokalisationsbestimmung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors im Glomerulus

#### CD 31 als Marker für das Glomerulusendothel

In Abb.3.11 wurde CD 31 als Marker für das glomeruläre Endothel (rot) verwendet. Das Signal des AT<sub>1</sub>-Rezeptors (grün) überlagert sich nicht mit dem Signal des Glomerulusendothels (rot).

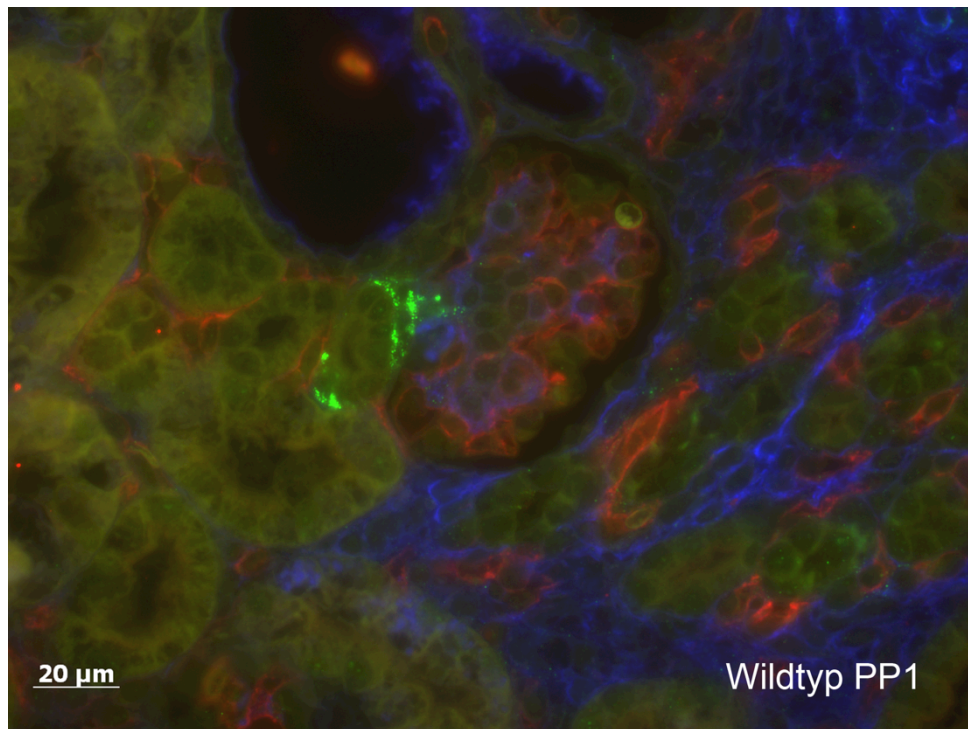


**Abb.3.12** Immunfluoreszenzdreifachfärbung einer Mausnieren im Stadium pp1. Zu sehen sind Immunreaktionen für Glattmuskelaktin in blau, AT<sub>1</sub>-Rezeptor in grün und Glomerulusendothel in rot. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.



### CD 34 als Marker für das Glomerulusendothel

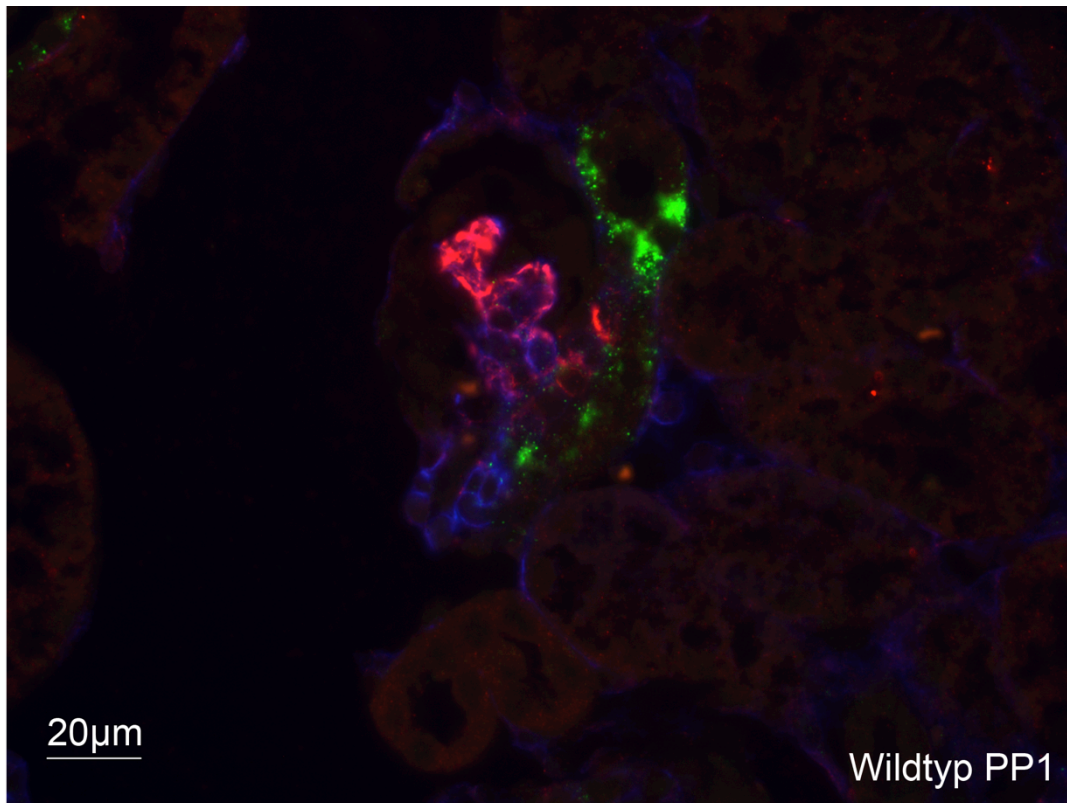
In Abb.3.13 wurde CD 34 als Marker für das Endothel des Glomerulus (rot) verwendet. Das Signal des AT<sub>1</sub>-Rezeptors (grün) überlagert sich nicht mit dem des Glomerulusendothels (rot). Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor (grün) befindet sich am basalen Pol der Tubuluszellen und zieht von dort aus in den Glomerulus. Der Versuch wurde in Nierengewebe einer ein Tag alten Maus durchgeführt.



**Abb.3.13** Immunfluoreszenzdreifachfärbung einer Mausniere im Entwicklungsstadium pp1. Abgebildet sind Immunreaktionen für den AT<sub>1</sub>-Rezeptor in grün, Endothel in rot und Glattmuskelaktin in blau. Es kommt zu keinerlei Überschneidung der Signale für Endothel und des AT<sub>1</sub>-Rezeptors. Maßstab=20µm.

### Desmin als Marker für die Epithelzellen des Glomerulus

In Abb.3.14 wurde die Koloalisation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors mit den Epithelzellen des Glomerulus untersucht. Eine Assoziation der Epithelzellen (rot) mit dem Rezeptor (grün) ist nicht zu erkennen.



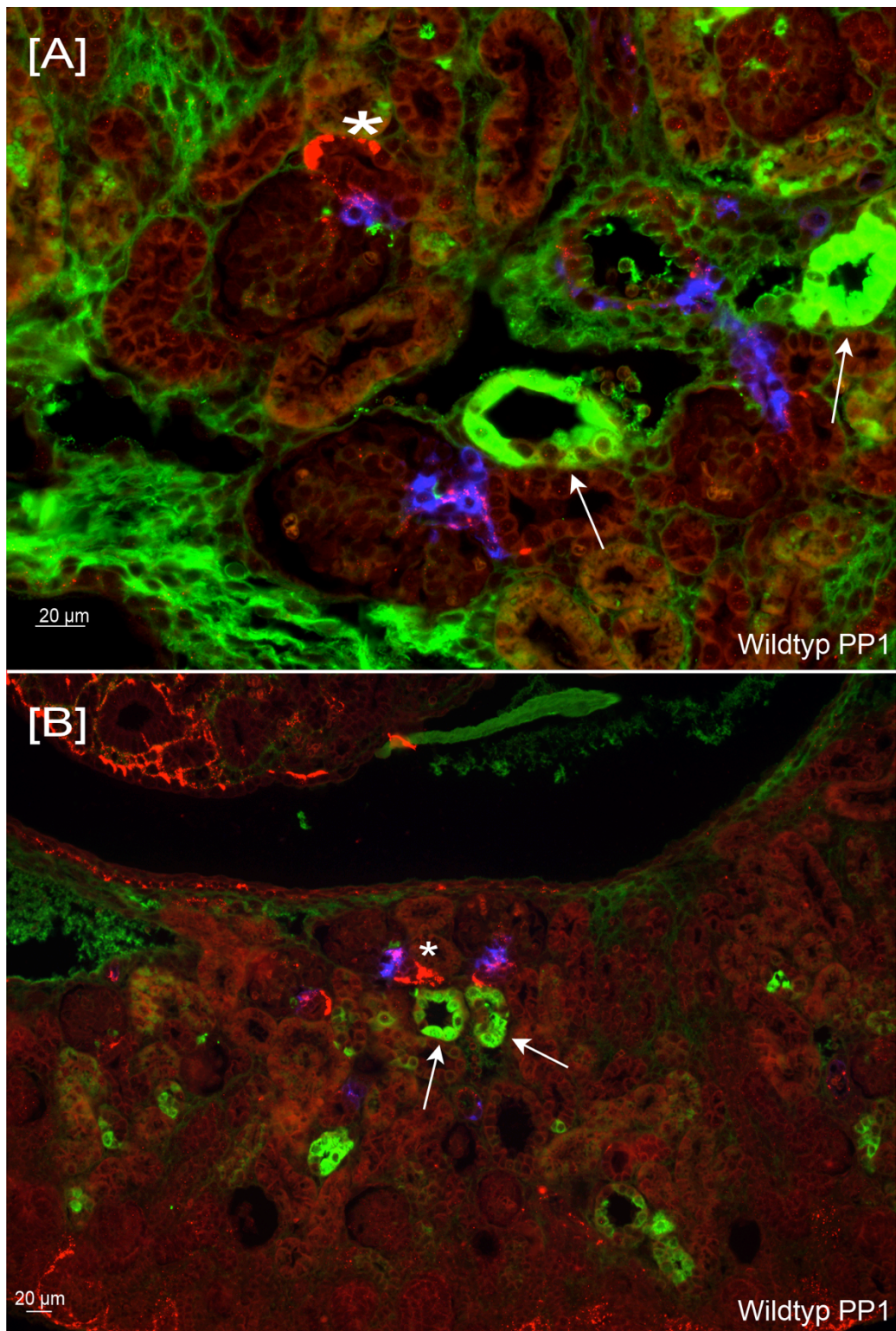
**Abb.3.14** Immunfluoreszenzdreifachfärbung einer Wildtyp pp1-Maus. Die Gefäße im Schnitt sind blau, Epithel rot und AT<sub>1</sub>-Rezeptor grün dargestellt. Es kommt zu keinerlei Überschneidung der Immunreaktionen der Epithelzellen (rot) mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor (grün). Maßstab=20 µm.

### 3.2.2 Lokalisationsbestimmung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors im Tubulussystem

Da der AT<sub>1</sub>-Rezeptor in Tubulusnähe exprimiert wird, sollte im Folgenden getestet werden, um welchen Tubulusabschnitt es sich handelt. Hierfür wurde Calbindin als Marker für den distalen Tubulus verwendet, ROMK für den proximalen Tubulus.

#### Calbindin als Marker für das distale Tubulussystem

Abb.3.15 zeigt eine immunhistochemische Färbung des distalen Tubulussystems mit Calbindin als Marker (grün). Wie im Paraffinschnitt erkennbar ist, kommt es zu keiner Deckung der Tubuli, die den AT<sub>1</sub>-Rezeptor (rot) exprimieren, und solchen, die mit Calbindin angefärbt werden können. Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor befindet sich nicht im distalen Tubulus.

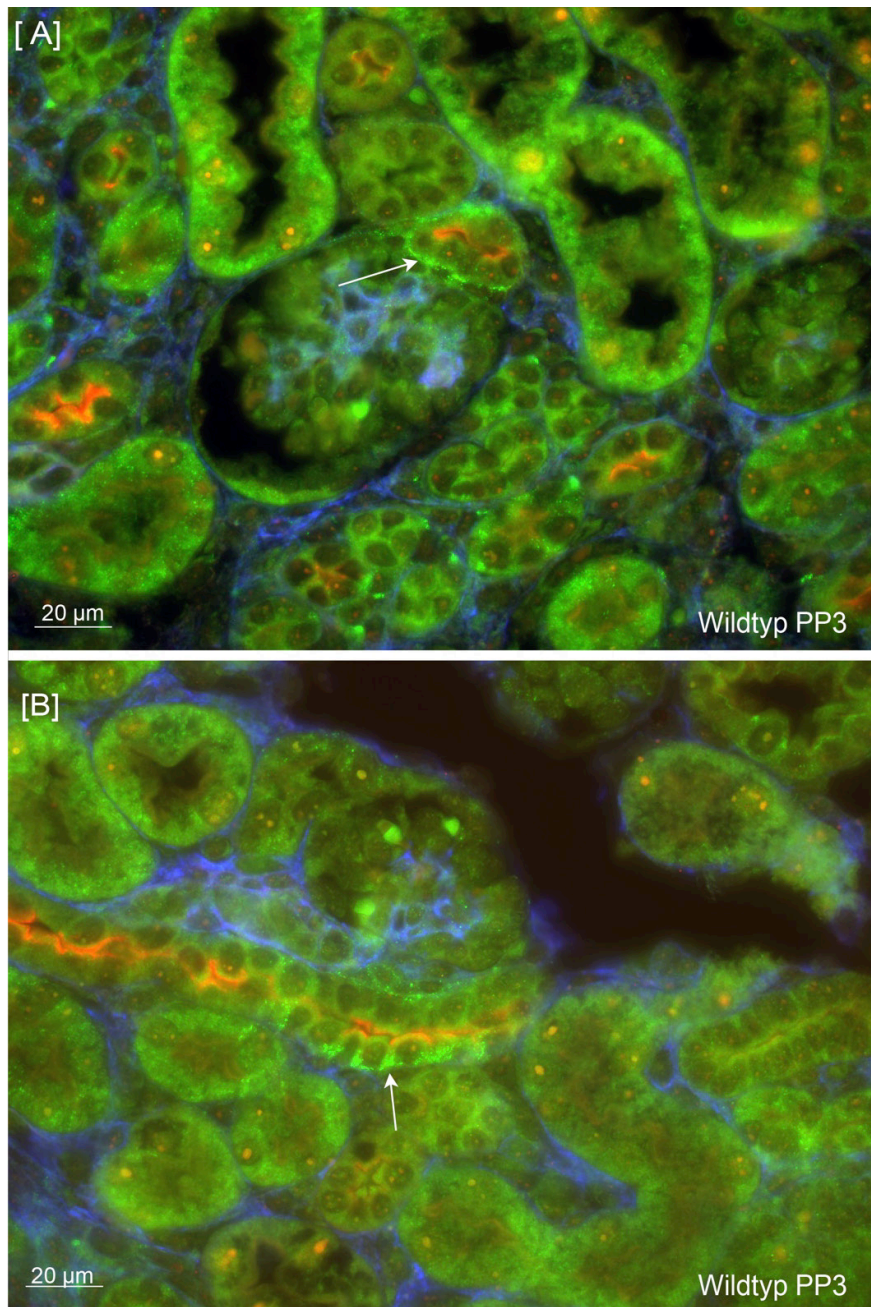


**Abb.3.15** Immunfluoreszenzdreifachfärbung von Nierengewebe einer ein Tag alten Maus. Die Immunreaktionen von Calbindin (grün mit Pfeil) überlagern sich nicht mit den AT<sub>1</sub>-Rezeptor exprimierenden Tubuli (rot mit Stern). Glattmuskelaktin ist blau dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 20μm.



### ROMK1 als Marker für das proximale Tubulussystem

Abb.3.16 zeigt eine immunhistochemische Reaktion für ROMK1 in rot, AT<sub>1</sub>-Rezeptor in grün. Der Rezeptor bindet an die luminale Membran des proximalen Tubulus. Am basalen Pol dieser Zellen findet sich auch die Immunreaktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors. Tubuluszellen des proximalen Tubulussystems exprimieren den AT<sub>1</sub>-Rezeptor. Das Gewebe stammt aus der Niere einer drei Tage alten Maus.



**Abb.3.16** Immunfluoreszenzdreifachfärbung eines Nierenschnittes einer pp3-Wildtypmaus. Die proximalen Tubuli (rot markiert) weisen eine deutliche Immunreaktion für den AT<sub>1</sub>-Rezeptor (grün mit Pfeil) auf. Glattmuskelaktin ist im Schnittbild blau unterlegt. Der Maßstab entspricht 20µm.

### 3.3 Untersuchung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in AT defizienten Mäusen

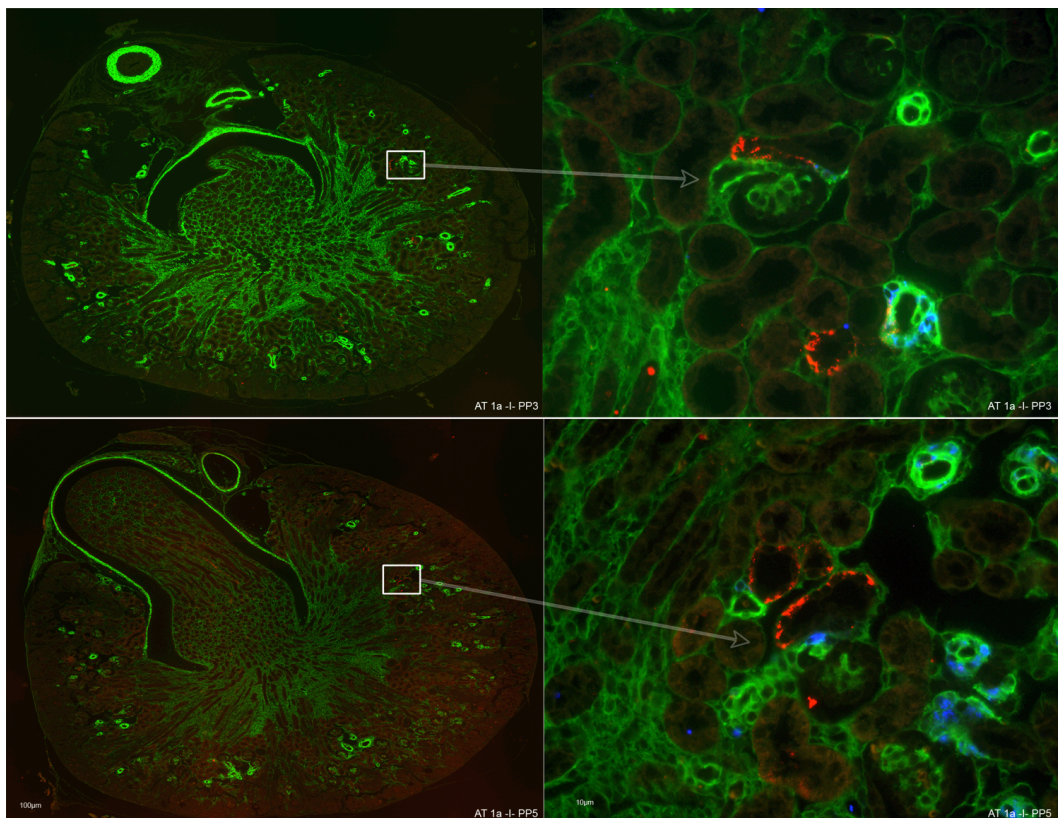
#### 3.3.1 Auftreten des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in AT<sub>1a</sub>-Rezeptor-KO-Mäusen

##### AT<sub>1a</sub>-KO-Maus am dritten Tag nach der Geburt (pp3)

Im AT<sub>1a</sub>-KO im Stadium pp3 ist kein Signal für den AT<sub>1</sub>-Rezeptor in der nephrogenen Zone erkennbar. Die Immunreaktion im proximalen Tubulus unterscheidet sich in Lokalisation und Häufigkeit nicht vom Vorkommen in der Wildtypmaus (Abb.3.17, obere Zeile).

##### AT<sub>1a</sub>-KO-Maus am fünften Tag nach der Geburt (pp5)

Wie bereits im Wildtyp kommt es auch im AT<sub>1a</sub>-KO nicht zu einer AT<sub>1</sub>-Rezeptorexpression im Bereich der nephrogenen Zone. Lediglich im Bereich proximaler Tubuli ist eine Immunreaktion auf AT<sub>1</sub>-Rezeptor feststellbar. Diese findet man, wie im Wildtyp am basalen Pol der Tubuluszellen. Morphologisch unterscheiden sich diese Zellen nicht von den Zellen des Wildtyps (Abb.3.17, untere Zeile).

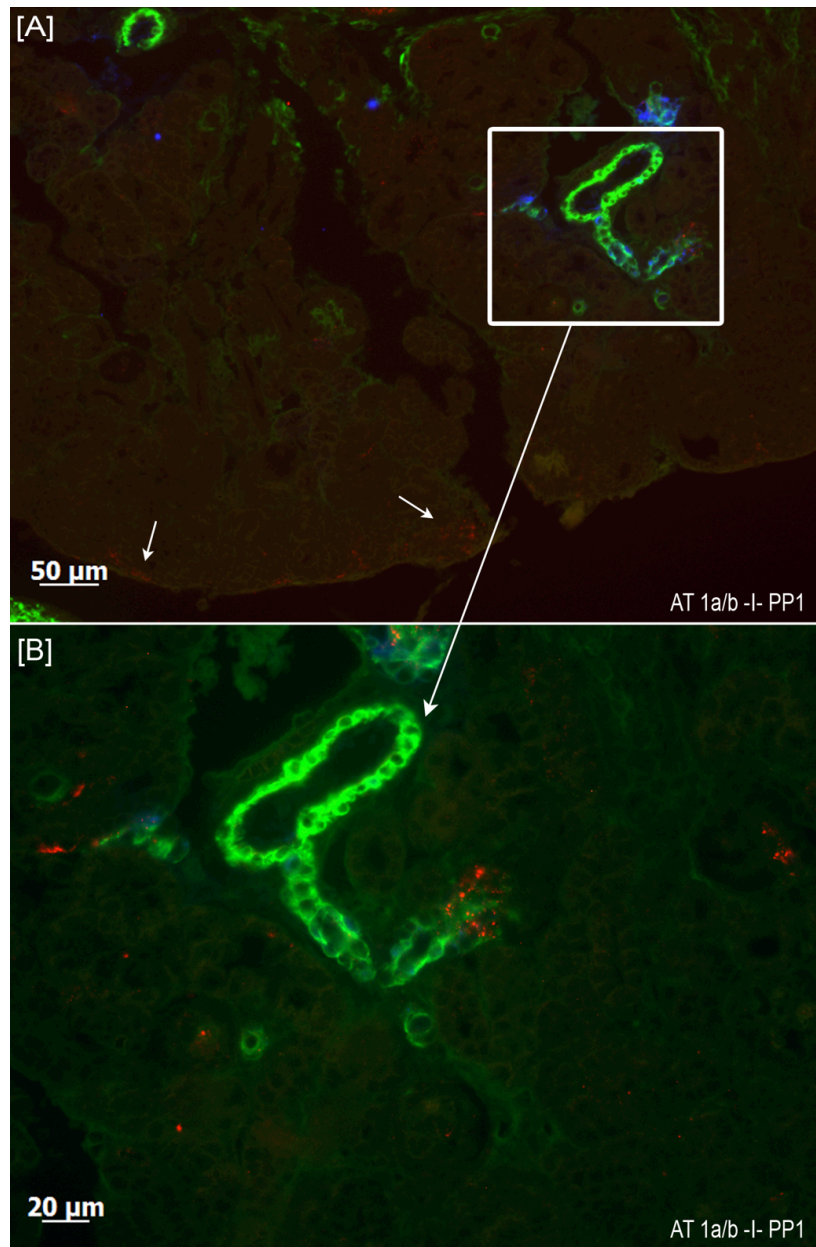


**Abb.3.17** Immunfluoreszenzdrifachfärbung von Nierenschnitten AT<sub>1a</sub> defizienter Mäuse im Stadium pp3 und pp5. Zu sehen sind Immunreaktionen von Glattmuskelaktin in grün, Renin in blau und AT<sub>1</sub>-Rezeptor in rot. Die linke Spalte zeigt dabei Übersichtsaufnahmen des jeweiligen Entwicklungsstadiums in einer hundertfachen Vergrößerung, die rechte Spalte den jeweilig relevanten Ausschnitt in der vierhundertfachen Vergrößerung.



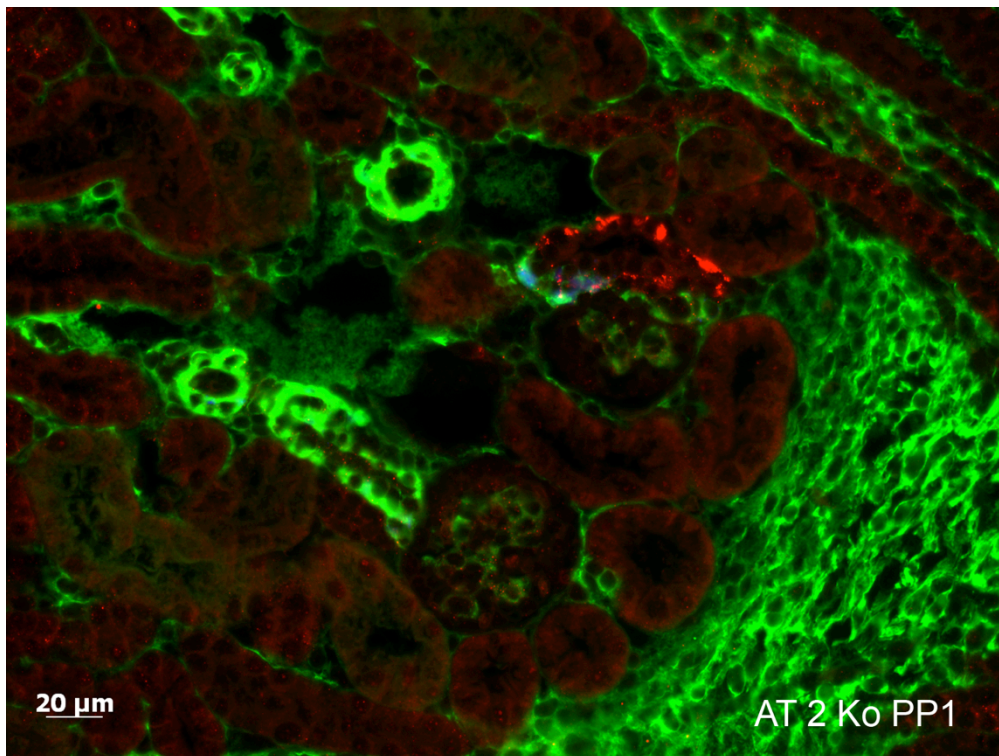
### 3.3.2 Auftreten des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in AT<sub>(1a+b)</sub>-KO-Mäusen

Wie der pp1-Wildtyp zeigt auch der AT<sub>(1a+b)</sub>-KO im selben Stadium eine AT<sub>1</sub>-Expression sowohl in der nephrogenen Zone als auch im proximal gelegenen Tubulus. Die AT<sub>1</sub>-Rezeptoranreicherung in der nephrogenen Zone des Doppel-KO ist weitaus weniger ausgeprägt als in der Wildtypmaus. Hinsichtlich der Ausbildung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in den Tubuluszellen sind keine Unterschiede zu erkennen.



**Abb.3.18** Immunfluoreszenzdrifachfärbung einer AT<sub>(1a+b)</sub> defizienten Maus im Stadium pp1. Abb. [A] zeigt Signale einer AT<sub>1</sub>-Rezeptorexpression (rot) sowohl tubulär (siehe Kasten) als auch in der nephrogenen Zone (Pfeile) in einer 200-fach vergrößerten Aufnahme. In Abbildung [B] erkennt man Reaktionen von Glattmuskelaktin in grün, Renin in blau und AT<sub>1</sub>-Rezeptor in rot. Maßstab [A]=50µm, [B]=20µm.

### 3.3.3 Auftreten des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in AT<sub>2</sub>-KO Mäusen



**Abb.3.19** Immunfluoreszenzdreifachfärbung des Nierengewebes einer AT<sub>2</sub> defizienten Maus (pp1). In der 400fachen Vergrößerung sind deutliche Immunreaktionen von Glattmuskelaktin in grün, Renin in blau und AT<sub>1</sub> in rot erkennbar.

Auf dem Gewebeschnitt der AT<sub>2</sub> defizienten Maus sind in der 400-fachen Vergrößerung deutliche Immunreaktionen für AT<sub>1</sub> in proximal gelegenen Tubuli erkennbar. Hinsichtlich der Signalstärke und Position können keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp ausgemacht werden.



## 4 Diskussion

Angiotensin II (AngII) ist ein multifunktionelles Hormon, das eine übergeordnete Rolle in der Regulation des Blutdruckes und der kardiovaskulären Homöostase spielt. Im Wesentlichen wird die Wirkung von AngII durch dessen Rezeptoren Angiotensin II-Rezeptor Typ I (AT<sub>1</sub>) und Rezeptor Typ II (AT<sub>2</sub>) vermittelt (de Gasparo et al., 1995; Bumpus et al., 1991). Eine genauere Charakterisierung des jeweiligen Rezeptortyps konnte erst nach Entdeckung und Entwicklung der jeweiligen Rezeptorantagonisten Losartan (AT<sub>1</sub>-spezifisch) und PD 123319 (AT<sub>2</sub>-spezifisch) gegeben werden (Timmermans et al., 1993). Durch eine spezifische Blockade der jeweiligen Rezeptoren wurden somit die einzelnen Effekte von AngII aufgelöst. AT<sub>1</sub>-vermittelte Effekte von AngII waren neben Vasokonstriktion und Aldosteronfreisetzung auch eine Stimulation des Zellwachstums (Timmermans et al., 1992, 1993). Die genaue Funktion des AT<sub>2</sub>-Rezeptors hingegen ist noch nicht vollends aufgeklärt. Er spielt eine mögliche Rolle in der Anti-Proliferation und Apoptose von Zellen und Vasodilatation (Horiuchi et al., 1996; Csikos et al., 1998). Neben Herz, Gehirn und Nebenniere zählen die Nieren zu einer der am häufigsten von der Wirkung von AngII betroffenen Organe. Über AT<sub>1</sub> kommt es dabei zur Vasokonstriktion der renalen Blutgefäße und einer verminderten Sekretion von Renin, was letztlich zur Verminderung der glomerulären Filtration und zum Blutdruckanstieg führt. Während die Funktion und die einzelnen Auswirkungen auf den jeweiligen Mechanismus bereits weitest gehend bekannt sind, so wird über die genaue Lage des AT<sub>1</sub>-Rezeptors immunhistochemisch ausschließlich durch Extrapolation aus Einzelschnitten gemutmaßt. Ziel dieser Arbeit ist es, zum einen über histologische Schnittbilder zum anderen über spezielle dreidimensionale Visualisierungsmethoden einen Einblick über die Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in der Mausniere während der Entwicklung und im adulten Tier anhand eines kommerziell erhältlichen Antikörpers zu gewähren.

#### **4.1 Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors während der Entwicklung**

Die verschiedenen AT-Rezeptorsubtypen und vor allem deren mRNA wurden bereits in früheren Studien (Zhuo et al., 1995; de Gasparo et al., 1994; Edwards et al., 1993; Aguilera et al., 1994) in einzelnen Säugetiergruppen, jeweils in den Nieren untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich in adulten Säugern (Nager, Primaten und auch Menschen) die Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors innerhalb einer Spezies sehr ähnelt (Zhuo et al., 1995; de Gasparo et al., 1994; Edwards et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors immunhistochemisch in den Mäusen der Entwicklungsstadien vor der Geburt am Embryonaltag 17 und 19 sowie am ersten, dritten und fünften Tag nach der Geburt (pp1, pp3, pp5) betrachtet. Zur Bestimmung des AT<sub>1</sub>-Signals wurde ein Antikörper der Firma Santa Cruz (sc-1173) verwendet. Wie in Abb.3.1, 3.2 und 3.3 zu sehen ist, erstreckt sich das Immunsignal für AT<sub>1</sub> über den Bereich der nephrogenen Zone. Signale innerhalb der Medulla sind nicht zu erkennen. Am Embryonaltag 19 sind neben den AT<sub>1</sub>-Signalen in der nephrogenen Zone auch Färbungen in Tubuli zunächst distal gelegener Glomeruli erkennbar (s.h. Abb.3.4 und 3.5). Shanmugam et al., 1995 und Kakuchi et al., 1995 berichten in ihren jeweiligen Veröffentlichungen von einer Expression von mRNA und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren in Mesenchymzellen in der Nähe oder innerhalb der nephrogenen Zone von fetalen oder frischgeborenen Nagern. In einem weiteren Versuchsaufbau wurde daraufhin der verwendete AT<sub>1</sub>-Rezeptor Antikörper in einer AT<sub>2</sub>-KO-Maus (pp1) untersucht und mit der jeweiligen Wildtypmaus gleichen Entwicklungsstandes verglichen. Wie in Abb.3.6 und 3.9 zu sehen ist, befinden sich Wildtypsignale für AT<sub>1</sub> sowohl in der nephrogenen Zone als auch in Tubuli der juxtaglomerulären Zone. Ein Vergleich mit dem dazugehörigen AT<sub>2</sub>-KO (Abb.3.17) zeigt, dass dieser keinerlei Signale für AT<sub>1</sub> in der nephrogenen Zone aufweist, lediglich in den Tubuli der juxtaglomerulären Zone. Somit ist aufgrund der immunhistochemischen Methoden eine möglicherweise fälschliche Färbung der Signale für AT<sub>2</sub> innerhalb der nephrogenen Zone durch den verwendeten AT<sub>1</sub>-Rezeptor nicht auszuschließen. Ein möglicher Grund kann eine 32%-ige Homogenität in der Aminosäuresequenz der beiden Rezeptortypen oder deren annähernd gleiches spezifisches Gewicht von ca. 41 kDa im nichtglykosilierten Zustand sein (Mukoyama, 1993). Am dritten und fünften Tag nach der Geburt zeigen sich keinerlei Signale mehr in der nephrogenen Zone; die Färbungen für AT<sub>1</sub> in Tubuli der juxtaglomerulären Zone bestehen weiterhin. Weitere vergleichende Studien im Hinblick auf die Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors während der Entwicklung konnten nicht gefunden werden.

#### **4.2 Verteilung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in der adulten Mausniere**

Etliche Studien befassten sich bereits mit dem Auftreten diverser AT-Rezeptoren in Blutgefäßen von Säugetieren (Allen et al., 1990; Zhuo et al., 1994; Sechi et al., 1992; Lopez et al., 1994). Die Verteilung der einzelnen Rezeptoren ist sehr speziesabhängig. Dabei wurde der AT<sub>1</sub>-Rezeptor vornehmlich diffus verteilt in der Media, manchmal auch in der Adventitia großer Herzgefäße, inklusive der Aorta ascendens und der Pulmonalarterien gefunden (Zhuo

et al., 1995). Im Gegensatz dazu fanden Tsutsumi et al. 1991 Immunsigale für AT<sub>2</sub> vornehmlich in den vorderen Zerebralarterien. Signale in der Adventitia großer renaler Arterien und den Arteriae arcuatae und interlobares menschlicher Nieren wurden von Zhuo et al. 1996 beschrieben. Die in dieser Arbeit betrachtete adulte Mausniere zeigt eine deutliche Verteilung des AT<sub>1</sub>-Signals um die großen Gefäße, allen voran A. arcuatae und A. interlobulares (Abb.3.10, 3.11). Kleinere Gefäße, wie afferente und efferente Arteriolen, sind dabei signalfrei. Auch dieser Sachverhalt lässt die Frage nach der Spezifität des verwendeten AT<sub>1</sub>-Antikörpers offen. Sowohl in den getesteten Entwicklungsstadien als auch in der adulten Mausniere fanden sich keine Überlagerungen der Immunsigale von Renin bzw. Aktin mit AT<sub>1</sub>.

#### **4.3 Lokalisation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in verschiedenen Tubulusabschnitten**

Abb.3.11 und 3.12 zeigen eine trichterförmige Lokalisation des AT<sub>1</sub>-Antikörpers vom basalen Pol der Tubuluszellen in den Glomerulus. Da Kofärbungen mit CD 31 und CD 34 als Marker für das Glomerulusendothel sowie eine Färbung mit Desmin als Marker für die Epithelzellen im Glomerulus keinerlei Überlappung der jeweiligen Signale ergaben, lässt es sich auf eine Lokalisation im extraglomerulären Mesangium schließen (s.h. Abb.3.11, 3.12, 3.13). Chansel et al. demonstrierten 1992, dass die Rezeptortypen in Mesangialzellen dem AT<sub>1</sub>-Subtyp entsprachen, indem sie mit Hilfe des Liganden [<sup>125</sup>I]-Sar<sup>1</sup>, Ala<sup>8</sup> AngII eine sehr hohe Affinität zwischen diesen beiden feststellten. Auch Zhuo 1992, 1993 stellten fest, dass es eine Bindung von AT<sub>1</sub> sowohl an glomerulären Mesangialzellen als auch renalen Interstitiumzellen gibt, die zwischen den Tubuli und den Vasa recta liegen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte die Lage des AT<sub>1</sub>-Signals im Tubulussystem näher charakterisiert werden. Zunächst wurden Immunofluoreszenzdreifachfärbungen mit AT<sub>1</sub>, Renin und Calbindin als Marker für den distalen Abschnitt angefertigt. Die Auswertung der histologischen Bilder ergab keine Koloalokalisation zwischen Calbindin in den Tubuli und den AT<sub>1</sub>-Signalen (Abb.3.14). Somit ist ein Vorkommen im distalen Konvolut auszuschließen. Anschließend wurden Kofärbungen mit ROMK1 als Marker für den proximalen Tubulus hergestellt (Abb.3.15). Es ergaben sich Übereinstimmungen der Signale für ROMK1 und AT<sub>1</sub>, was verdeutlicht, dass es sich bei den AT<sub>1</sub>-tragenden Tubulusabschnitten eindeutig um proximale Tubulusbereiche handelt. Eine Studie von Zhuo et al., 1992 bekräftigt diese Erkenntnisse mit ähnlichen Ergebnissen.

#### 4.4 Verteilung in AT defizienten Mäusen

Zur Verdeutlichung der bisherigen Ergebnisse wurden immunhistochemische Färbungen in AT defizienten Mäusen durchgeführt. Diese Mäuse wurden uns von der Arbeitsgruppe um Thomas M. Coffman (USA) zur Verfügung gestellt. Bei den in dieser Arbeit verglichenen Signalen für AT<sub>1</sub> in der Wildtypmaus am dritten und fünften Tag nach der Geburt (Abb.3.9, zweite und dritte Zeile) und den jeweiligen Entwicklungsstadien der AT<sub>1a</sub> defizienten Maus (Abb.3.17) wurden keine signifikanten Unterschiede im Auftreten und der Stärke des Immunsignals festgestellt. Der in dieser Studie verwendete Antikörper (sc-1173) der Firma Santa Cruz richtet sich gegen ein 15 Aminosäuren langes Codesegment. Dieses Segment ist zu 95% identisch zwischen AT<sub>1a</sub> und AT<sub>1b</sub> (Herrera et al., 2013). Generell sind diese beiden Rezeptorsubtypen bezüglich ihrer Aminosäuresequenz und ihres spezifischen Gewichtes sehr ähnlich (94%) (Iwai et al., 1991; Kakar et al., 1992; Murphy et al., 1991). Aus diesem Grund sollte es dem Antikörper nicht möglich sein, AT<sub>1a</sub> und AT<sub>1b</sub> zu unterscheiden. Neue Studien von Benicky et al., 2012 und Herrera et al., 2013 zeigten ein ähnliches Ergebnis.

Abb.3.18 zeigt das Auftreten des Signals in einer AT<sub>1a/b</sub>-Knock-Out Maus. Wie auch in der vorliegenden Wildtypmaus gibt es keinerlei Abweichungen des Signals. Herrera et al. beobachteten 2013 in einer Studie ein ähnliches Phänomen. Sie inkubierten ebenfalls Nierengewebe von Mäusen mit demselben Antikörper (sc-1173) wie wir und fanden eine entsprechend identische Signalexpression zwischen dem AT<sub>1</sub>-Doppel-KO und dessen entsprechendem Wildtyp. In weiteren Versuchsreihen kamen sie letztlich zum dem Schluss, dass der auch in dieser Arbeit verwendete Antikörper nicht unbedingt AT<sub>1</sub>, sondern ein noch nicht entschlüsselt Protein erkennt, welches in Struktur und Gewicht dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor im nichtglykosiliertem Zustand entspricht.

Trotz der Fragwürdigkeit der Spezifität des verwendeten Antikörpers lässt sich dennoch festhalten, dass sich das Signal im Laufe der Entwicklung einer Maus stetig weiterbildet und letztlich auch noch im adulten Tier zu finden ist. Die Reproduzierbarkeit in den jeweiligen Entwicklungsstadien lässt keine Frage nach der Existenz eines Signals aufkommen, wenngleich es dessen genaue Struktur noch zu erschließen gilt.

## 5 Ausblick

Generell gelten Antikörper als gutes Werkzeug, um die Existenz und Verteilung von Rezeptoren zu erschließen. Neueste Studien zeigen jedoch, dass kommerziell erhältliche Antikörper keine geeigneten Hilfsmittel sind, um auch das letzte Geheimnis des AT<sub>1</sub>-Rezeptors zu ergründen. Wie bereits in früheren Studien gezeigt, ist es sehr schwierig, hochspezifische Antikörper gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren zu entwickeln (Pradidarcheep et al., 2008; Rhodes et al., 2006; Lu X et al., 2009; Jensen et al., 2009; Hamdani et al., 2009). Ein möglicher Grund dafür könnten Unterschiede in Gewicht und Struktur des AT<sub>1</sub>-Rezeptors während seiner Glykosylierung in den jeweiligen Geweben sein. Hinsichtlich der weiteren Erforschung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors sollte man zukünftig auch auf bereits erprobte Methoden, wie Northern Blot, in situ Hybridisation, RT-PCR oder Ligandenbindungsstudien, zurückgreifen. Herrera et al., 2013 verdeutlichten, dass bereits veröffentlichte Ergebnisse hinsichtlich des Auftretens von AT<sub>1</sub> kritisch hinterfragt werden sollten.

## 6 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1.1: Schematische Darstellung des RAAS
- Abb.1.2: Schematische Darstellung des juxtaglomerulären Apparates
- Abb.1.3: Schematische Darstellung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors
- Abb.1.4: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege des AT<sub>1</sub>
- Abb.1.5: Schematische Darstellung der Uretherknospe
- Abb.1.6: Interaktion des umliegenden Mesenchyms mit der  
Sammelrohrampulle
- Abb.1.7: Dreidimensionale Darstellung eines Gefäßbaumausschnittes einer  
adulten Maus
- Abb.2.1: Schematische Darstellung der Stackbildung
- Abb.3.1: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (AT<sub>1</sub>, Renin, Aktin)  
eines Nierenschnittes einer E17-Wildtypmaus
- Abb.3.2: 3D-Modell einer Mausniere am Embryonaltag 17
- Abb.3.3: Teilrekonstruktion einer Arteria arcuata mit dazugehörigen  
Glomeruli (E17)
- Abb.3.4: Immunfluoreszenzdoppelfärbung (AT<sub>1</sub>, Aktin) histologischer Nierenschnitte  
einer Wildtyp E19-Maus
- Abb.3.5: 3D-Teilrekonstruktion eines arcuaten Astes am Embryonaltag 19
- Abb.3.6: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (AT<sub>1</sub>, Renin, Aktin)  
eines Nierenschnittes einer pp1-Wildtypmaus
- Abb.3.7: 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumesausschnittes mit  
dazugehörigen Glomeruli (pp1)
- Abb.3.8: 3D-Rekonstruktion eines Glomerulus (pp1)
- Abb.3.9: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (AT<sub>1</sub>, Renin, Aktin) von  
Nierengewebeschnitten von Nieren drei und fünf Tage alter Wildtypmäuse
- Abb.3.10: Immunfluoreszenzdoppelfärbung (AT<sub>1</sub>, Aktin)  
eines Nierengewebeschnittes einer adulten Maus
- Abb.3.11: 3D-Teilrekonstruktion eines Gefäßbaumes (rot) einer adulten Maus  
mit stimuliertem RAAS
- Abb.3.12: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (CD 31, AT<sub>1</sub>, Aktin) im Stadium pp1
- Abb.3.13: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (CD 34, AT<sub>1</sub>, Aktin) im Stadium pp1

- Abb.3.14: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (Desmin, AT<sub>1</sub>, Aktin) im Stadium pp1
- Abb.3.15: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (Calbindin, AT<sub>1</sub>, Aktin) im Stadium pp1
- Abb.3.16: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (ROMK1, AT<sub>1</sub>, Aktin) im Stadium pp3
- Abb.3.17: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (AT<sub>1</sub>, Aktin, Renin) von Nierenschnitten AT<sub>1a</sub> defizienter Mäuse im Stadium pp3 und pp5
- Abb.3.18: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (AT<sub>1</sub>, Aktin, Renin) einer AT<sub>(1a+b)</sub> defizienten Maus im Stadium pp1
- Abb.3.19: Immunfluoreszenzdreifachfärbung (AT<sub>1</sub>, Aktin, Renin) des Nierengewebes einer AT<sub>2</sub> defizienten Maus (pp1)



## 7 Quellenverzeichnis

**Aguilera G, Kapur S, Feuilleux P, Sunar Akbasak B, Bathia AJ (1994):** Developmental changes in angiotensin II receptor subtypes and AT1 receptor mRNA in rat kidney, *Kidney Int.* 46: 973-979

**Allen Am, Yamada H, Mendelsohn FAO (1990):** In vitro autoradiographic localization of binding to angiotensin receptors in the rat heart, *Int. J. Cardiol* 28: 25-33

**Apfeldorf WJ, Rasmussen H (1988):** Simultaneous determination of intracellular free calcium and aldosterone production in bovine adrenal zona glomerulosa, *Cell Calcium* 9:71-80

**Ardaillou R (1999):** Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol.* 10 Suppl 11:S30-9

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

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

**Barajas L, Powers K, Carretero O, Scicli AG, Inagami T (1986):** Immunocytochemical localization of renin and kallikrein in rat renal cortex, *Kidney Int.* 29(5):965-970

**Benicky J, Hafko R, Sanchez-Lemus E, Aguilera G, Saavedra JM (2012):** Six commercially available angiotensin II AT1 receptor antibodies are non-specific, *Cell Mol Neurobiol* 32: 1353-1365

**Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, De Gasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DGJ, Timmermans PB (1991):** Nomenclature for angiotensin receptors: A report of the nomenclature committee of the council for high blood pressure research, *Hypertension* 17: 720-721

**Capponi AM (1996):** Distribution and signal transduction of angiotensin II AT1 and AT2 receptors, Blood Pressure 2: 41-46

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

**Chansel D, Czekalski S, Pham P, Ardaillou R (1992):** Characterization of angiotensin II receptor subtypes in human glomeruli and mesangial cells, Am J Phhysiol 262: F432-F441

**Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S et al. (1997):** Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse, Am.J.Physiol. 272: F299-304

**Csikos T, Chung O, Unger T (1998):** Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT2 receptor, J. Human Hypertens. 12: 311-318

**De Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Hardling JW, Inagami T, Timmermans PB (1995):** Proposed update of angiotensin receptor nomenclature, Hypertension 25:924-927

**De Gasparo M, Levens NR (1994):** Pharmacology of angiotensin II receptors in the kidney, Kidney Int. 46: 1486-1491

**Diem DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME (2001):** Angiotensin receptors: distribution signalling and function, Clinical Science 100: 481-492

**Edwards RM, Aiyar N (1993):** Angiotensin II receptor subtypes in the kidney, J. Am Soc Nephrol 3: 1643-1652

**Eklom P, Sariola H, Karkinen-Jääskeläinen M, Saxén L. (1982):** The origin of the glomerular endothelium. Cell Differ. 11(1):35-39

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

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

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

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

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

**Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW (1996):** Angiotensin receptors and their therapeutic implications, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 281-306

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

**Groblewski T, Maigret B, Nouat S, Larguier R, Lombard C, Bonnafous JC, Marie J (1995):** Amino acids of the third transmembrane domain of the AT1a angiotensin II receptor are involved in the differential recognition of peptide and nonpeptide ligands, *Biochem Biophys Res Commun* 209: 153-160

**Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T (1994):** The genomic organization of human angiotensin II type I receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 200: 313-319

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

**Hamdani N, Van der Velden J (2009):** Lack of specificity of antibodies directed against human beta-adrenergic receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 403-407

**Herrera M, Sparks MA, Alfonso-Pecchio AR, Harrison-Bernard LM, Coffman TM (2013):** Lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type I receptor protein, *Hypertension* 61: 253-258

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

**Horiuchi M (1996):** Functional aspects of angiotensin type 2 receptor, *Adv. Exp. Med.Biol.* 396: 217-224

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

**Huckle WR, Earp HS (1994):** Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II, *Prog. Growth Factor Res.* 5: 177-194

**Hughes AD (1998):** Molecular and cellular mechanisms of action of angiotensin II (AT1) receptors in vascular smooth muscle, *J. Human Hypertens* 12: 275-281

**Hunyady L, Balla T, Catt KJ (1996):** The ligand binding site of the angiotensin AT1 receptor, *Trends Pharmacol Sci* 17: 135-140

**Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1995):** Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 92, 3521-3525

**Iwai N, Inagami T (1992):** Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor, *FEBS Lett* 298: 257-260

**Iwai N, Yamano Y, Chaki S, Konishi F, Burdhan S, Tibbetts C, Sasaki K, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T (1991):** Rat angiotensin II receptor: cDNA sequence and regulation of the gene expression, *Biochem Biophys Res Commun* 177: 299-304

**Jard S, Cantau B, Jakobs KH (1981):** Angiotensin II and  $\alpha$ -adrenergic agonists inhibit rat liver adenylatecyclase, *J. Biol.Chem.* 256: 2603-2606

**Jensen BC, Swigart PM, Simpson PC (2009):** Ten commercial antibodies for alpha-1-adrenergic receptor subtypes are nonspecific, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 409-412

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

**Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neill JD (1992):** Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation, *Biochem Biophys Res Commun* 183: 1090-1096

**Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BL, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I (1995):** Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse, *Kidney Int* 47: 140-147

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

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

**Kurtz A. (1989):** Cellular control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 113:1-40

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

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

**Lewis JL, Serikawa T, Warnock DG (1993):** Chromosomal localization of angiotensin II type I receptor isoforms in the rat, *Biochem Biophys Res Commun* 194: 677-682

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

**Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, Diamant D, Tang SS (1994):** Distribution and function of cardiac angiotensin AT1 and AT2 receptors subtypes in hypertrophied rat hearts, *Am J Physiol* 267: H844-H852

**Lu X, Bartfei T (2009):** Analyzing the validity of GalR1 and GalR2 antibodies using knockout mice, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 417-420

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

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

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

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

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

**Moravec CS, Schluchter MD, Paranandi L, Czerska B, Stewart RW, Rosenkranz E, Bond M (1990):** Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro, *Circulation* 82: 1973-1984

**Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi, M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ (1993):** Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors, J Biol Chem: 24539-24542

**Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE (1991):** Isolation of cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor, Nature 351: 233-236

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

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

**Neubauer B, Machura K, Kettl R, Lopez ML, Friebe A, Kurtz A (2013):** Endothelium-derived nitric oxide supports renin cell recruitment through the nitric oxide-sensitive guanylate cyclase pathway. Hypertension 61(2):400-7.

**Oliverio MI, Madsen K, Best CF, Ito M, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1998):** Renal growth and development in mice lacking AT1a receptors for angiotensin II, Am. J. Physiol. 274: F43-F50

**Pradidarcheep W, Labruyere WT, Dabhoiwala NF, Lamers WH (2008):** Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed, J Histochem Cytochem 56: 1099-1111

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

**Pobiner BF, Hewlett EL, Garrison JC (1985):** Role of Ni in coupling angiotensin receptors to inhibition of adenylate cyclase in hepatocytes, J.Biol.Chem 260:16200-16209

**Rhodes KJ, Trimmer JS (2006):** Antibodies as valuable neuroscience research tools versus reagents of mass distraction. J Neurosci. 26: 8017-8020

**Ribeiro AB, Kohlmann JR, Saragoca MA, Marson O, Ramos OL (1985):** The renin-angiotensin system in the control of systemic arterial pressure, *Drugs* 30: 6-12

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

**Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, Doetschman T. (1988):** Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*. 102(3): 471-478

**Rosendorff C (1996):** The renin-angiotensin system and vascular hypertrophy, *J. Am. Coll. Cardiol.* 28: 803-812

**Sadoshima J, Izumo S (1993):** Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro, Roles of phospholipid-derived second messengers, *Circ. Res* 73, 424-438

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

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

**Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T (1991):** Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor, *Nature* 351: 230-232

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

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



**Sechi LA, Griffin CA, Grady EF, Kalinyak JE, Schambelan M (1992):** Characterization of angiotensin II receptor subtypes in the rat heart, *Circ. Res.* 71: 1482-1489

**Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA (2001):** Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281(2): 345-356

**Shanmugam S, Llorens-Cortes C, Clauser E, Corvol P, Gase JM (1995):** Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of the rat kidney and adrenal gland, *Am. J. Physiol.* 268: F922-F930

**Sorokin L, Ekblom P (1992):** Development of tubular and glomerular cells of the kidney. *Kidney Int.* 41(3): 657-664

**Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K et al (1995):** Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia, *J. Biol. Chem* 270: 18719-18722

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

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

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

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

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

**Timmermans PB, Benfield P, Chiu AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD (1992):** Angiotensin II receptors and functional correlates, *Am. J. Hypertens.* 5: 221S-235S

**Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT et al. (1993):** Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists, *Pharmacol. Rev.* 45: 205-251

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

**Tsutsumi K, Saavedra JM (1991):** Characterization of AT<sub>2</sub> angiotensin II receptors in rat anterior cerebral arteries, *Am J Physiol* 261: H667-H670

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

**Wang ZQ, Moore AF, Ozono R, Siragy HM, Carey RM (1998):** Immunocolocalisation of subtype 2 Angiotensin II (AT<sub>2</sub>) receptor protein in rat heart. *Hypertension*, 32:78-83

**Zhuo J, Alcorn D, Allen AM, Mendelsohn FAO (1992):** High resolution localization of angiotensin II receptors in rat renal medulla, *Kidney Int.* 42: 1372-1380

**Zhuo J, Alcorn D, Harris PJ, Mendelsohn FAO (1993):** Localization and properties of angiotensin II receptors in rat kidney, *Kidney Int. Suppl.* 42: S40-S46

**Zhuo J, Allen AM, Alcorn D, Aldred GP, MacGregor DP, Mendelsohn FAO (1995):** the distribution of angiotensin II receptors, *Hypertension* 2: 1739-1762

**Zhuo J, Allen AM, Yamada H, Sun Y, Mendelsohn FAO (1994):** Localization and properties of the angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptors in the heart, *The Cardiac-Renin Angiotensin System*: 63-88

**Zhuo J, Dean R, Mac Gregor D, Alcorn D, Mendelsohn FAO (1996):** Presence of angiotensin II AT2 receptor binding sites in the adventitia of human kidney vasculature, Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 3: S147-S154

## **8 Abkürzungsverzeichnis**

## Chemische und biologische Größen

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

## Physikalische Größen und Einheiten

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

## Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

k	kilo ( $1 \times 10^3$ )
m	milli ( $1 \times 10^{-3}$ )
$\mu$	micro ( $1 \times 10^{-6}$ )
n	nano ( $1 \times 10^{-9}$ )

## Sonstige

3D	dreidimensional
%	Prozent
$\alpha$ SMA	$\alpha$ smooth muscle actin
A.	Arteria(e)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting Enzyme
AK	Antikörper
AngI	Angiotensin I
AngII	Angiotensin II
AT <sub>1</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT <sub>2</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
BSA	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cy2,5	Carbocyanin
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNase	Desoxyribonuklease
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (et altera)
EtOH	Ethanol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase
H <sub>2</sub> O bidest.	zweifach entionisiertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HS	Pferdeserum (horse serum)
Ig	Immunglobulin
i.p.	intra peritoneal
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JAK	Janus-Kinase
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
JG-Zelle	juxtaglomeruläre Epitheloidzelle
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Kaliumhydrogenphosphat
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MD	Macula densa
mRNA	messenger ribonucleic acid
NO	Stickstoffmonoxid
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO	di-Natriumhydrogenphosphat
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF- $\beta$	platelet derived growth factor-beta
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC, PLA <sub>2</sub>	Phospholipase C, A <sub>2</sub>
pp	postpartal
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
STAT	signal transducers and activators of transcription
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl)-amin-methan
TRITC	Tetramethylrhodamin
V.	Vena(e)
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

## 9 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei denjenigen Personen bedanken, die mir im Laufe dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Beginnen möchte ich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz. Nicht nur für die Vergabe des interessanten Themas und die Bereitstellung der benötigten Mittel und Geräte, sondern auch für seine offene Art und Freundlichkeit in all der Zeit möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Bei meinen Büronachbarn Herrn Dr. Dominik Stepan und Frau Dr. Melanie Gerl für deren gute Tipps in allen Lebenslagen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Katharina Machura und Herrn Dr. Björn Neubauer. Ihre Ratschläge und fachliche Kompetenz trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Abschließend danke ich noch meinen Eltern Alfons und Martha sowie meinem Bruder Michael, die mir bei alltäglichen Dingen zur Seite standen. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Veronika, die mir auch in misslichen Situationen wieder ein Lächeln auf die Lippen zauberte.

## **10 Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben:**

Name: Ermer Johannes

Anschrift: Stockackerweg 1  
92712 Pirk  
Telefon: 0151-11667040  
e-Mail: [johannesermer@googlemail.com](mailto:johannesermer@googlemail.com)

Geburtsdatum/-ort: 06.11.1984, Weiden  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung:**

1991-1995	Josef-Faltenbacher-Volksschule in Pirk
1995-2002	Augustinus-Gymnasium Weiden
2002-2004	Kepler-Gymnasium Weiden
2004	Allgemeines Abitur am Kepler-Gymnasium Weiden

### **Hochschullaufbahn:**

Beginn des Studiums der Zahnmedizin im Wintersemester 04/05

Naturwissenschaftliche Vorprüfung nach dem Sommersemester 05

Zahnärztliche Vorprüfung nach dem Wintersemester 06/07

Staatsexamen der Zahnheilkunde nach dem Sommersemester 2010

### **Soziale Kompetenz:**

20 Jahre aktive Mitgliedschaft in der BRK Ortsgruppe Weiherhammer Abteilung Wasserwacht. Rettungsschwimmabzeichen in Gold, aktive Teilnahme an der Rettungsschwimmausbildung Jugendlicher

4 Jahre 2. Vorstand in der Landjugend in Pirk bei Weiden

### **Beruflicher Werdegang:**

Seit 2011: Anstellung als Assistenzarzt in der Zahnarztpraxis Dr. Markus Schmid in 92637 Weiden, Wörthstraße 9