

Charakterisierung der Reninzellrekrutierung in der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
MEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Catharina Keßler
aus Erlangen

im Jahr 2014

Die Arbeit wurde angeleitet von: Professor Doktor Armin Kurtz

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 07.02.2014

Datum der Promotion: 26.05.2014

Gutachter: Professor Doktor Armin Kurtz
Professor Doktor Jens Schlossmann

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	8
2.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	9
2.1.1. Renin	10
2.1.1.1. Reninsynthese in der juxtaglomerulären Zelle	11
2.1.1.2. Die Regulation des Reninsystems	12
2.1.2. Aldosteron	13
2.1.2.1. Aldosteronwirkung	14
2.1.2.2. Mineralocorticoid Rezeptor (MR)	15
2.1.2.3. Aldosteronsynthese	16
2.1.2.4. Aldosteronsynthese-Knockout-Maus	17
2.2. Gefäßsystem der Mausniere	19
2.3. Zielsetzung der Arbeit	20
3. Material und Methoden	22
3.1. Material	23
3.1.1. Geräte	23
3.1.2. Verbrauchsmaterial	24
3.1.3. Chemikalien	25
3.1.4. Antikörper	26
3.1.5. Puffer und Lösungen	27
3.1.5.1. Immunhistochemie	27
3.1.5.2. Molekularbiologie	28
3.1.6. Software und Internetdienste	28
3.2. Methoden	29
3.2.1. Versuchstiere	29
3.2.2. Genotypisierung	29
3.2.3. Histologische Methoden	31
3.2.3.1. Fixierung des Nierengewebes	31
3.2.3.2. Einbettung in Paraffin	32
3.2.3.3. Anfertigen von Paraffinschnitten und Entparaffinierung	32
3.2.3.4. Immunhistochemische Färbung	33
3.2.4. Dreidimensionale Rekonstruktion	34
3.2.4.1. Mikroskopie und Digitalisierung	34

3.2.4.2. Datenaufbereitung mittels ImageJ.....	35
3.2.4.3. Rekonstruktion mittels Amira.....	36
3.2.5. Molekularbiologische Methoden.....	38
3.2.5.1. Isolierung von Total-RNA aus Nieren.....	38
3.2.5.2. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	39
3.2.5.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)	40
4. Ergebnisse	42
4.1. 3D-Rekonstruktion und zelluläre Analyse.....	44
4.1.1. Wildtyp bei Normalsalzdiät (WT NS)	44
4.1.2. Wildtyp nach Salzdepletion in Kombination mit Enalapril für eine Woche (WT LS/E 1 Wo)	47
4.1.3. Wildtyp nach Salzdepletion in Kombination mit Enalapril für drei Wochen (WT LS/E 3 Wo).....	50
4.1.4. Aldosteronsynthese-Knockout-Maus bei Normalsalzdiät (KO NS).....	54
4.1.5. Aldosteronsynthese-Knockout-Maus nach zehn Tagen Salzdepletion (KO LS 10 d).....	59
4.2. mRNA und Volumina.....	64
5. Diskussion	68
5.1. Reninexpressionsmuster in der Mausniere nach Salzdepletion und Verabreichung eines ACE-Hemmers.....	69
5.2. RAAS-Defektmutante mit genetischer Deletion der Aldosteronsynthese	70
6. Literaturverzeichnis	75
7. Anhang	83
7.1. Abbildungsverzeichnis.....	84
7.2. Abkürzungsverzeichnis	86
7.3. Danksagung	88
7.4. Erklärung.....	89

1. Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) lässt sich durch verschiedene Manöver, wie z. B. Salzmangeldiäten oder genetische Deletionen einer Komponente des RAAS, manipulieren. Die Effekte werden unter anderem an den reninbildenden Zellen beobachtet. Sie treten im ursprünglichen Zustand lediglich einschichtig an juxtaglomerulärer Position auf. Da ihre Anzahl variabel ist, kann sie sowohl zu- als auch abnehmen. Bleibt ein Stimulationszustand bestehen, so tritt eine zunehmende retrograde Rekrutierung der reninexprimierenden Zellen entlang des arteriellen Gefäßbaumes auf. Mit dem Ende der Stimulationszustände kann sich wieder der ursprüngliche Zustand einstellen.

In dieser Arbeit wurden folgende Versuchsgruppen analysiert. Eine Gruppe bestehend aus Wildtypmäusen mit unstimuliertem RAAS diente als Kontrolle. Eine zweite Wildtyp-Gruppe wurde eine Woche lang einer Salzdepletion in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril, zur RAAS-Stimulation, unterzogen. Bei der dritten Wildtyp-Gruppe wurde die Dauer dieser Diät auf drei Wochen verlängert.

Des Weiteren wurden Aldosteronsynthese-Knockout-Mäuse, die von Geburt an ein stimuliertes RAAS aufweisen, untersucht. Dabei wurde eine Gruppe unter Normalbedingungen gehalten, während einer weiteren Gruppe eine zehntägige Niedrigsalzdiät verabreicht wurde, um das RAAS noch zusätzlich zu stimulieren.

Die Wildtypen und Aldosteronsynthese-Knockout-Mäuse mit Normal- oder Niedrigsalzdiäten wurden im Hinblick auf die Gefäßmorphologie sowie die Renin-Konzentration und -Lokalisation verglichen.

Um die Veränderungen gut darstellen zu können, wurden in dieser Dissertation dreidimensionale Modelle der untersuchten Nierenausschnitte von Versuchstieren am Computer angefertigt. Sie wurden anhand von Serienschnitten der perfundierten und paraffinierten Nieren erstellt. Es folgte eine immunhistochemische Färbung des Renins und des Glattmuskelaktins, sowie das mikroskopische Fotografieren. Somit konnten zweidimensionale histologische Schnitte und dreidimensionale Rekonstruktionen beurteilt werden. Darüber hinaus wurden die Renin-mRNA-Level und die Volumina des Renins der Rekonstruktionen untersucht und verglichen.

Die RAAS-Stimulation beim Wildtypen wurde durch eine ein- bzw. dreiwöchige Niedrigsalzdiät, in Kombination mit Enalapril, vorgenommen. Die pharmakologische Stimulation führt zu einer erhöhten Zahl reninbildender Zellen. Dieser Effekt lässt sich auch bei Untersuchung der Renin-mRNA-Level und der Volumina des Renins nachvollziehen. Ausgehend vom Wildtypen ohne Diät vervierfachen sich die gemessenen Werte nach einer Woche Diät und steigen nach drei Wochen um den

Faktor 14. Die Zellen sind nicht länger, wie beim Wildtypen ohne Diät, auf die juxtaglomeruläre Position der afferenten Arteriolen begrenzt. Abhängig von der Dauer der Nidrigsalzdiät breiten sie sich zunehmend retrograd entlang des Gefäßbaumes aus. Des Weiteren findet sich bei längeren Stimulationszuständen eine juxtaglomeruläre Mehrschichtigkeit der reninbildenden Zellen, bis hin zu einer Clusterbildung. Außerdem sind reninbildende Zellen zu erkennen, die zum Teil aufgesetzt auf die Media auftreten. Eine andere histologisch gut nachvollziehbare Auswirkung ist die abnehmende Koloalisation von Renin und Glattmuskelaktin, zugunsten des Renins. Die Gefäßmorphologie beim Wildtypen scheint durch Salzdepletion unverändert zu bleiben.

Die Aldosteronsynthase-Knockout-Mäuse weisen ein von Geburt an chronisch stimuliertes RAAS auf. Im Gegensatz zum unstimulierten Wildtypen zeigen die dreidimensionalen Rekonstruktionen der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus eine Vermehrung der reninproduzierenden Zellen. Der Effekt kann durch zehntägige Nidrigsalzdiät noch weiter gesteigert werden. Diese Befunde der dreidimensionalen Modelle gehen mit der Messung der mRNA-Level und Volumina des Renins konform. Die mRNA zeigt, verglichen mit dem Wildtyp, einen siebenfachen Anstieg bei der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus. Bei zusätzlicher Salzdepletion ist eine 32-fache Erhöhung zum Wildtypen zu beobachten. Die Volumina weisen eine elffache Steigerung ohne Diät sowie eine 20-fache Steigerung mit Nidrigsalzdiät der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus gegenüber dem unstimulierten Wildtypen auf. Die Reninzellen treten bei der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus bereits ohne Stimulation von den afferenten Arteriolen ausgehend bis hin zum arcuaten Seitenast auf. Mit zusätzlicher Stimulation des RAAS durch Salzdepletion wird die retrograde Rekrutierung der reninexprimierenden Zellen noch weiter gesteigert. Auch eine verringerte Koloalisation von Glattmuskelaktin und Renin, sowie auf die Media aufgelagerte Reninzellen treten auf. Die Morphologie des Gefäßbaumes wird durch den RAAS-Defekt merklich beeinflusst. Verglichen mit dem Wildtyp erscheint der Gefäßbaum der Knockout-Tiere, mit und ohne weitere RAAS-Stimulation, verdickt.

Im Hinblick auf den Vergleich des Verteilungsmusters der reninexprimierenden Zellen scheinen sich die Aldosteronsynthase-Knockout-Maus und der Wildtyp, mit pharmakologisch stimuliertem RAAS, sehr zu ähneln. Ein eindrücklicher Unterschied kann jedoch das Gefäßsystem betreffend festgestellt werden. Der Gefäßbaum des Wildtypen bleibt auch mit Salzdepletion schlank, im Gegensatz dazu erscheint er bei der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus verdickt.

2. Einleitung

2.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein wichtiges Enzym-Hormon-System, welches sowohl Salz- und Wasserhaushalt als auch den Blutdruck im Körper reguliert. Die wesentlichen Mediatoren dieser enzymatischen Kaskade sind die Aspartylprotease Renin, das Glykoprotein Angiotensin und das Steroidhormon Aldosteron. Aktiviert wird das RAAS unter anderem durch eine Verringerung des Blutdrucks, des Blutvolumens oder der Natriumkonzentration. Dadurch wird vermehrt Renin, welches in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) der Niere gebildet wird, ausgeschüttet. Die Protease Renin katalysiert die Abspaltung des Dekapeptids Angiotensin I aus Angiotensinogen (Abbildung 1). Das Glykoprotein Angiotensinogen wird in der Leber gebildet und in das Blutplasma sezerniert. Mit Hilfe des im Lungenepithel gebildeten Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) wird, durch Abspaltung zweier Aminosäuren, Angiotensin I in Angiotensin II umgeformt. Angiotensin II ist der physiologische Effektor des Systems. Seine Signalweiterleitung erfolgt über Angiotensin I-Rezeptoren. Angiotensin II hat eine vasokonstriktorische Wirkung, die durch einen erhöhten Gefäßwiderstand zu einem erhöhten Blutdruck führt. Außerdem wird das Durstgefühl sowie die Synthese und Sekretion von Aldosteron in der Nebenniere gesteigert. Aldosteron bewirkt daraufhin in der Niere eine verstärkte Rückresorption von Kochsalz und Wasser und erhöht damit das Blutvolumen und den Blutdruck (Hackenthal et al., 1990). Da weder die Konzentration von Angiotensinogen noch die von ACE limitierend für die Bildung von Angiotensin II sind, hängt die Aktivität des RAAS unter physiologischen Bedingungen vor allem von der Reninkonzentration im Blut und somit von der Reninsynthese und -sekretion ab (Kurtz, 1989; Peters und Clausmeyer, 2002; Mercure et al., 1998).

Pharmakologisch kann das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System an verschiedenen Stellen beeinflusst werden. In die Kaskade können ACE-Hemmer, Renin-Inhibitoren, Aldosteron-Antagonisten und Sartane eingreifen. ACE-Hemmer, wie beispielsweise Enalapril, hemmen die Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyms. Somit verhindern sie die Entstehung von Angiotensin II aus Angiotensin I und senken die Konzentration von Angiotensin II und Aldosteron. Folgen sind unter anderem die Senkung des Blutdrucks und eine verringerte Natrium- und Wasserretention. Des Weiteren resultiert das Aussetzen der negativen Rückkopplung von Angiotensin II auf die Reninsekretion in einen Anstieg der Reninkonzentration (Claassen et al., 2013).

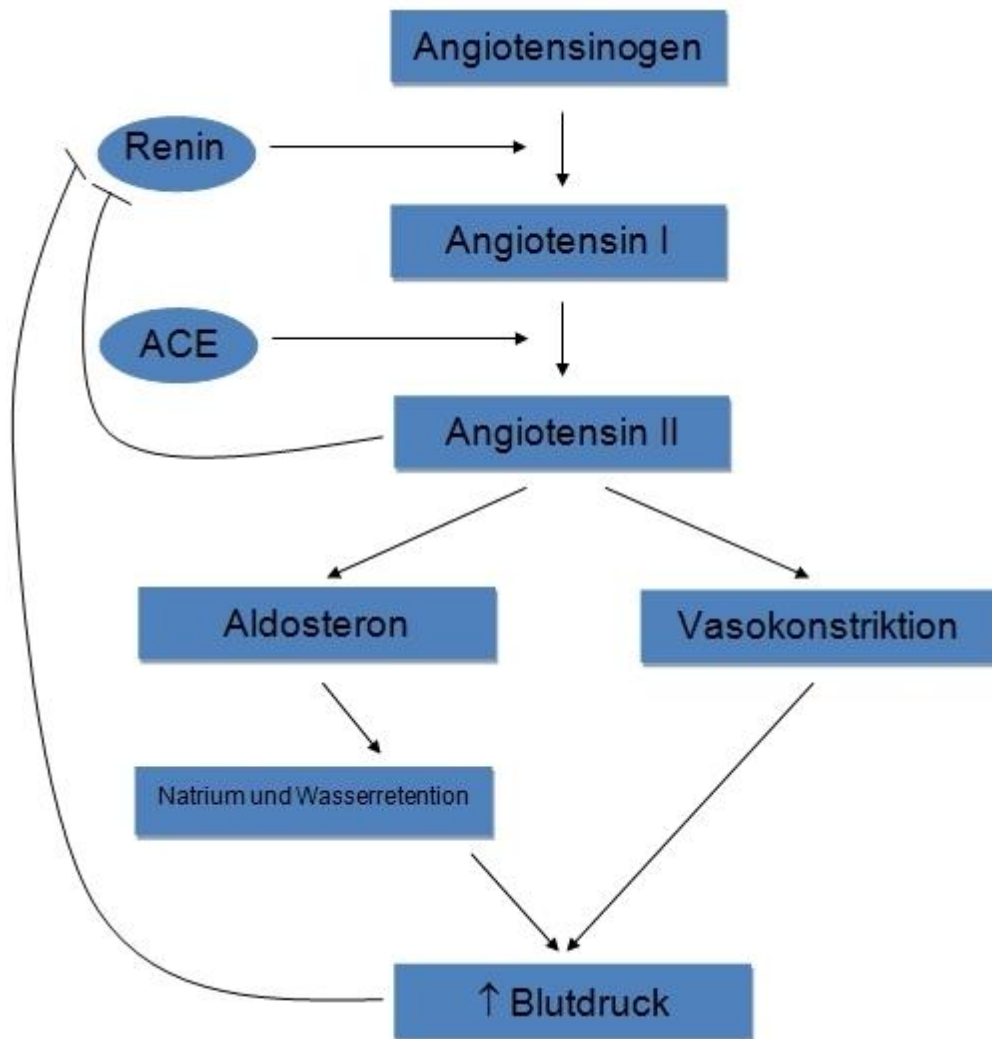


Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Bestandteile des RAAS

2.1.1. Renin

Als Katalysator des ersten Schrittes der Angiotensin II Produktion spielt die Aspartylprotease Renin eine Schlüsselrolle im RAAS. Sie besteht aus 340 Aminosäuren und zwei homologen Schleifen, deren Zwischenraum ein aktives Zentrum mit zwei katalytischen Aspartyl-Gruppen beinhaltet (Sielecki et al., 1989). Renin ist monospezifisch und spaltet lediglich Angiotensin. Neben der aktiven Form von Renin existiert auch eine inaktive Form. Dieses sogenannte Prorenin stellt eine Reninvorstufe dar (Hobart et al., 1984). Die Funktion wird durch ein N-terminales Propeptid beeinträchtigt. Es versperrt Angiotensinogen den Zugang zum aktiven Zentrum der Enzymvorstufe. Demnach erfordert die Aktivierung zur aktiven Reninform eine

proteolytische Abspaltung dieses 43 Aminosäuren langen Propeptids (Hirose et al., 1985; Do et al., 1987).

2.1.1.1. Reninsynthese in der juxtaglomerulären Zelle

Das im Blut zirkulierende Renin wird in erster Linie in den granulierten juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) der Niere synthetisiert (Barajas und Salido, 1986; Deschepper et al., 1986; McGowan et al., 1980; Taugner et al. 1979). Die JG-Zellen liegen als Element des juxtaglomerulären Apparates in der Tunica media der afferenten Arteriolen in direkter Nachbarschaft zu den Gefäßpolen der Glomeruli und stehen in Verbindung mit den Macula-densa-Zellen des distalen Tubulus (Abbildung 2) (Taugner et al., 1984; Barajas, 1979). In älteren Arbeiten wurde davon ausgegangen, dass die JG-Zellen von glatten Gefäßmuskelzellen der afferenten Arteriolen stammen (Barajas, 1979). Mittlerweile nimmt man jedoch an, dass die glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Reninzellen gemeinsame mesenchymale Vorläuferzellen haben. Diese sollen sich im Laufe der Entwicklung entweder in Gefäßzellen oder in Reninzellen weiterdifferenzieren (Sequeira Lopez et al., 2001). Für die kubische Form der reninbildenden Zellen ist die Reninspeichergranula verantwortlich. Die JG-Zellen bilden zusammen mit den Zellen der Macula-densa, den extraglomerulären Mesangialzellen und den endothelialen Glattmuskelzellen den juxtaglomerulären Apparat (Taugner et al., 1984).

Die Anzahl reninhaltiger Zellen kann durch Aktivierung oder Hemmung des Reninsystems variiert werden. Wird mehr Renin benötigt, so erscheinen zusätzliche reninbildende Zellen in den vorgeschalteten präglomerulären Gefäßen auf, um wieder ein Gleichgewicht herzustellen. Dieses Phänomen wird als retrograde Rekrutierung bezeichnet.

Sequeira Lopez et al. zeigten, dass reninexprimierende Zellen Vorläuferzellen für eine Vielzahl nicht-reninproduzierender Zellen darstellen. In der Niere ist es ihnen bei Stimulation möglich durch Transformation die Fähigkeit Renin zu produzieren zurück zu erlangen (Sequeira Lopez et al., 2004). Diese Rekrutierung verläuft diskontinuierlich und gleicht dem Verteilungsmuster während der Entwicklung. Auch während der Entwicklung der Niere, treten die reninproduzierenden Zellen nicht nur auf die afferenten Arteriolen begrenzt, sondern ausgeweitet bis hin zu den größeren Gefäßen auf.

Im Gegensatz dazu erfolgt bei chronischer Unterdrückung des Reninsystems eine Umbildung der reninproduzierenden Zellen zu glatten Muskelzellen (Kurtz, 1989).

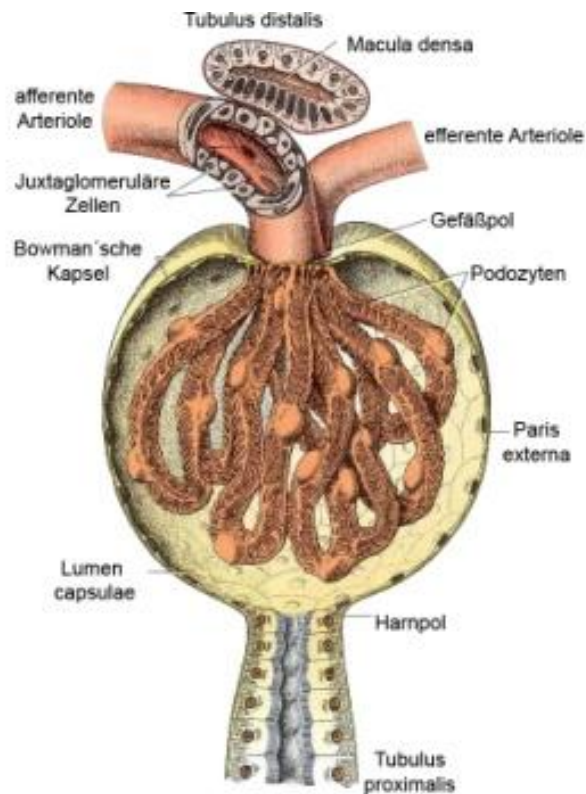


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Glomerulus (Abbildung nach Junqueira, 2002)

2.1.1.2. Die Regulation des Reninsystems

Zu den vielfältigen Kontrollmechanismen der Reninsynthese gehören unter anderem der Blutdruck, der Salzhaushalt, das sympathische Nervensystem sowie lokale Faktoren:

Bei Blutdruckabfall ist ein verringerter renaler Perfusionsdruck die Folge, was eine gesteigerte Reninsekretion und -expression bewirkt. Steigt der Blutdruck an, so kann der gegenteilige Effekt beobachtet werden (Skinner et al., 1964; Nafz et al., 1997). Der vermutete Mechanismus wird über einen Barorezeptor vermittelt. Der erhöhte luminaire Druck verursacht eine Steigerung der Wandspannung der Gefäße. Dies wiederum führt zur Dehnung der JG-Zellmembran, was das Membranpotential verändert und die Reninsekretion verringert (Fray and Lush, 1976 und 1984; Carey et al., 1997; Bader and Ganten, 2000).

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist durch den Salzhaushalt gegeben. Hier besteht eine inverse Beziehung zwischen dem Salzbestand des Körpers und der Reninsynthese

und -sekretion. Die Vermittlung dieser kochsalzabhängigen Kontrolle des Renins wird seit langem der Macula-densa zugeschrieben (Goormaghtigh, 1937; Vander, 1967). Die Zellen der Macula-densa befinden sich im distalen Tubulus in direkter Nachbarschaft zu den reninbildenden Zellen. Sie haben hierbei die Aufgabe eines Chemosensors zur Messung der NaCl-Konzentration durch einen Natrium-Kalium-Chlorid-Transporter (Barajas, 1979).

Das sympathische Nervensystem stellt einen weiteren bedeutenden Bestandteil der Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems dar. Es beeinflusst verschiedenste Organtätigkeiten und bewirkt insgesamt eine Leistungssteigerung des Organismus (Ergotropie). Einen der vielen Effekte stellt die Stimulation des Reninsystems dar. Diese beruht auf der Stimulation β 1-adrenerger Rezeptoren durch Katecholamine wie Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Voraussetzung für diese stimulierende Wirkung ist die direkte Nachbarschaft der katecholaminsezernierenden Zellen zum juxtaglomerulären Apparat, da nur diese Zellen β 1-adrenerge Rezeptoren, welche auf den Reninzellen sitzen, exprimieren (Wagner et al., 1999; Holmer et al., 1997). Bei Unterdrückung des Einflusses des sympathischen Nervensystems z.B. durch renale Denervierung oder Behandlung mit Rezeptorantagonisten zeigt sich eine starke Abnahme der Reninaktivität (Golin et al., 2001; Holmer et al., 1994). Dem entsprechend weist auch die β 1/ β 2-Adrenozeptor-Knockout-Maus, verglichen mit dem Wildtyp, eine deutlich verringerte Reninkonzentration auf (Kim et al, 2007).

Neben diesen als „klassisch“ zu bezeichnenden Regulationsfaktoren des renalen Reninsystems beeinflussen auch lokale Faktoren die Sekretion und Synthese von Renin. Zu diesen Faktoren zählen Prostaglandine, Stickstoffmonoxid (NO), Endotheline und Zytokine, welche in unmittelbarer Nähe der JG-Zellen gebildet werden (Wagner et al., 1998). NO betreffend fanden Neubauer et al. heraus, dass es eine wichtige Rolle im Signalweg der Rekrutierung von reninexprimierenden Zellen an den präglomerulären Gefäßen, jedoch nicht am juxtaglomerulären Apparat, spielt (Neubauer et al., 2013).

2.1.2. Aldosteron

Aldosteron ist einer der wichtigsten Vertreter der Mineralocorticoide und wurde 1953 entdeckt (Simpson et al., 1953). Es wird in einer Enzymkaskade von Cholesterin ausgehend, vorwiegend in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde, hergestellt.

Seine bedeutendste Wirkung stellt die Beeinflussung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes durch Steigerung der Natriumresorption und Kaliumausscheidung dar. Kontrolliert wird die Hormonsekretion vorwiegend vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (Boon et al., 1997; Lieberman et al., 1984; Guyton, 1991). Die wichtigsten Stimulatoren der Aldosteronausschüttung sind die Angiotensin II Plasmakonzentration und die extrazelluläre Kaliumkonzentration (Bassett et al., 2004). Ein erhöhter Blutdruck und eine verringerte Kaliumkonzentration wirken dagegen als negatives Feedback und hemmen die Sekretion.

2.1.2.1. Aldosteronwirkung

Die Aldosteronwirkung ist vielfältig. Hier soll sich auf die Rolle von Aldosteron im Bezug auf die Niere konzentriert werden, auch wenn viele weitere beachtenswerte Wirkungen an anderen Orten, wie dem Herzen, nachgewiesen wurden (Brilla et al., 1990).

Man kann genomische und nicht-genomische Aldosteronwirkungen unterscheiden.

Dabei werden die genomischen Effekte über den Mineralocorticoid Rezeptor (MR) vermittelt. Die aldosteronabhängige Natriumresorption und Kaliumsekretion findet in aldosteronsensiblen Epithelzellen des distalen Nephron statt, das die zweite Hälfte des distalen Tubulus, das Verbindungsstück und das Sammelrohr beinhaltet (Loffing et al., 2001). Dabei folgt Wasser durch Osmose dem Natrium, was das Blutvolumen und den Blutdruck beeinflusst. Effektoren sind mehrere verschiedene Proteine der Epithelmembran. Die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ stellt die Antriebskraft für den Transport von Natrium und Kalium durch die Zellen dar. Für den limitierenden Schritt der Natriumabsorption ist der luminale epitheliale Na^+ -Kanal ENaC verantwortlich. Der luminale K^+ -Kanal limitiert die K^+ -Sekretion.

Zusätzlich existieren noch weitere wichtige Effektoren, wie zum Beispiel der thiazidsensitive Natriumchlorid-Kotransporter (NCC) (Kim et al., 1998). Aldosteron kann den Transport einerseits durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle und andererseits durch eine gesteigerte Anzahl der Kanäle fördern (Kemendy et al., 1992; Helman et al., 1998). Frühe Resultate setzten bereits innerhalb von einer halben Stunde, späte erst nach über sechs Stunden ein.

Neben den beschriebenen genomischen Wirkungen existieren ebenfalls nicht-genomische. Diese zeichnen sich vor allem durch einen sehr schnellen Wirkungseintritt, der sich innerhalb von Minuten einstellt, und eine Unempfindlichkeit für Aldosteronrezeptorantagonisten aus. Schnelle Effekte von Aldosteron auf die

intrazelluläre Elektrolytkonzentration sowie auf das Zellvolumen, auf die Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers und auf zahlreiche Second Messenger in vielen verschiedenen Zelltypen wurden entdeckt (Dooley et al., 2011). Dafür scheint ein eigener membranärer Rezeptor zu existieren. Als möglicher Kandidat wird aktuell beispielsweise GPR30 in Betracht gezogen (Gros et al., 2011).

2.1.2.2. Mineralocorticoid Rezeptor (MR)

Die Wirkung von Aldosteron wird zum Teil über den Mineralocorticoid Rezeptor (MR) vermittelt.

Das NR3C2 Gen des humanen MR liegt auf dem Chromosom 4 in der Region q31.1 (Morrison et al., 1990). Bei der Maus befindet sich dieses Gen auf Chromosom 8 (Terajima et al., 1994). Der MR gehört zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren und ist, genau wie der Glucocorticoid Rezeptor, ein Steroid Rezeptor. Er weist die übliche Struktur nukleärer Rezeptoren auf und besteht aus mehreren Domänen mit unterschiedlichen Aufgaben (Pascual-Le Tallec and Lombes, 2005).

Vor der Ligandenbindung liegt der MR in einer inaktiven Konformation im Zytoplasma vor. Diese Form entsteht durch einen Komplex mit Hitzeschockproteinen (Bruner et al., 1997). Nach Aktivierung transloziert der MR-Ligand-Komplex in den Zellkern und fungiert dort als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor (Yamamoto, 1985). In vitro bindet der MR Aldosteron, Corticosteron und Cortisol mit fast gleicher Affinität (Arriza et al., 1987). Es existieren mehrere verschiedene Mechanismen, die für die Spezifität von Aldosteron in vivo verantwortlich sind. Dies ist wegen der bedeutend höheren Konzentrationen von Cortisol und Corticosteron entscheidend für die Aldosteronwirkung. Als eines von vielen hierfür relevanten Beispielen wäre das Enzym 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu nennen. Es bewirkt eine Inaktivierung von Cortisol und Corticosteron durch eine 11 β -Oxidation gegen die Aldosteron geschützt ist (Funder et al., 1988). Es scheinen mehrere Isoenzyme zu existieren. Zwei davon, 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 und 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2, wurden bereits kloniert und sequenziert (Albiston et al., 1994; Tannin et al., 1991). Des Weiteren scheint der Rezeptor selbst zwischen Aldosteron und Glucocorticoiden unterscheiden zu können, denn die Halbwertszeit von Komplexen mit Aldosteron ist weit länger als die mit Cortisol (Lombes et al., 1994). Außerdem scheint die Stabilität des Steroidrezeptorkomplexes einen Einfluss zu haben (Hellal-Levy et al., 1999). Wie wichtig der MR für die Vermittlung der Mineralocorticoidwirkung ist, zeigt sich bei MR-Knockout-

Mäusen. Sie leiden an starkem Salzverlust, der nicht auf Mineralocorticoide anspricht (Berger et al., 1998).

2.1.2.3. Aldosteronsynthese

Die Aldosteronsynthese gehört zur Familie der Cytochrom P450 Enzyme. Sie kommt nur in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde vor (Yabu et al., 1991; Ogishima et al., 1992). Das für die Aldosteronsynthese kodierende humane Gen CYP11B2 liegt auf Chromosom 8 (Taymans et al., 1998), bei der Maus liegt es hingegen auf Chromosom 15 (DeBry et al., 1996). Die Aldosteronsynthese ist an den letzten Schritten der Aldosteronsynthese beteiligt. Dort katalysiert sie die 11 β -Hydroxylierung von 11-Desoxycorticosteron zur Bildung von Corticosteron, die 18-Hydroxylierung von Corticosteron zu 18-Hydrocorticosteron und die 18-Methyl-Oxidation zu Aldosteron (Curnow et al., 1991; Domalik et al., 1991; Kawainoto et al., 1991).

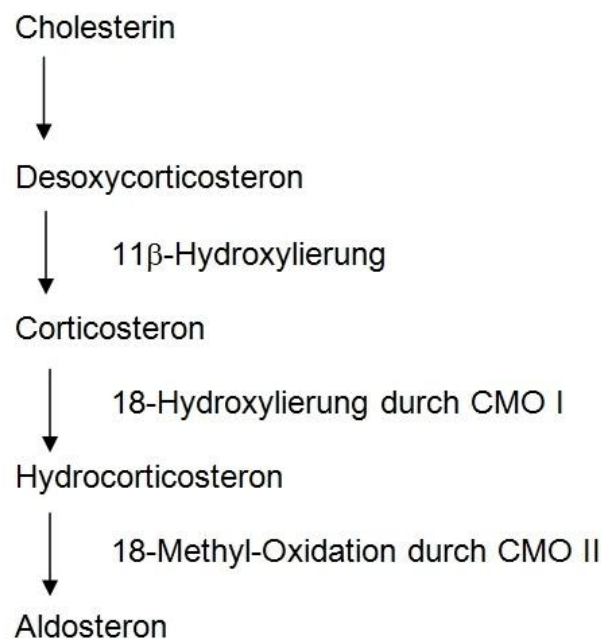


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aldosteronsynthese

2.1.2.4. Aldosteronsynthese-Knockout-Maus

Einige Mutationen im Aldosteronsynthese-Gen (CYP11B2) können einen Aldosteronsynthese-Mangel hervorrufen. Corticosteron-Methyloxidase-Mangel Typ I und II (CMO I und II) stellen zwei verschiedene inaktivierende Mutationsformen dar, welche die Aldosteronsynthese beeinträchtigen (Abbildung 3). Der Typ I, ein Defekt der 18-Hydroxylase, zeichnet sich durch 18-Hydroxycorticosteron-Mangel, der Typ II, eine fehlerhafte 18-Methyl-Oxidation, hingegen durch 18-Hydroxycorticosteron-Überproduktion aus (Pascoe et al., 1992; Nomoto et al., 1997). Beide Formen machen sich unter anderem durch Hyperkaliämie, metabolische Azidose und stark erhöhte Reninaktivität im Plasma bemerkbar (Rosler, 1984). Eine erhöhte Aktivität dagegen verursacht Bluthochdruck (Lifton et al., 1992).

Homozygote Aldosteronsynthese-Knockout-Mäuse (AS -/-) haben einen absoluten Aldosteronmangel. Unter basalen Bedingungen weisen sie einen niedrigen Blutdruck, abnorme Elektrolyte und einen fehlregulierten Wasserhaushalt auf. Dies kann trotz erhöhter Reninsynthese nicht vollständig kompensiert werden. Eine Hochsalzdiät führt zu einem Angleichen der Elektrolytwerte an die des Wildtypen. Der niedrige Blutdruck kann auch bei Hochsalzdiät nicht normalisiert werden. Der unter Basalbedingungen verringerte Blutdruck der homozygoten Aldosteronsynthese-Knockout-Mäuse sinkt bei Salzangel noch weiter ab (Makhanova et al., 2006). Im Gegensatz dazu verändert sich der Blutdruck der Wildtypen bei Niedrigsalzdiät kaum (Machura et al., 2012). Bei heterozygoten Mäusen (AS +/-) ist der Wert bei basalen Bedingungen nicht signifikant geringer als beim Wildtypen, nimmt aber bei Salzangel deutlich ab (Makhanova et al., 2006).

Sowohl das Nieren- wie auch das Körpergewicht sind bei Aldosteronsynthese-Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtypen reduziert. Bereits bei heterozygoten Mäusen ist dies zu beobachten. Makhanova et al. stellen bei Untersuchung des Quotienten von Nieren- zu Körpergewicht einen gleichbleibenden Quotienten bei allen Phänotypen fest. Dadurch entsteht der Eindruck Aldosteron würde eine generelle, nicht nur organbezogene, Wachstumsminde rung herbeiführen (Makhanova et al., 2006).

Homozygote Mäuse weisen, verglichen mit dem Wildtyp, erhöhte Konzentrationen von Corticosteron und Proteinen auf. Außerdem treten bei Aldosteronsynthese-Knockout-Mäusen sehr hohe Angiotensin II- und Plasma-Renin-Konzentrationen auf (Lee et al., 2005). Bezogen auf den Wildtypen sind bei Hämatokrit und Glucose keine signifikanten

Unterschiede festzustellen. Aldosteron ist in homozygoten Mäusen nicht vorhanden. Im Gegensatz dazu findet sich bei der heterozygoten Aldosteronsynthase-Knockout-Maus Aldosteron, jedoch sind die Werte im Vergleich zum Wildtypen niedriger (Makhanova et al., 2006).

Auch ein veränderter Urin- und Wasserhaushalt wird bei den Aldosteronsynthase-Knockout-Mäusen sichtbar. Bei Salzangel weisen homozygote Aldosteronsynthase-Knockout-Mäuse, verglichen mit dem Wildtyp, eine größere Harnmenge und eine verringerte Urinosmolarität auf. Mit Nidrigsalzdiät lassen sich diese Veränderungen noch weiter verstärken (Makhanova et al., 2006).

Aldosteronsynthase-Knockout-Mäuse weisen eine stark erhöhte Anzahl reninproduzierender Zellen auf (Kurt et al., 2013). Außerdem zeigen sich ein hypertrophierter juxtaglomerulärer Apparat sowie eine stark ausgedehnte Macula-densa. Zudem wird vermehrt Cyclooxygenase in der Macula-densa Region exprimiert, was normalerweise beim Wildtypen und heterozygoten Aldosteronsynthase-Knockout-Mäusen nicht gefunden wird (Makhanova et al., 2006). Des Weiteren konnten Makhanova et al. 2006 in manchen der Knockout-Nieren Hydronephrose feststellen.

Homozygote Aldosteronsynthase-Knockout-Mäuse haben stark erhöhte Renin-, leicht verringerte Glucocorticoidrezeptor- sowie erhöhte 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-mRNA-Mengen. Keine Unterschiede zwischen Wildtyp und den homozygoten Aldosteronsynthase-Knockout-Mäusen lassen sich bei der mRNA der Serum-Glucocorticoid-regulierten Kinase, des Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Kotransporter, der α -, β - und γ -Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals (ENaC) und des Na⁺-H⁺ Austausch Typ 3 feststellen. Dagegen sind die Level des Na⁺-Cl⁻ Kotransporters (NCC) und des ROMK Kaliumkanals bei der homozygoten Maus niedriger, als beim Wildtyp. Bei der mRNA der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1 und -2) fällt auf, dass lediglich der COX-2-Level bei homozygoten Tieren im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist und sich der COX-1-Level nicht unterscheidet (Makhanova et al., 2006). Bei der homozygoten Aldosteronsynthase-Knockout-Maus ist mRNA des Aldosteronsynthase-Gens (CYP11B2) gar nicht vorhanden. Bei heterozygoten Tieren sind nur 70% der Menge des Wildtyps aufzufinden und bei beiden Genotypen kommt es unter Salzdepletion zu einem Abfall der mRNA (Makhanova et al., 2006).

2.2. Gefäßsystem der Mausniere

Die Steuerung der Entwicklung des arteriellen Systems der Niere ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System scheint einer der Einflussfaktoren der renalen Angiogenese zu sein (Reddie et al., 1998; Yosipiv et al., 1996; Higers et al., 1997; Tufro-McReddie et al., 1995).

Die Mausniere wird von der A. renalis ausgehend durch ein komplexes Blutgefäßnetz versorgt. Nachdem die A. renalis am Hilus in die Niere gelangt, gehen zwei A. interlobares ab, die ins Nierenparenchym einziehen und wiederum einige A. arcuatae abgeben (Sauter et al., 2008). Sie verlaufen entlang der Mark-Rindengrenze und verzweigen sich in mehrere A. interlobulares. Diese ziehen zur Oberfläche der Niere, wo sie als afferente Arteriolen enden. Prinzipiell können aus allen arteriellen Nierengefäßen afferente Arteriolen entspringen, am häufigsten betroffen sind aber die Interlobulargefäße (Sauter et al., 2008). Das darauffolgende Kapillarknäuel, der Glomerulus, dient der Ultrafiltration des Blutes. Daraus münden die efferenten Arteriolen. Die efferenten Arteriolen aus den kortikal gelegenen Glomeruli speisen ein peritubuläres Kapillarbett, welches für die Versorgung der Tubuli in der Nierenrinde zuständig ist. Ausgehend von den marknahen Glomeruli, den sogenannten juxtamedullären Glomeruli, wird das Nierenmark unterhalten (Klinke et al., 2010).

Nach dem Kapillarbett folgt das venöse System, welches analog zum zuführenden arteriellen System das Blut abführt. Auf die V. interlobularis und die V. arcuatae folgen die V. interlobares, welche das Blut in V. renalis leiten. Diese münden schließlich in die V. cava (Junqueira et al., 2002; Klinke et al., 2010).

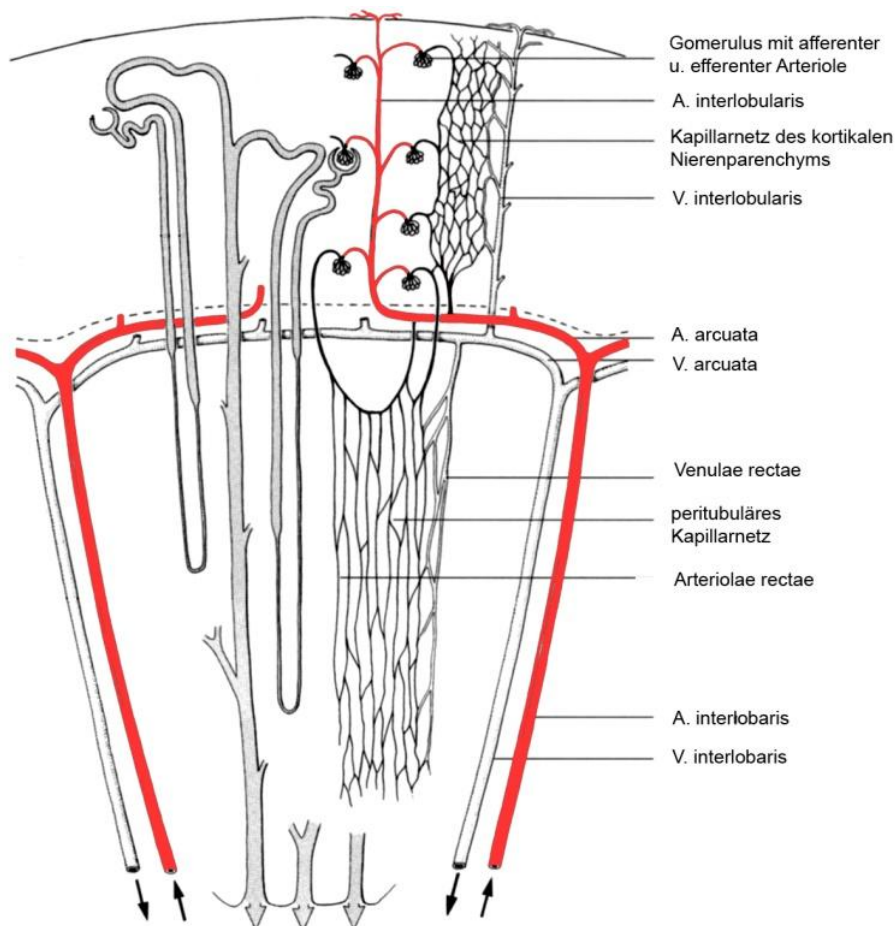


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Blutgefäßsystems der Niere (Machura, 2008)

2.3. Zielsetzung der Arbeit

Die Zahl der reninbildenden Zellen in der Niere ist plastisch. Länger anhaltende Stimulationszustände des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) gehen mit einer erhöhten Zahl reninbildender Zellen einher, während bei Suppressionszuständen des RAAS die Zahl der reninbildenden Zellen abnimmt. Dieser Vorgang der Zu- und Abnahme der Zahl reninbildender Zellen ist reversibel und erfordert weder Zellproliferation noch Apoptose. Nach heutiger Vorstellung erfolgt die Zu- und Abnahme reninbildender Zellen durch eine reversible Phänotypänderung von glatten Gefäßmuskelnzellen in den präglomerulären Gefäßen in reninbildende Zellen und zurück. Dabei tritt unter chronischer Stimulation des RAAS wieder ein fötales Verteilungsmuster reninbildender Zellen entlang der präglomerulären Gefäße auf. Während der Nierenentwicklung findet man Reninexpression in der Media größerer präglomerulärer

Gefäße der Niere bis hin zur Nierenarterie, wobei mit fortschreitender Reifung der Niere die größeren Gefäße die Reninproduktion einstellen und diese letztendlich im Adultzustand nur in juxtaglomerulären Zellen erhalten bleibt.

Die zellulären Mechanismen, die dieser charakteristischen Rekrutierung von reninbildenden Zellen in der adulten Niere zu Grunde liegen, sind bislang nur wenig verstanden. Eine starke Zunahme von reninbildenden Zellen in der adulten Niere kann auch durch genetische Deletion einer Komponente des RAAS induziert werden. Hierbei ist die Zahl reninbildender Zellen von Geburt an erhöht.

Inwieweit die Zelltypen reninbildender Zellen in der normalen adulten Niere mit und ohne Stimulation des RAAS identisch, ähnlich oder verschieden von denjenigen sind, welche in Nieren mit genetischem RAAS-Defekt auftreten, ist bislang unklar.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es deshalb zunächst die Zahl und das Verteilungsmuster von reninbildenden Zellen in normalen adulten Nieren, in welchen das RAAS chronisch durch eine bzw. drei Wochen Salzdepletion stimuliert wurde, mit adulten Nieren, in welchen von Geburt an eine Komponente des RAAS fehlt, zu vergleichen. Als RAAS-Defektmutanten wurden Mäuse mit genetischer Deletion der Aldosteronsynthese verwendet.

Dazu sollten die Nieren der Versuchstiere perfundiert, in Paraffin eingebettet und anschließend Serienschnitte angefertigt werden. Zur histologischen und dreidimensionalen computergestützten Aufbereitung sollten Renin und α -Glattmuskelaktin als Marker für das arterielle Gefäßsystem immunhistologisch gefärbt, mikroskopiert und anschließend digitalisiert werden. Die histologischen Aufnahmen dienen der zweidimensionalen Interpretation bzw. der dreidimensionalen Rekonstruktion mittels des Computerprogramms Amira. So können Aussagen über die Gefäßmorphologie sowie der Renin-Konzentration und Lokalisation getroffen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Filtersets TRITC-Filter: Cy2-Filter:	Filter set 43, Zeiss, Jena Anregung 533-558nm Emission 570-640nm Filter set 38 HE, Zeiss, Jena Anregung 450-490nm Emission 500-550nm
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore, Schwalbach
PCR-Gerät	LabCycler, SensoQuest, Göttingen
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin

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

3.1.2. Verbrauchsmaterial

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

	Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Lightcycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Niedrigsalzfutter 0,02% NaCl	Ssniff, Soest
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

3.1.3. Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Frankfurt am
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup,
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/µl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x	Promega, Mannheim
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin [®] 25000 5 ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nuclease freies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0,5μg/μl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Roti [®] -Safe	Roth, Karlsruhe
SYBR [®] Green PCR Kit	Roche, Mannheim
Tris	Merck, Darmstadt
TRIzol [®] -Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.4. Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
chicken anti-Renin-IgG	polyklonal	Davids Biotech, Regensburg	1:400
mouse anti-Glattmuskel-IgG	polyklonal	Immunotech, Marseille, Frankreich	1:50

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

3.1.5. Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, diente H₂O bidest als Lösungsmittel für sämtliche Puffer und Lösungen.

3.1.5.1. Immunhistochemie

Fixierlösung für Perfusion	
PBS	
Paraformaldehyd	3 %

PBS-(Phosphate Buffered Saline) Puffer, pH 7,4	
NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

PBS-Otto-Puffer, pH 7,4	
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
NaCl	140 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM

Waschpuffer	
PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %

Blockierlösung	
PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %
HS	10 %

3.1.5.2. Molekularbiologie

Agarosegel	
TBE	
Agarose	2 %

NaOH für gDNA-Extraktion	
NaOH	25 mM

10x TBE(Tris-Borat-EDTA) Puffer	
Tris Base	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	20mM

DEPC-H₂O	
DEPC in H ₂ O	1/1000 V
Schütteln, üN geöffnet unter dem Abzug stehen lassen dann autoklavieren	

3.1.6. Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office 2007* erstellt. Zur Bearbeitung der Serienbilder wurden *Adobe Photoshop CS2* und *ImageJ* (Wayne Rasband. NIH. USA) genutzt. Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 3* angefertigt. Bei der Literaturrecherche half *PubMed* von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Die Mikroskopie erfolgte mit *AxioVision Rel.4.5*. von Zeiss und die dreidimensionale Rekonstruktion mit *Amira 4.5* sowie *5.2.1 Visualization software*.

3.2. Methoden

3.2.1. Versuchstiere

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden unbehandelte adulte ca. 90 Tage alte 129Sv-Wildtyp-Mäuse und Aldosteronsynthase-Knockout-Mäuse genutzt.

Zur Stimulation des RAAS der Wildtypen erfolgte die Verabreichung von Niedrigsalzfutter (0,02% NaCl) in Kombination mit dem ACE-Inhibitor Enalapril (0,1 mg/ml entsprechend 10 mg/kgBW x d) für eine bzw. drei Wochen, was im Folgenden mit der Abkürzung LS+E/Dauer der Behandlung angegeben wird. Die Aldosteronsynthase-Knockout-Mäuse wurden ohne Enalapril nur durch Niedrigsalzfutter, ohne Kombination mit Enalapril, (0,02% NaCl) für zehn Tage stimuliert. Dies wird durch die Abkürzung LS/Dauer der Behandlung gekennzeichnet.

Jeweils eine Niere pro Tier wurde für die histologische Bearbeitung wie nachfolgend beschrieben perfundiert, während die andere, nach Schockfrost in N₂, bis zur RNA-Isolierung bei -80°C aufbewahrt wurde.

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

Folgende Tierstämme wurden in dieser Arbeit genutzt:

Tierstamm	Genetischer Hintergrund	Herkunft
129Sv	129Sv	Charles River, Sulzfeld
Aldosteronsynthase -/-	129Sv	Prof. Carsten Wagner, Zürich

3.2.2. Genotypisierung

Die Genotypisierung der verwendeten Tiere erfolgte mittels PCR. Die Extraktion der DNA erfolgte nach der NaOH-Methode.

Protokoll zur gDNA-Extraktion

- 2mm vom Mausschwanz abschneiden und im 1,5ml Cup mit 100µl 25mM NaOH mischen

- Inkubation im Thermocycler bei 96°C für 1h
- um den Schwanz aufzulösen gut vortexen
- Zugabe von 10µl Tris HCl, pH 8
- 6min zentrifugieren bei 10000rpm
- 2µl des Überstandes (gDNA) mit 18µl des PCR-Reaktionsansatzes vermischen

PCR-Reaktionsansatz	
4µl	Puffer (GoTaq buffer green)
2,5µl	dNTPs (10mM)
1µl	5`FW Primer (10pmol/µl)
1µl	Ex1 Rev Primer (10pmol/µl)
1µl	EGFP Rev Primer (10pmol/µl)
2µl	gDNA
0,3µl	GoTaq Polymerase
8,2µl	dd H2O

Der Forward Primer wird mit dem Reward Primer eingesetzt, um die für den Wildtypen spezifische Bande von 210 bp zu finden. Gleichzeitig wird der Forward Primer zusammen mit dem EGFP Reward Primer genutzt, um die gesuchte Knockout-Bande von 330 bp aufzuspüren. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

PCR-Programm		
Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1. 93°C	2min
35	2. 93°C	30s
	3. 62°C	30s
	4. 72°C	2min
1	5. 72°C	7min
1	6. 4°C	unbegrenzt

Danach wurden die PCR-Ansätze auf ein Agarosegel (1,5%) aufgetragen und die DNA-Fragmente, durch horizontale Gelelektrophorese, ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V.

Folgende Primer wurden verwendet:

Primer	Sequenzen
Fw Primer	5'-accagagcccaaagtctca-3'
Rev Primer	5'-ctgatgcatctccaggtga-3'
EGFR Rev Primer	5'-ctgaactgtggccgtttac-3'

3.2.3. Histologische Methoden

3.2.3.1. Fixierung des Nierengewebes

Durch die Fixierung des Gewebes wird der Erhalt der Zellstruktur in einem an die vitale Situation angenäherten Zustand gewährleistet. Außerdem wird durch die damit verbundene Härtung die Schneidefähigkeit des Präparates verbessert, was für die Herstellung der Serienschnitte eine wichtige Rolle spielt.

Retrograde arterielle Perfusion

Durch eine retrograde arterielle Perfusion mit 3% Paraformaldehyd in PBS erfolgte die Fixierung der Nieren der adulten Tiere. Zunächst wurden die Mäuse mit einer Kombination aus Ketamin und Xylazin (80mg/kg KG i.p.) in Narkose versetzt. Nach Öffnen des Abdomens und Freilegen der Bauchorta wurde die Aorta unterhalb des Abganges der Arteria renalis abgeklemmt, um eine Beeinträchtigung der Durchblutung der Nieren zu vermeiden. Distal der Klemme wurde der Perfusionskatheter eingeführt und fixiert. Zum Druckausgleich wurde die untere Vena cava geöffnet. Nach Entfernen der oberen Klemme wurden über diesen Katheter 10ml isotone NaCl-Lösung und 10 I.E./ml. Heparin retrograd perfundiert. Dabei zeigte sich eine rasche Entfärbung der Abdominalorgane. Danach erfolgte die Fixierung mit frisch angesetztem 3% Paraformaldehyd in PBS mit konstantem Fluss von 40ml/3 min. Bis zur Paraffineinbettung wurden die herausgenommenen perfundierten Nieren in 70% Methanol bei 4°C gelagert.

3.2.3.2. Einbettung in Paraffin

Zur Einbettung in Paraffin wurde zunächst eine schrittweise Dehydrierung des Nierengewebes in Gewebe-Einbettkassetten durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration vorgenommen:

- 2x30min 70% Methanol (RT)
- 2x30min 80% Methanol (RT)
- 2x30min 90% Methanol (RT)
- 2x30min 100% Methanol (RT)
- 2x30min 100% Isopropanol (RT)
- 1x30min 100% Isopropanol (45°C)
- Isopropanol/Paraffin (1:1)-Gemisch (55°C)

Anschließend wurde das Gewebe zweimal für mindestens 24h in auf 60°C temperiertes, geschmolzenes Paraffin eingebettet. Nachdem das Präparat auf diese Weise vollkommen mit flüssigem Paraffin durchtränkt war, erfolgte die Einbettung in mit 60°C warmem Paraffin gefüllte Silikon-Kautschuk-Einbettformen und die Aushärtung bei RT über Nacht.

3.2.3.3. Anfertigen von Paraffinschnitten und Entparaffinierung

Nach Abkühlung des Paraffins wurden die eingebetteten Präparate auf einen Holzblock aufgeklebt. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die in einem 40°C warmem Wasserbad gestreckt wurden. Nach dem Aufziehen auf superfrost plus Objektträger wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 40°C getrocknet.

Die Entparaffinierung erfolgte entsprechend folgendem Schema:

- 2x10min 100% Xylol
- 2x5min 100% Isopropanol
- 1x5min 96% Isopropanol
- 1x5min 80% Isopropanol
- 1x5min 70% Isopropanol

3.2.3.4. Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung dient dem Nachweis und der Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind.

Die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung nutzt zunächst primäre, unkonjugierte Antikörper, die an das Antigen im Gewebeschnitt binden. Daraufhin werden zweite, fluoreszierende Antikörper, die gegen den Fc-Teil des ersten unmarkierten Antikörpers gerichtet sind, hinzugefügt. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird durch die Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge sichtbar gemacht. Im Folgenden soll anhand eines Protokolls eine schematische Übersicht über die immunhistochemischen Abläufe, die direkt im Anschluss an die Entparaffinierung stattfanden, erfolgen:

Protokoll:

Tag 1

Vorbereitung

- Waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer auf dem Schüttler: 3 x 5 min bei RT
- Herstellung der Stammlösung: PBS-Otto/1 % BSA (Filtration nach Auflösen des BSA)
- Herstellung der Blockierlösung: 10 % HS in PBS/1 % BSA (Vortex-Anwendung)
- Absaugen des Puffers
- Auflegen der Objektträger auf Feuchtkammern
- Umrandung der Schnitte mit Liquid-Blocker-Markierstift

Blockieren

- Blockierlösung auftragen und 20min bei RT Inkubation der Präparate auf dem Schüttler (zur Reduktion unspezifischer Bindungen)
- Absaugen der Blockierlösung

Primärantikörper

- Herstellung der Verdünnungen
 - Anti-Renin-IgG: Verdünnung 1:200 in Blockierlösung, Vortex-Anwendung
 - Anti-Glattmuskellaktin-IgG: Verdünnung 1:50 in Blockierlösung, Vortex-Anwendung
- Primärantikörperverdünnungen auftragen (ca 50µl pro Schnitt)
- Inkubation über Nacht bei 4°C im Kühlschrank

Tag 2

Waschen

- Absaugen der Primärantikörper
- 3x5min Waschen der Schnitte in PBS/1 % BSA auf dem Schüttler (zur Entfernung überschüssiger Primärantikörper), abschließend absaugen

Sekundärantikörper

- Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Sekundärantikörper unter Lichtausschluss
- Herstellung der Verdünnungen:
 - Cy2-konjugierter Donkey-Anti-Chicken-IgY: Verdünnung 1:400 in PBS/1 % BSA, Vortex-Anwendung, Zentrifugieren
 - Rhodamin-TRITC-konjugierter Donkey-Anti-Mouse-IgG: Verdünnung 1:400 in PBS/1 % BSA, Vortex-Anwendung, Zentrifugieren
- Auftragen der Sekundärantikörperverdünnung
- Inkubation für 90min bei RT im Dunkeln

Objektträger

- 3x5min Waschen der Präparate in PBS auf dem Schüttler im Dunkeln
- Fixierung der Schnitt auf Objektträgern mit Deckgläsern durch Dako Glycergel Mounting Medium
- Aufbewahrung im Kühlschrank

3.2.4. Dreidimensionale Rekonstruktion

3.2.4.1. Mikroskopie und Digitalisierung

Die Aufnahme und Digitalisierung der gefärbten Schnitte erfolgte mittels eines Axiovert 200M Mikroskops mit motorisierter Objektaufgabe, einer Schwarz-weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) und der Software AxioVision LE Rel.4.5. von Zeiss. Renin wurde mit einem Cy2-Fluoreszenzfilter mit einer Wellenlänge von 450-490nm angeregt und so bei einer Emission von 500-550nm grün sichtbar. Für Glattmuskelaktin hingegen wurde ein Rhodamin-(TRITC)-Filter mit einer Wellenlänge von 533-558nm verwendet. Dadurch ergab sich ein rotes Fluoreszenzsignal für Renin mit einer Emission von 570-640nm. Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte in 50-facher Vergrößerung für die Übersichtsbilder und in 200-facher sowie 630-facher Vergrößerung für die Detailansichten.

AxioVision LE Rel.4.5

Zunächst wurden die Kanalfarben rot und grün gewählt und ihre Belichtungszeiten eingestellt. Dann wurde ein Übersichtsbild aller Schnitte auf dem Objektträger erstellt. Um Bilder der gewünschten Größe erstellen zu können, wurden jeweils vier einzelne Bilder, die sich zu 15% überlappten, zusammengelegt. Die Überlappungsunregelmäßigkeiten konnten durch das Sticking ausgeglichen werden. Schließlich wurde zur Konvertierung der Kachelbilder ein Helligkeitsausgleich vorgenommen sowie das jeweilige Overlay-Bild benannt und im Rot-Grün-Blau (RGB)-Farbraum im zvi-Format gespeichert.

Zur weiteren Bearbeitung der Daten wurde eine Konvertierung auf 8 Bit vorgenommen. Das Grafikformat TIFF wurde verwendet, um einen Qualitätsverlust zu vermeiden:

- Bild öffnen
- Datei → Exportieren → *.tif
- Starten der Stapelverarbeitung

3.2.4.2. Datenaufbereitung mittels ImageJ

Bildstapelgenerierung

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

- alle Serienbilder öffnen
- PLUGINS
- STACKS
- STACK BUILDER

Zuvor wurde im Photo Shop CS2 das, bzgl. der Formatdimensionen, größte Bild erzeugt und den Serienbildern hinzugefügt. Dadurch erhielt man einen Stack aller Nierenschnitte mit gleich großen Bildern, der als IMAGE SEQUENCE gespeichert wurde. Das im weiteren Verlauf der Bearbeitung nicht mehr verwendete Formatierungsbild konnte danach aus dem Stack entfernt werden.

3.2.4.3. Rekonstruktion mittels Amira

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Daten anschließend in die *Amira 5.2.1* Visualization Software auf einer Grafik-Workstation importiert. Um eine korrekte Skalierung der Daten zu gewährleisten, musste zunächst die Pixelgröße in μm berücksichtigt werden. Dies ist ein objektiv- und kameraabhängiger Wert (bei einer Verwendung des 10x Objektivs: 1Pixel=1x1 μm). Bezogen auf die maximalen Abmessungen des Bildstapels (Länge x und Breite y) und die Gesamtzahl der Schnitte und der Schnittdicke (z) wurde die BOUNDINGBOX festgelegt, welche die maximalen Abmessungen des Datensatzes in jeder Ebene beschreibt. Im Folgenden wurde anstelle des Wortes Pixel der Begriff Voxel verwendet, da nun mit dreidimensionalen Daten gearbeitet wurde. Ein Voxel stellt, der Geometrie des Raumes entsprechend, eine quaderförmige Zelle dar. Die dritte Dimension entspricht der Schnittdicke. Ein Voxel hat somit z.B. 1x1x5 μm .

Farbkanaltrennung

Um mit der Rekonstruktionssoftware die Fluoreszenzmarkierungen anhand der Grauwerte der Voxel von jedem aufgenommenen Bild zu erkennen, wurde der nun gleichgroße RGB-Bildstapel wieder in seine einzelnen monochromen Kanäle aufgetrennt. Dadurch konnte später eine separate Datensegmentierung vorgenommen werden:

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

Alignierung

Um die auf den Objektträgern noch variabel angeordneten histologischen Schnitte ausgerichtet zusammenzufügen, mussten je immer zwei aufeinander folgende Schnitte aligniert werden. Das bedeutet, dass diese über Rotations- und Verschiebewegungen zur Deckung gebracht wurden. Angewendet auf alle Schnitte entstand eine vollständig ausgerichtete Niere. Zuerst wurden die Aktin-Daten aligniert, da aufgrund zahlreicherer Immunreaktionen eine bessere Alignierung möglich war. Die Renin-Daten konnten dann unter Verwendung des Aktin-Stapels als Referenz auf dieselben Positionen gedreht werden, um Deckungsgleichheit zu erreichen.

- COMPUTE
- ALIGN SLICES

- EDIT
- Automatische Alignierung und manuelle Feinabstimmung
- RESAMPLE

Datensegmentierung

Die Datensegmentierung, das sogenannte Labeln, stellte den zeitintensivsten Teil der Rekonstruktion dar. Dabei wurden interessante Strukturen durch verschiedene Verfahren markiert. Diese Markierungen mussten einem definierten Material zugeordnet werden, um später daraus die Oberfläche für dieses Objekt berechnen zu können.

- LABELLING
- LABEL FIELD

Für das Labeln der Immunreaktionen stehen verschiedene Werkzeuge zur Verfügung:

- BRUSH: Fluoreszenzsignale können im Freihandmodus umfahren werden.
- MAGIC WAND: Dabei kann man sich die unterschiedliche Verteilung der Grauwerte (0=schwarz bis 255=weiß) zunutze machen. So können Immunfluoreszenzsignale durch Festlegen einer Grauwert-Schwelle markiert werden.
- FILL HOLES: füllt Löcher in Materialien.
- REMOVE ISLANDS: um kleine Material-Inseln (Artefakte) automatisch entfernen zu lassen.
- SMOOTH LABELS: um kantige Ränder der Materialien zu glätten.
- THRESHOLD: ermöglicht ähnlich der MAGIC WAND eine Selektion aller Voxel in einem definierten Grauwertbereich. Der Unterschied liegt darin, dass THRESHOLD sich auf den ganzen Schnitt auswirkt, während MAGIC WAND nur den mit dem ausgewählten Voxel verbundenen Bereich markiert.
- INTERPOLATE: eine fehlende Struktur lässt sich durch Selektion auf dem Schnitt vor und nach dem Fehler durch eine Interpolation berechnen.
- WRAP: ermöglicht durch Selektion des Anfangs, der Mitte und des Endes eines Glomerulus auf den Schnitten, die Rekonstruktion der runden oder ovalen Glomeruli.

Sämtliche Segmentierungsfunktionen konnten auf alle Schnitte oder nur auf den aktuellen Schnitt angewandt werden. Die markierten Strukturen wurden anschließend einem Material zugeordnet, aus dem später die Oberfläche berechnet werden konnte.

Aus den Aktin-Daten wurden anhand der Fluoreszenzsignale die Gefäße und aus den Renin-Daten die reninpositiven Zellen rekonstruiert. Die Strukturen der Kapsel und der Glomeruli konnten aufgrund der Eigenfluoreszenz der Präparate erkannt und gelabelt werden.

Oberflächengenerierung

Die Label-Dateien waren die Grundlage der Berechnung der 3D-Modelle. Aus jedem Material wurde eine separate Oberfläche berechnet und räumlich dargestellt:

- SURFACE GEN
- Anhängen von SURFACEVIEW zur Darstellung der Oberfläche

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

- SURFACE-EDITOR: um überflüssige Ausschnitte zu entfernen
- SIMPLIFIER: Reduktion der Polygonzahl, und somit der Datenmenge
- PARAMETER-EDITOR: Einstellen der Farben der Materialien
- COMPUTE → SMOOTH SURFACE: Glätten der Oberfläche

Nun konnte das Objekt rotiert und räumlich analysiert werden. Die Darstellungsform konnte unter SURFACE VIEW z.B. in transparent geändert werden. Außerdem konnten die Schnittbilder durch den Datensatz angezeigt werden. Des Weiteren konnten die Volumina und Flächen der einzelnen Modelle gemessen werden.

3.2.5. Molekularbiologische Methoden

3.2.5.1. Isolierung von Total-RNA aus Nieren

Zur RNA-Isolierung wurde das TRIzol-Reagenz nach dem dazugehörigen Protokoll des Herstellers verwendet. Die Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Das TRIzol-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat. Durch Chloroform wird das Homogenisat in drei Phasen aufgespalten. Danach wird die RNA mit Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt. Bei allen Vorgängen wurden hierbei Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel sowie Geräte verwendet, um eine RNase-Kontamination zu verhindern. Benötigte Puffer und Lösungen wurden mit Diäthylen-pyrocyanat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Außerdem fanden alle Vorgänge auf Eis statt.

Kurzprotokoll zur RNA-Isolation mit TRIzol-Reagenz

- 1ml TRIzol-Reagenz für ½ adulte Mausniere in Sastedt-Tubes auf Eis vorlegen
- Nieren direkt aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen geben und ca. 30s homogenisieren
- Mix in 2ml Eppis überführen, 5min bei RT ruhen lassen (Proteine denaturieren, lösen sich in Phenol)
- 1/5 Vol. (für ½ adulte Niere also 200µl) Chloroform zugeben, schütteln (nicht vortexen)
- 20min bei 4°C bei 12000rpm zentrifugieren
- ca. 500µl wässrigen Überstand in 1,5ml Eppi geben, dabei auf keinen Fall die Interphase mitnehmen (unten rote Phenolphase, dazwischen Interphase mit hydrophilen Proteinen)
- wässrige Phase 1:1 (500µl) mit Isopropanol vermischen, kräftig schütteln
- 10min bei RT RNA ausfällen
- 10min bei 4°C bei 12000rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 1ml 75% Ethanol aufnehmen
- 5min bei 4°C bei 7500rpm zentrifugieren, Überstand abkippen
- Pellet 10min bei RT trocknen und in 300µl RNase-freiem Wasser lösen
- max. 2min bei 65°C in den Schüttler resuspendieren, bei -80°C lagern

Quantifizierung der RNA

Ein Photometer diente der Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA im Wellenlängenbereich von 260nm und 280nm. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260nm und 280nm ergab sich die Qualität der isolierten RNA. Für die Versuche wurde nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0 verwendet.

3.2.5.2. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die isolierte RNA konnte mittels reverser Transkription in copy DNA (cDNA) übersetzt werden. In dieser Form sind die Informationen, die ursprünglich auf der RNA gespeichert waren, stabiler konserviert und lassen sich mit der PCR-Technik analysieren. Oligo(dT)15-Ketten wurden als Primer verwendet, um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren.

10µl Ansatz	
1µg	Gesamt-RNA
1µl	Oligo-(dT)15 Primer (0,5µg/µl)
add	DEPC-H2O
	5min auf 65°C erhitzt, anschließend sofort auf Eis stellen

Zu dem Reaktionsgemisch (10µl) wurde daraufhin folgender Ansatz gegeben:

Mix	
1µl	M-MLV Reverse Transkriptase (100U)
4µl	dNTPs (2,5mM)
4µl	Puffer (5x first strand buffer)
3µl	DEPC-H2O

Die cDNA-Synthese erfolgte daraufhin bei 37°C für 1h. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 2 min auf 94°C erhitzt um das Enzym zu inaktivieren. Für die quantitative PCR wurde die erhaltene cDNA mit 20µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.2.5.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)

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

Bei dieser molekularbiologischen Methode wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch bestimmt. Dadurch ist es möglich den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) nachzuvollziehen. Durch die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green kann indirekt die Produktmenge ermittelt werden. SYBR Green bindet mit hoher Affinität in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA und fluoresziert in gebundener Form 1000-fach stärker als in freier Form. Dabei ist die Signalintensität proportional zur entstehenden DNA-Menge.

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

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

Die Fluoreszenzmessung steht am Ende jedes Zyklus. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und währenddessen die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. GAPDH diente hier als Housekeeper.

Der Renin-mRNA-Gehalt pro Niere wurde mittels der Gesamtausbeute an extrahierter RNA und des Renin-mRNA-Levels ermittelt. Demnach konnten die jeweiligen Renin-mRNA-Levels der adulten Nieren der Versuchstiere verglichen werden.

4. Ergebnisse

Um die Anzahl und das Verteilungsmuster von reninbildenden Zellen in Nieren, in denen das RAAS durch unterschiedliche Salzdiäten chronisch stimuliert wurden, mit Nieren von RAAS-Mutanten, wie den Aldosteronsynthase-Knockout-Mäusen, zu vergleichen, wurden neben zweidimensionalen Schnitten auch dreidimensionale Rekonstruktionen von charakteristischen Teilen des Gefäßsystems der Nieren angefertigt. Es wurden Normalsalzdiäten (NS) mit 0,4% Natriumchlorid oder Niedrigsalzdiäten (LS) mit 0,02% Natriumchlorid verwendet. Die Niedrigsalzdiät wurde teilweise in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril genutzt (LS/E). Folgender Ausschnitt beinhaltet efferente sowie afferente Arteriolen und Interlobulararterien bis hin zu einem Anschnitt eines arcuaten Seitenastes. Folglich war unter anderem die Bestimmung der Lokalisation reninexprimierender Zellen und die Beschreibung der Beschaffenheit der Gefäße möglich. Außerdem wurde eine quantitative Bestimmung des Reningehaltes vorgenommen. Zum einen wurde das Volumen von Renin bezogen auf das Volumen von Glattmuskelaktin in der dreidimensionalen Rekonstruktion gemessen. Zum anderen wurde die mRNA von Renin im Bezug auf GAPDH bestimmt.

Zunächst soll auf die Beschaffenheit der Niere des Wildtypen unter Normalsalzdiät eingegangen werden, um anschließend die Veränderungen unter Salzdepletion und bei der Knockout-Niere zu verdeutlichen.

4.1. 3D-Rekonstruktion und zelluläre Analyse

4.1.1. Wildtyp bei Normalsalzdiät (WT NS)

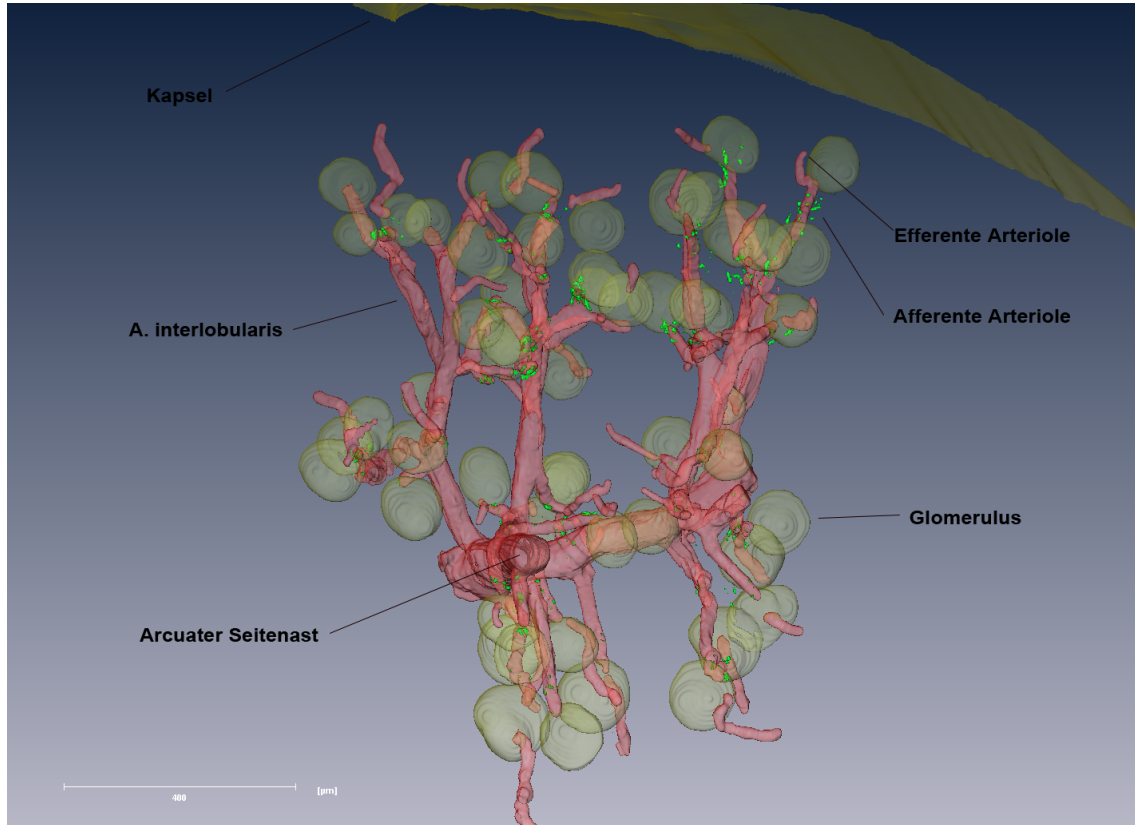


Abbildung 5: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Mauseiere des Wildtypen unter NS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm

Die 3D-Rekonstruktion (Abbildung 5) des Wildtypen unter NS zeigt, dass die Reninzellen begrenzt auf die afferenten Arteriolen auftreten. Sie sind in Nähe der Glomeruli anzutreffen. Reninzellen lassen sich an jedem einzelnen terminalen Ende der afferenten Arteriolen finden. Im Gegensatz zu den afferenten sind die efferenten Arteriolen komplett frei von reninproduzierenden Zellen. Gleiches gilt auch für die A. interlobulares sowie die größeren vorgeschalteten Gefäße. Der Gefäßbaum des Wildtypen ist schlank und anatomisch unauffällig. Aus dem arcuaten Seitenast entspringen langgestreckte Interlobulararterien in Richtung Kapsel. In Abbildung 5 sind vier dieser Arterien dargestellt. Davon gehen afferente Arteriolen in unregelmäßigen Abständen ab. In Richtung der Medulla gehen aus dem arcuaten Seitenast keine Interlobulararterien, sondern direkt afferente Arteriolen ab. Diese sind länger als die afferenten Arteriolen, die von Interlobulararterien abgehen. Auch die Glomeruli, die an diesen afferenten Arteriolen angrenzen, sind größer als die in Kapselnähe.

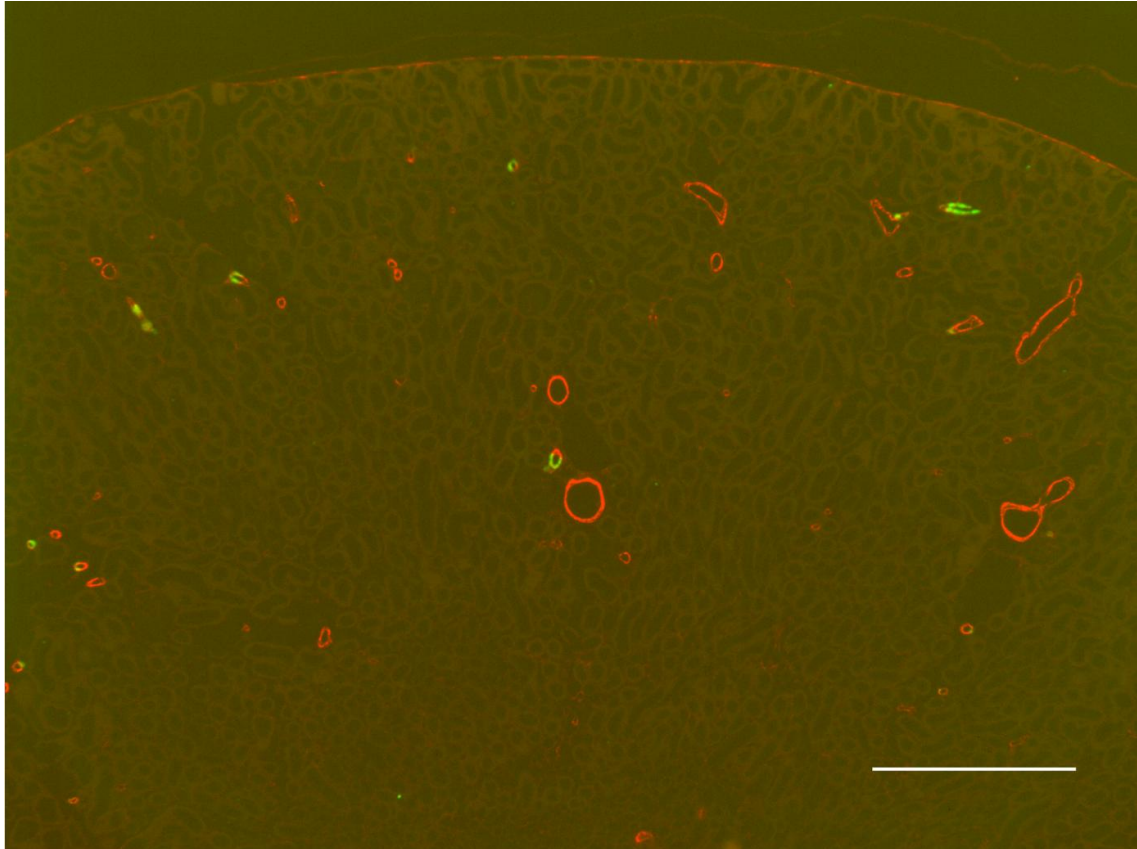


Abbildung 6: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500µm

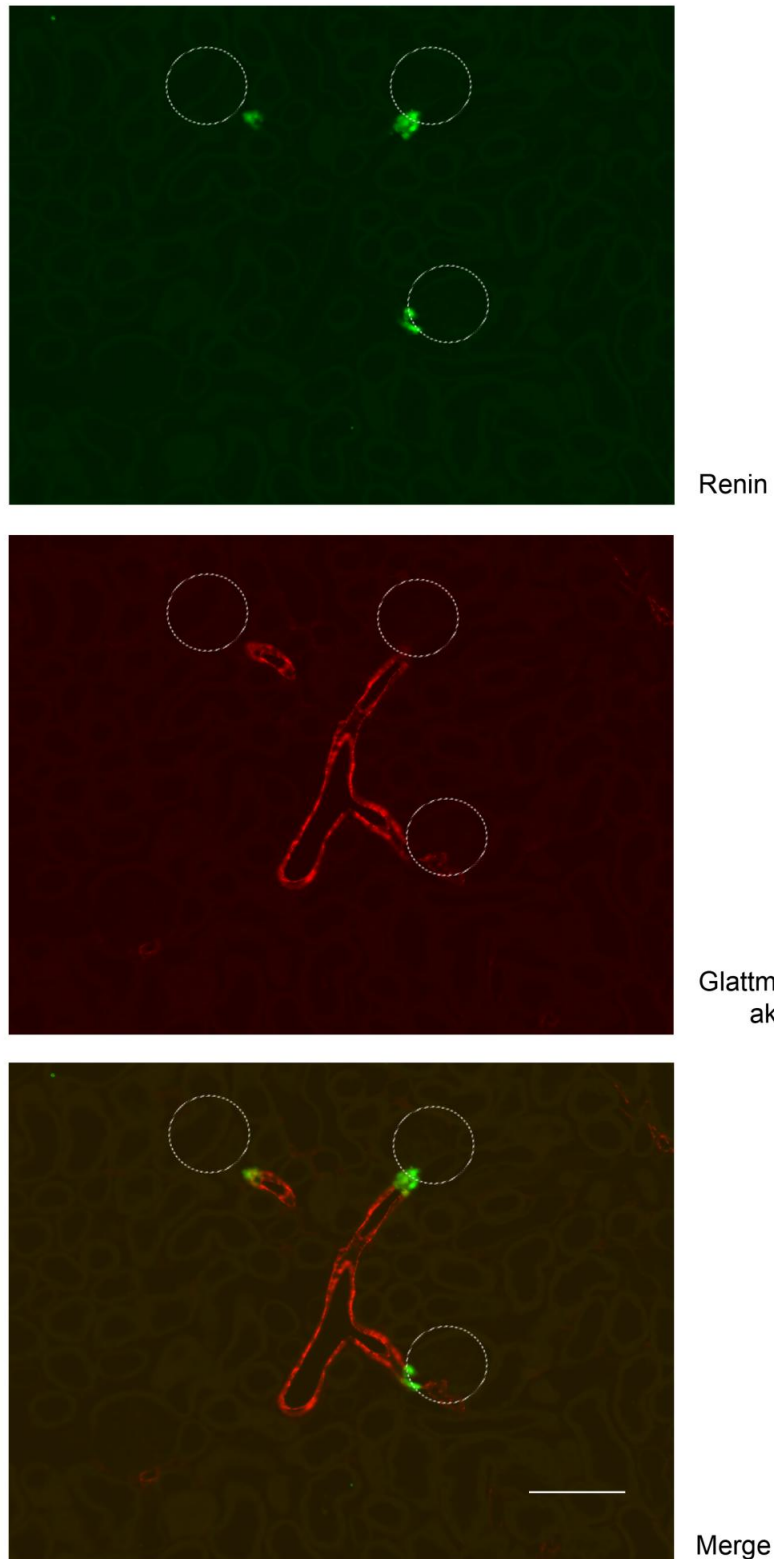


Abbildung 7: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 200-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 100µm

In der zellulären Analyse (Abbildung 6; Abbildung 7) wird deutlich, dass die reninproduzierenden Zellen der afferenten Arteriolen in der Mediaschicht einreihig

lokalisiert sind. Sie sind nur am vaskulären Gefäßpol dicht nebeneinander vertreten. In der Immunfluoreszenzfärbung fällt die typische kubische Form der Reninzellen in der Media-Schicht auf, welche dort anstelle von Glattmuskelaktinzellen liegen.

Das Reninexpressionsmuster und die Beschaffenheit des Gefäßsystems dieser Niere entsprechen einer gewöhnlichen Wildtyp-Niere. Im Folgenden wird sie zum Vergleich mit den Nieren unter LS-Diät sowie den Knockout-Nieren herangezogen, um Unterschiede darzustellen.

4.1.2. Wildtyp nach Salzdepletion in Kombination mit Enalapril für eine Woche (WT LS/E 1 Wo)

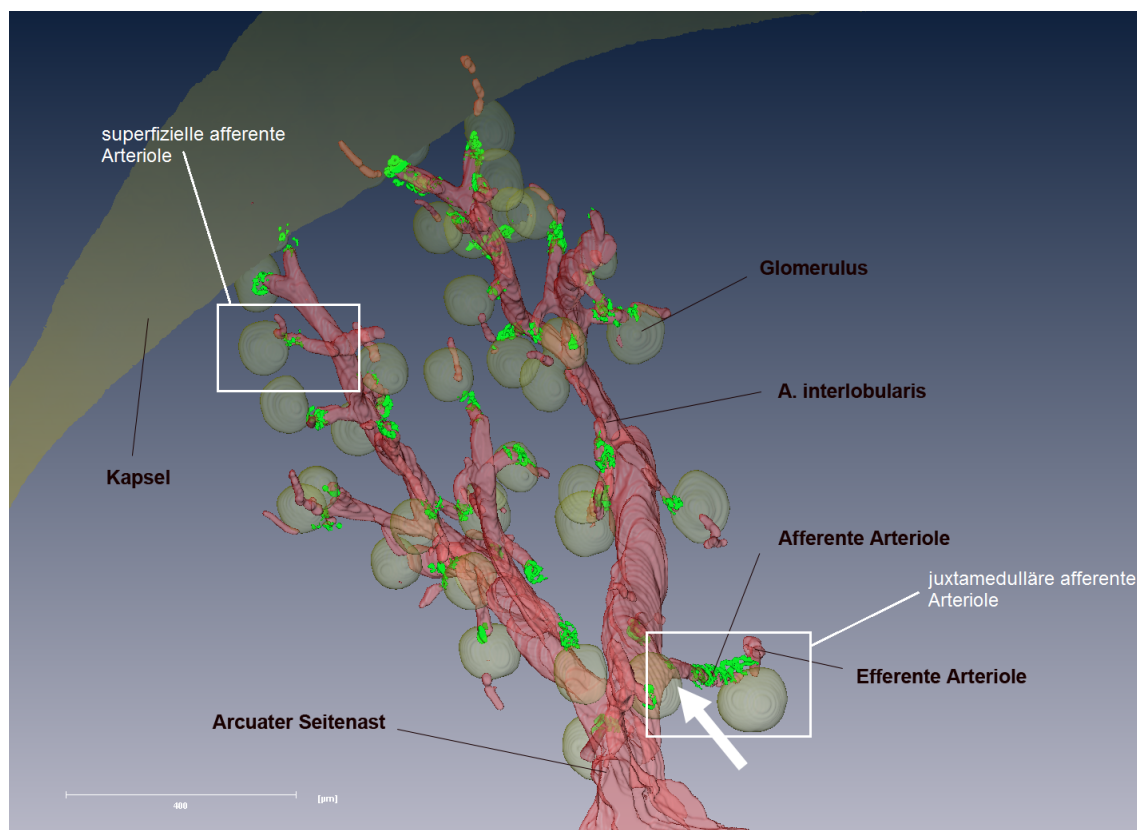


Abbildung 8: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Mausniere des Wildtypen nach einer Woche LS/E-Diät (Umrandungen: Vergleich der Ausprägung retrograden Rekrutierung an superfiziellen und juxtamedullären afferenten Arteriole; Pfeil: afferente Arteriole, die direkt aus dem arcuaten Seitenast abgeht); Maßstabsbalken: 400µm

Nach einer Woche Stimulation des Wildtypes mit LS-Diät und Enalapril finden sich in der dreidimensionalen Darstellung (Abbildung 8) augenscheinlich quantitativ mehr

Reninzellen in der Niere im Vergleich zum unstimulierten Wildtypen. Die Stimulation bewirkt eine retrograde Rekrutierung entlang der afferenten Arteriolen. Die Zellen treten entlang der afferenten Arteriolen in Richtung zu den Interlobulararterien auf. Es erfolgt keine Ausbreitung auf die Interlobulararterien und die arcuaten Seitenäste. Die efferenten Arteriolen sind ebenfalls komplett frei von Renin. Die Rekrutierung scheint an den juxtamedullären afferenten Arteriolen stärker ausgeprägt zu sein als an den superfiziellen afferenten Arteriolen (Abbildung 8: Umrandungen). In der dreidimensionalen Betrachtung zeigt sich eine vermehrte Reninexpression vor allem in afferenten Arteriolen, die bereits direkt aus dem arcuaten Seitenast abgehen (Abbildung 8: Pfeil). Der Gefäßbaum stellt sich entsprechend dem Wildtypen ohne LS/E-Diät schlank und homogen dar.

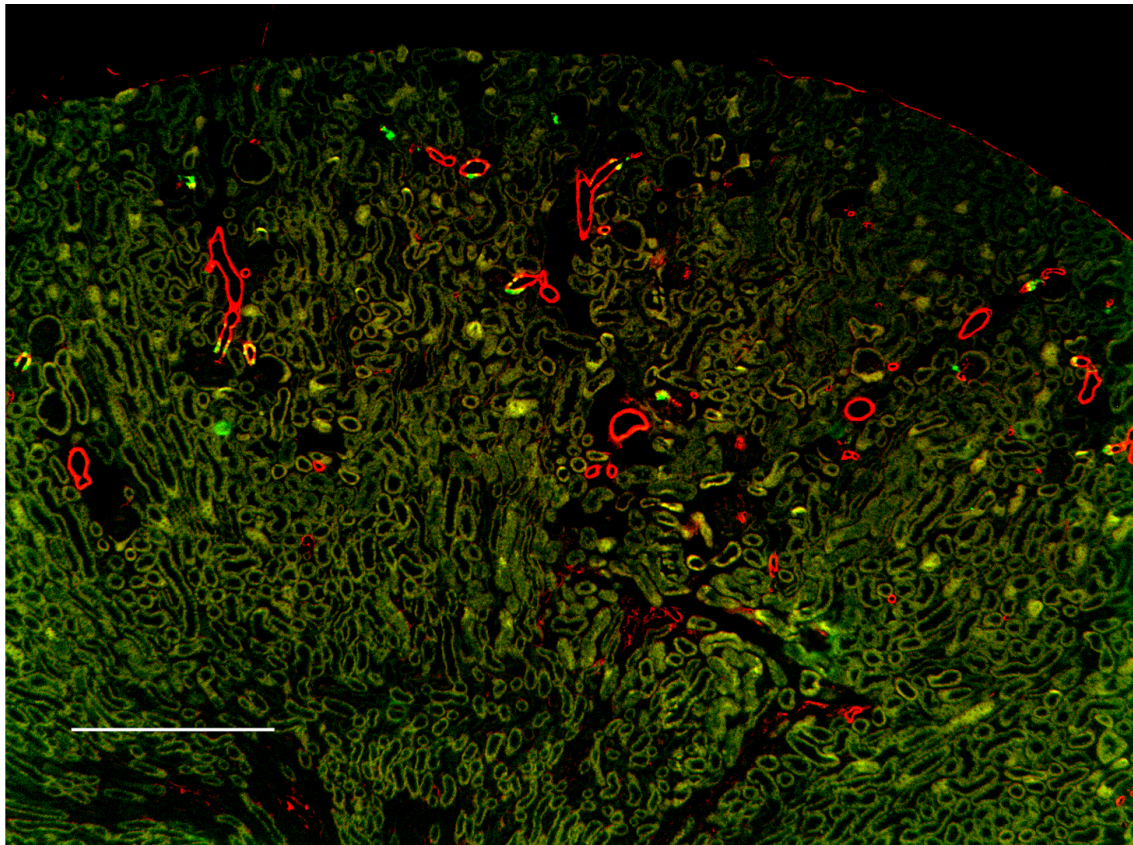
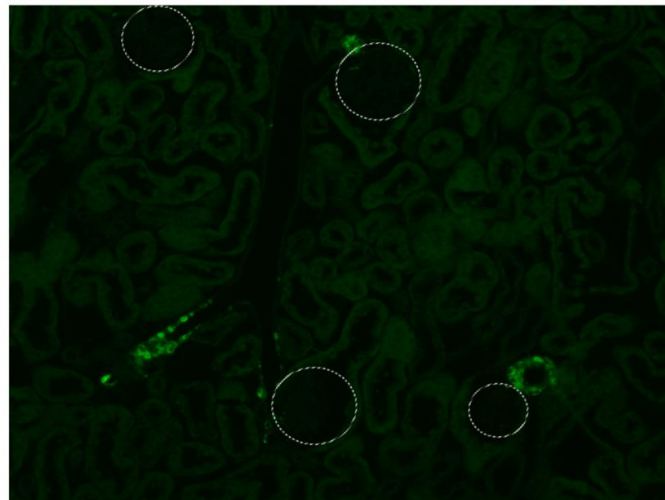
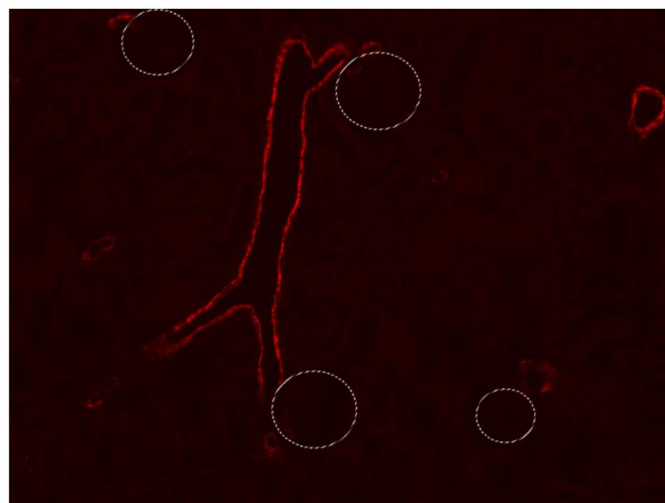


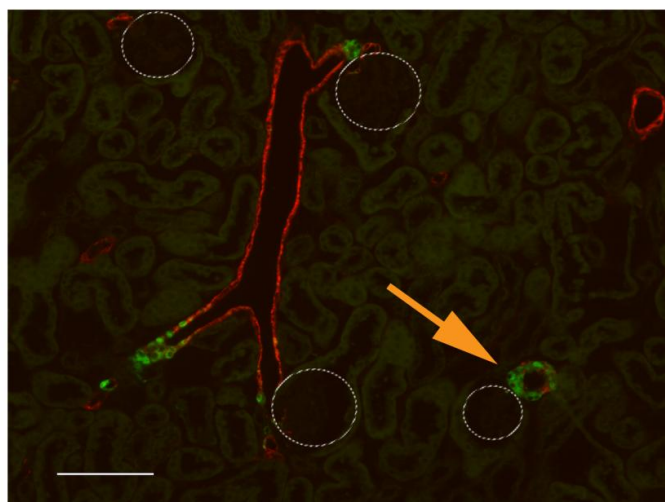
Abbildung 9: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach einer Woche LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500µm



Renin



Glattmuskel-
aktin



Merge

Abbildung 10: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach einer Woche LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); Pfeil: mehrschichtige Reninzellen; 200-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 100µm

Auch die histologische Betrachtung (Abbildung 9; Abbildung 10) weist auf einige Veränderungen hin. Es ergeben sich, verglichen mit dem Wildtypen, unter NS-Diät vermehrt reninproduzierende Zellen. Diese sind hauptsächlich einschichtig formiert, treten aber juxtamedullär hin und wieder zweischichtig auf (Abbildung 10: Pfeil). Die kubischen Reninzellen sind größtenteils auf die Media der afferenten Arteriolen beschränkt. Die Kolokalisation von Renin und Glattmuskelaktin kann entsprechend dem unstimulierten Wildtyp weitgehend festgestellt werden. Lediglich direkt in Nähe der Glomeruli ist diese Kolokalisation weniger oft zu beobachten.

4.1.3. Wildtyp nach Salzdepletion in Kombination mit Enalapril für drei Wochen (WT LS/E 3 Wo)

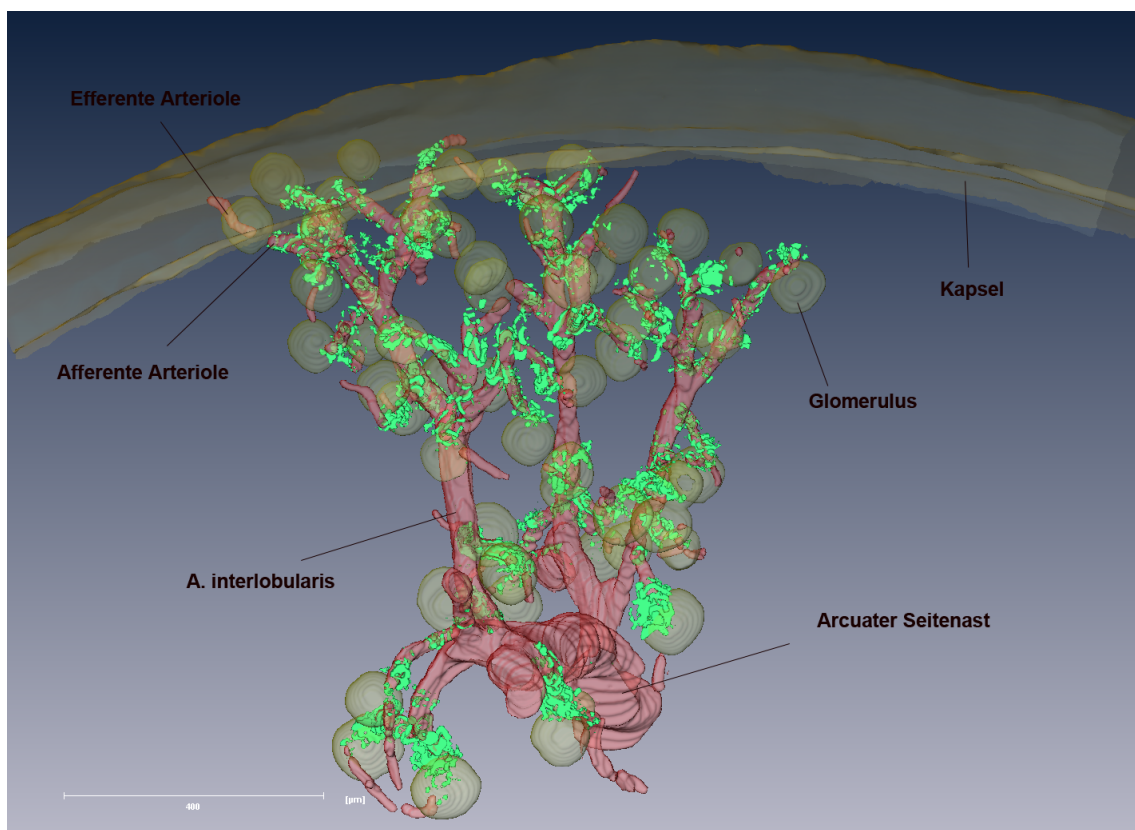


Abbildung 11: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Mausniere des Wildtypen nach drei Wochen LS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm

Wie die Abbildung 11 zeigt, erhöht eine längere Stimulation von drei Wochen mit LS in Kombination mit Enalapril die Reninexpression in der Wildtypniere weiter. Bei dieser verstärkten retrograden Rekrutierung sind nun reninproduzierende Zellen nicht länger

nur auf die afferenten Arteriolen begrenzt. Sie weiten sich auch auf die A. interlobulares aus. Hier treten sie punktuell auf. Der arcuate Seitenast und die efferenten Arteriolen bleiben frei von reninbildenden Zellen. Die bereits aus dem arcuaten Seitenast abgehenden afferenten Arteriolen zeichnen sich durch mehr Renin aus als andere afferente Arteriolen, die aus einer A. interlobularis abgehen. Die juxtamedullären afferenten Arteriolen weisen deutlich mehr Renin auf als die des Wildtyps nach einer Woche Stimulation. In Abbildung 13, Abbildung 14 und der 3D-Rekonstruktion ist eine Clusterbildung der Reninzellen zu erkennen. Sie werden zum Glomerulus hin zunehmend mehrreihig. Die Gefäße im gesamten Verlauf sind schlank und unauffällig.

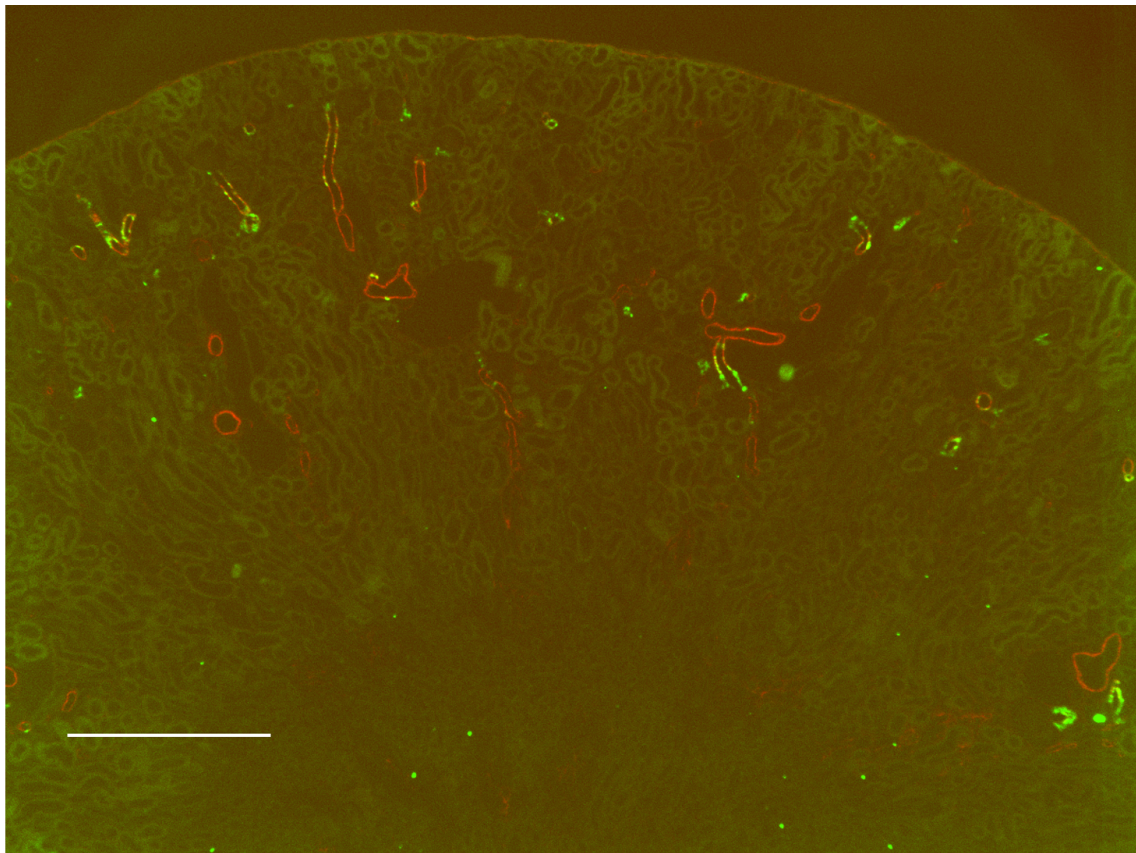


Abbildung 12: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach drei Wochen LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500µm

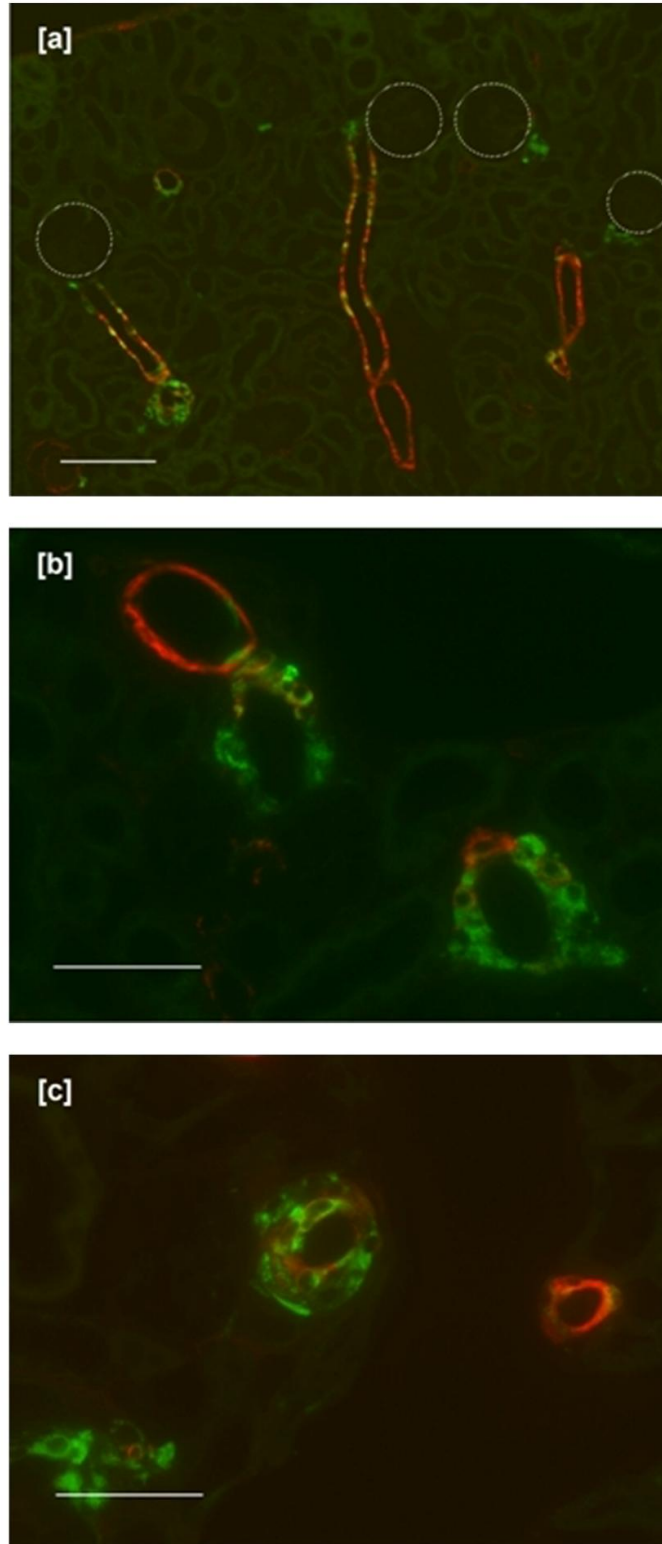
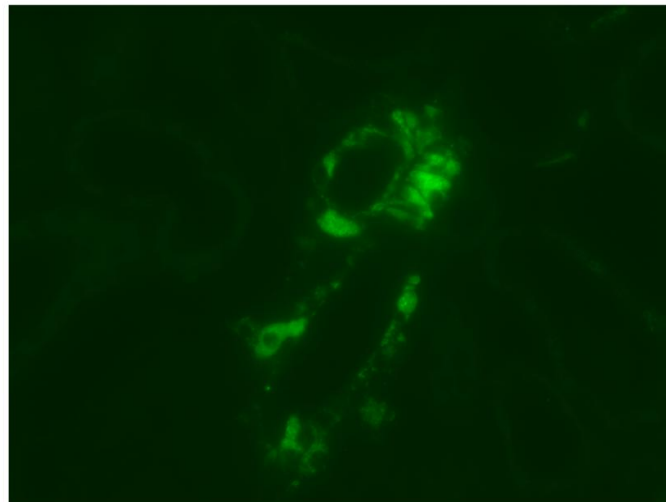
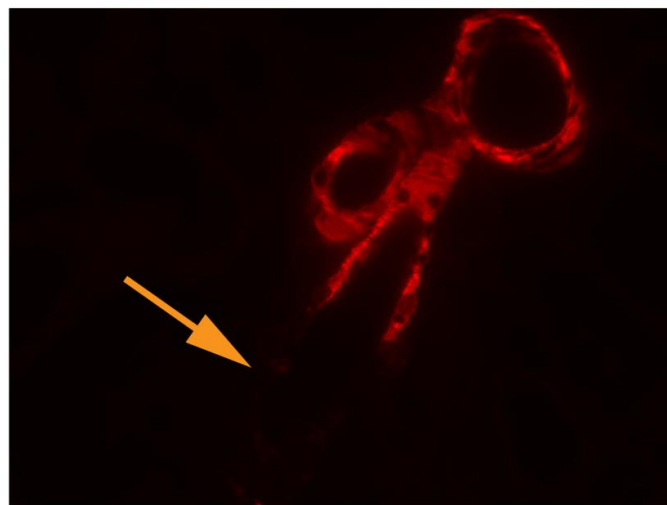


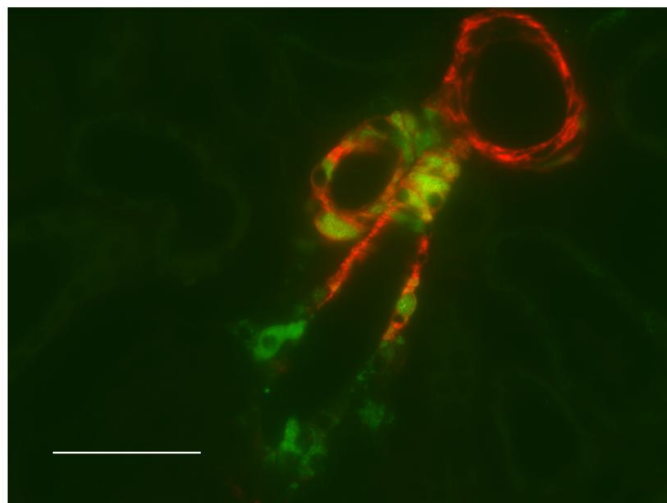
Abbildung 13: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach drei Wochen LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); Vergrößerung; [a] 200-fach, [b] und [c] 630-fach; Maßstabsbalken: [a] 100µm, [b] und [c] 50µm



Renin



Glattmuskel-
aktin



Merge

Abbildung 14: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach drei Wochen LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kollokalisation beider Immunreaktionen (gelb); Pfeil: Glattmuskelaktinfreie Zellen; 630-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 50µm

Auch in der zellulären Analyse (Abbildung 12; Abbildung 13; Abbildung 14) ist eine vermehrte Reninexpression erkennbar. Neben der erweiterten retrograden Ausdehnung entlang der Gefäße werden die Reninzellen nach drei Wochen LS/E Stimulation zusätzlich zum Glomerulus hin mehrreihig. Diese Formierung kann als Cluster bezeichnet werden. Hier werden zusätzliche Zellen rekrutiert. Am vaskulären Pol ist neben der Reninexpression gar keine Glattmuskelaktinexpression mehr vorhanden (Abbildung 14: Pfeil), im Gegensatz zu den vorgeschalteten Zellen, die sowohl Renin als auch Glattmuskelaktin exprimieren. Im Unterschied zu dem Wildtypen mit NS-Diät liegen die Reninzellen nicht immer in der Media der Gefäße, sondern sind zum Teil aufgesetzt.

4.1.4. Aldosteronsynthese-Knockout-Maus bei Normalsalzdiät (KO NS)

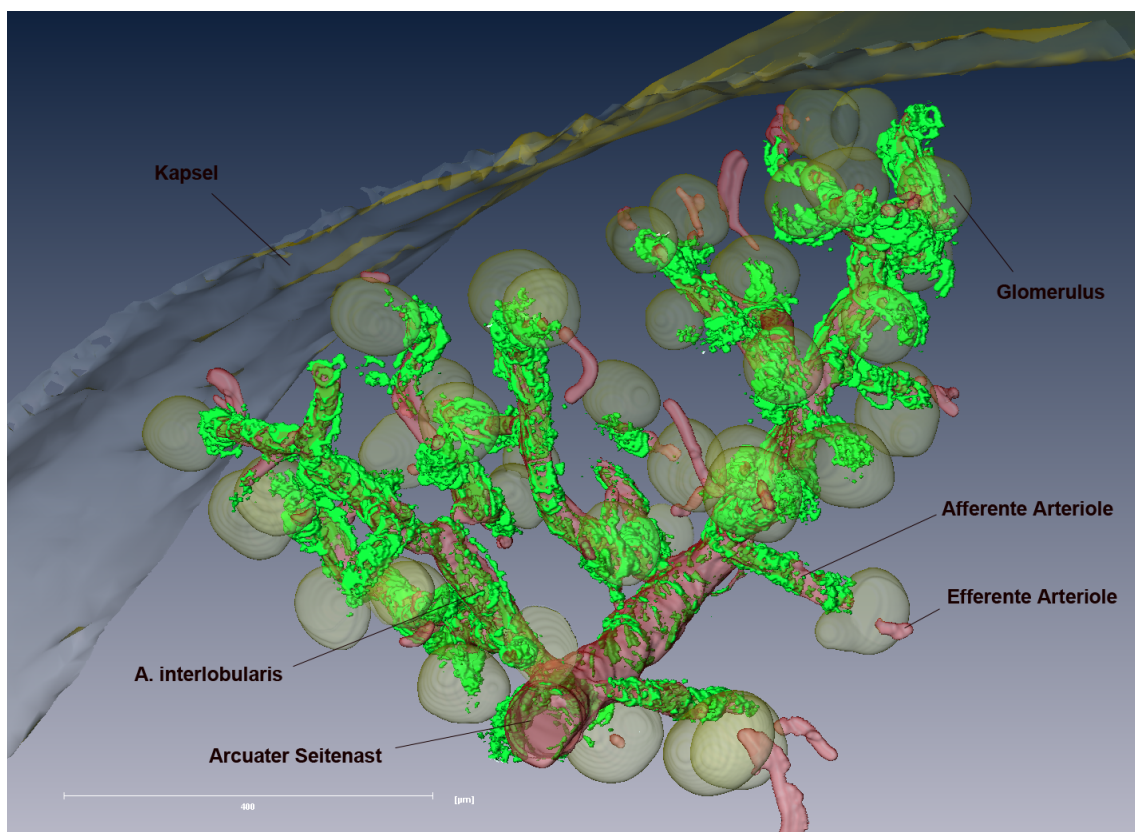


Abbildung 15: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere unter NS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm

Abbildung 15 zeigt die starke Reninexpression der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus ohne Salzdepletion. Sie ist dem Wildtypen mit NS-Diät gegenüber deutlich gesteigert. Bei der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus erfolgt die retrograde Rekrutierung von

reninbildenden Zellen von den afferenten Arteriolen über die Interlobulararterien bis hin zum arcuaten Seitenast. Dabei findet sich Reninexpression nahezu auf der gesamten Länge der afferenten Arteriolen. Die Interlobulararterien sowie der arcuate Seitenast sind hingegen eher punktuell und nicht ganz durchgängig betroffen. Lediglich die efferenten Arteriolen sind frei von Renin. Ein verstärktes Auftreten von reninbildenden Zellen an den juxtamedullären afferenten Arteriolen gegenüber den superfiziellen afferenten Arteriolen scheint nicht erkennbar aufzutreten.

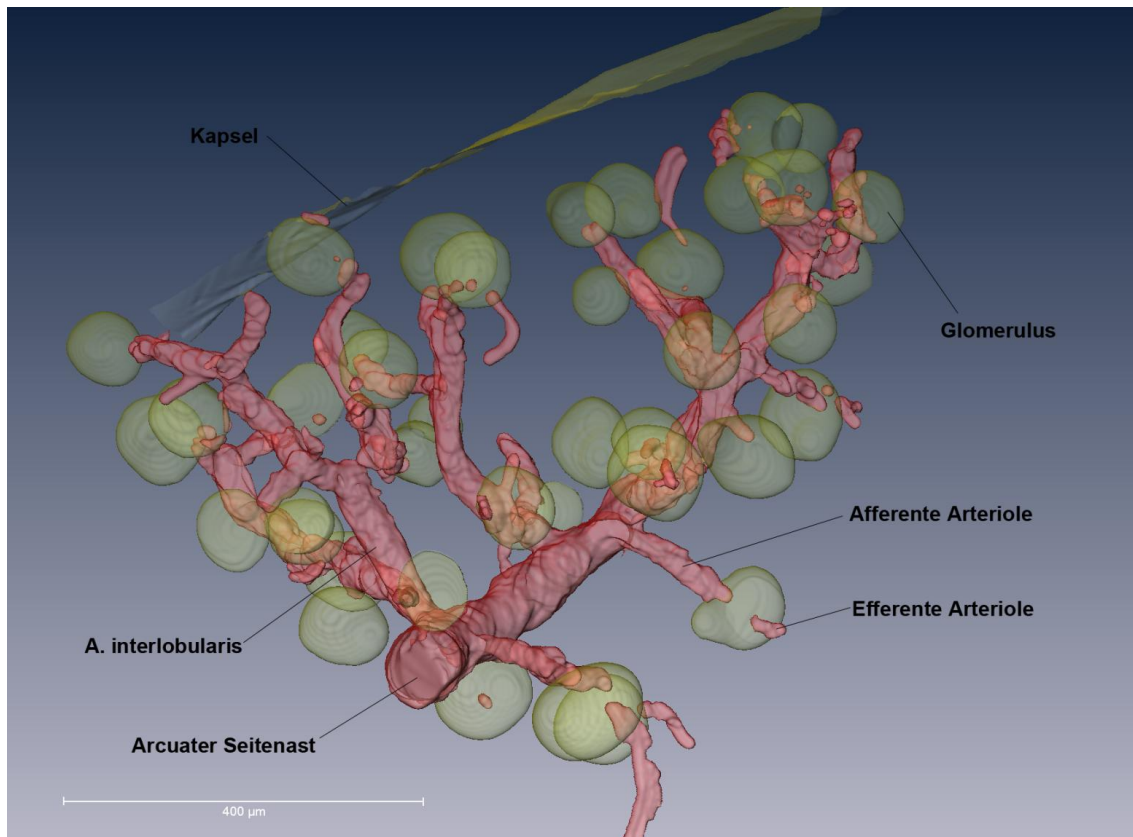


Abbildung 16: 3D-Rekonstruktion der der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere unter NS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm

In der 3D-Rekonstruktion des Gefäßbaumes ohne Renin-Immunoreaktivität (Abbildung 16) der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus unter NS-Diät fällt, verglichen mit dem Wildtyp, ein vergrößerter Durchmesser der Gefäße auf. Dies ist nicht auf einzelne Gefäße beschränkt, sondern scheint im gesamten Gefäßbaum aufzutreten.

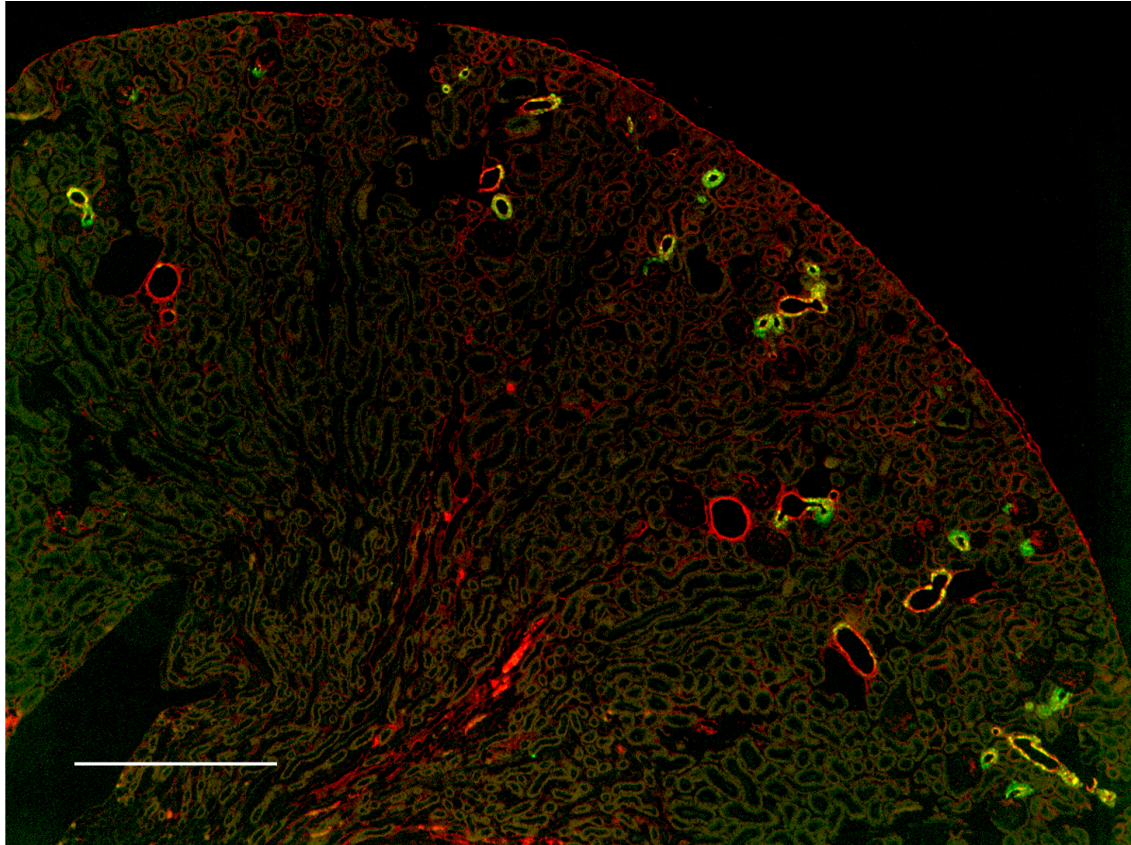


Abbildung 17: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500 μ m

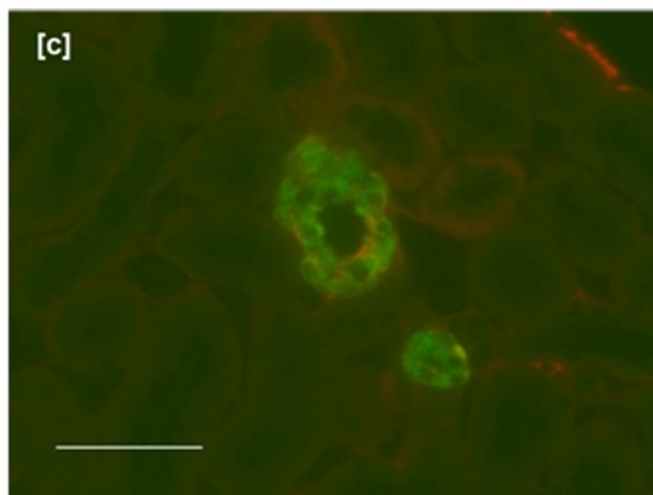
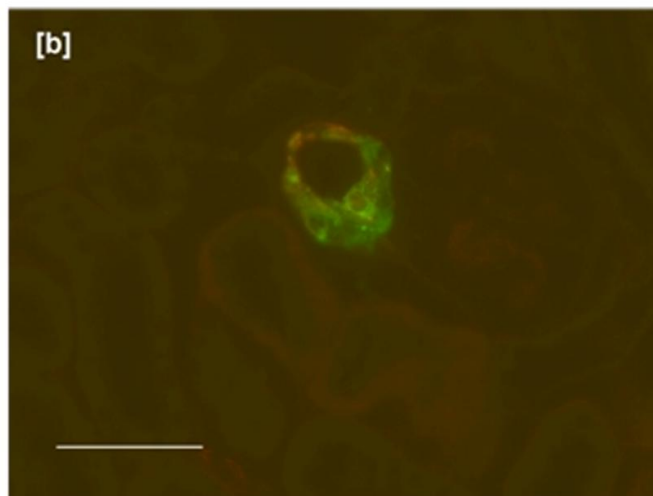
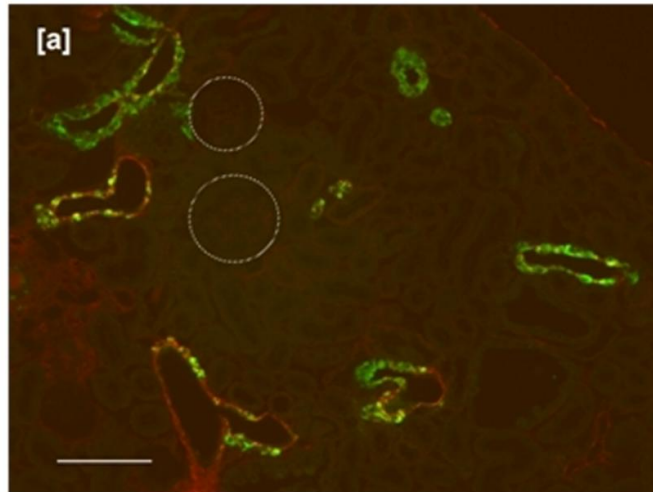
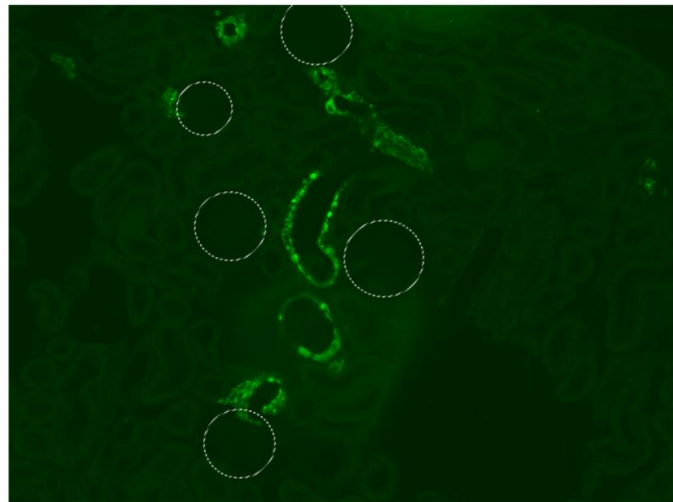
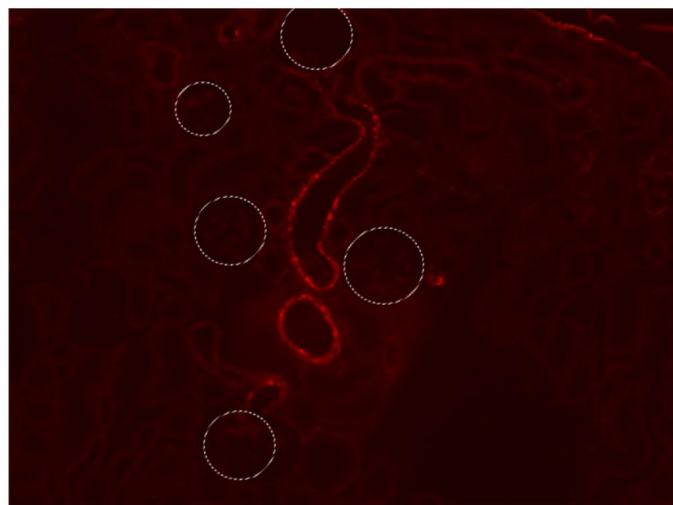


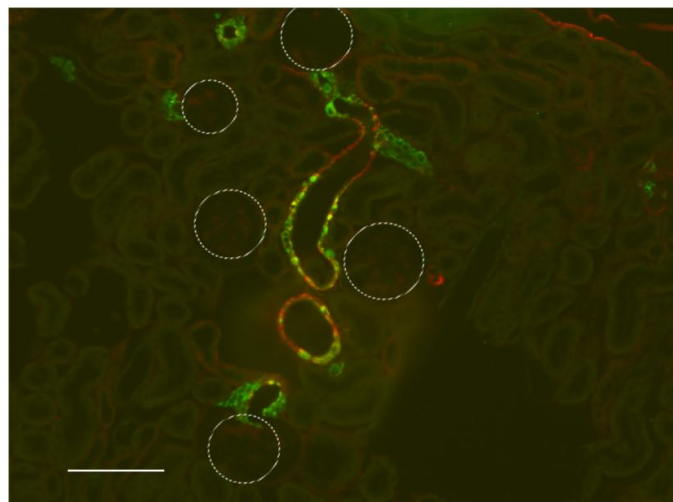
Abbildung 18: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthase-Knockout-Mausniere unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); Vergrößerung; [a] 200-fach, [b] und [c] 630-fach; Maßstabsbalken: [a] 100µm, [b] und [c] 50µm



Renin



Glattmuskel-
aktin



Merge

Abbildung 19: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 200-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 100µm

Die Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 17; Abbildung 18; Abbildung 19) zeigt entsprechend der 3D-Rekonstruktion mehr Reninzellen bei der Aldosteronsynthase-Knockout-Mausnieren unter NS-Diät als beim Wildtypen. Die reninproduzierenden Zellen treten, zum Glomerulus hin, gehäuft mehrschichtig auf und einige liegen nicht länger in der Media, sondern aufgelagert. Die Zellen des vaskulären Pols exprimieren nur Renin und kein Glattmuskelaktin mehr.

4.1.5. Aldosteronsynthase-Knockout-Maus nach zehn Tagen Salzdepletion (KO LS 10 d)

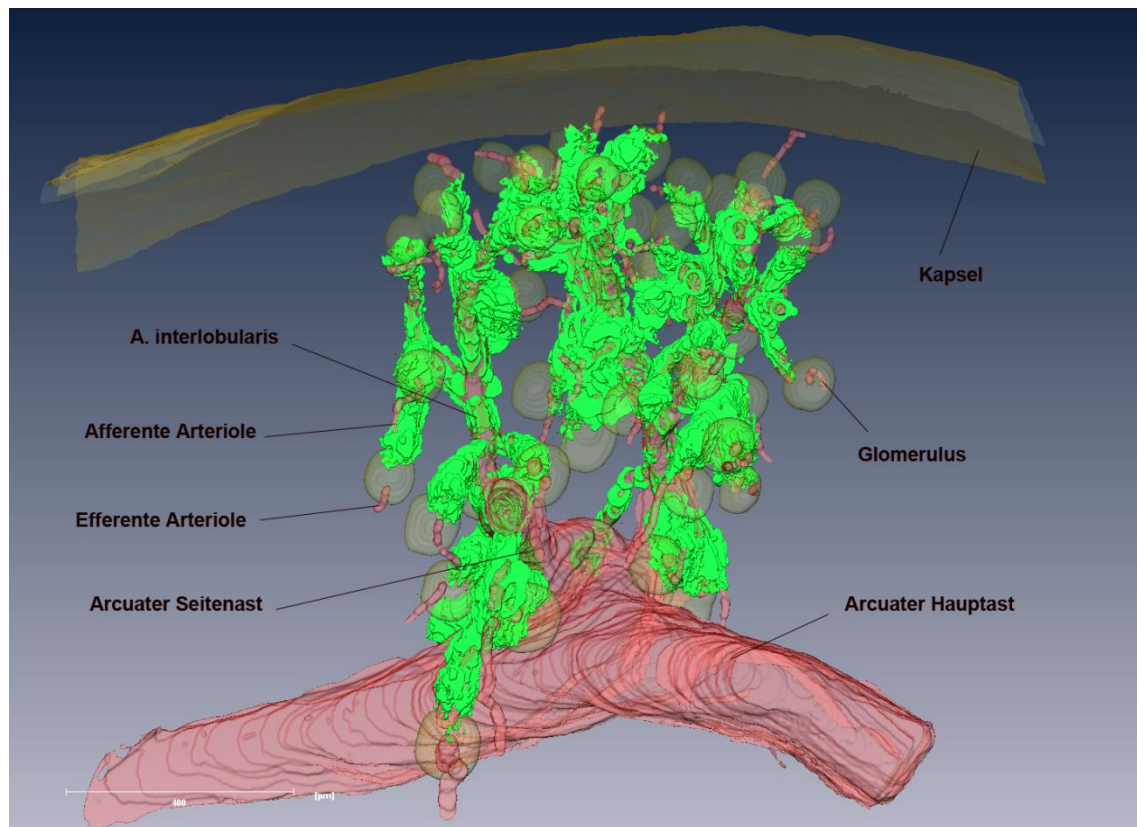


Abbildung 20: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Aldosteronsynthase-Knockout-Mausnieren nach LS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm

In Abbildung 20 der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus nach zehn Tagen LS-Diät fällt die extrem gesteigerte Reninmenge, verglichen mit dem Wildtypen bei NS-Diät, auf. Die Stimulation mit Niedrigsalzdiät bewirkt eine noch stärkere Reninpräsenz in der Niere als bereits bei NS-Diät der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus. Sowohl die afferenten Arteriolen als auch die Interlobulararterien weisen Reninzellen auf ganzer Länge, die

arcuaten Seitenäste dagegen punktuelle Reninexpression auf. Die efferenten Arteriolen weisen, wie bei den anderen Rekonstruktionen, keine reninproduzierenden Zellen auf, genauso wie der arcuate Hauptast. Die Rekrutierung von reninexprimierenden Zellen scheint juxtamedulläre und superfizielle afferente Arteriolen in ähnlichem Ausmaß zu betreffen.

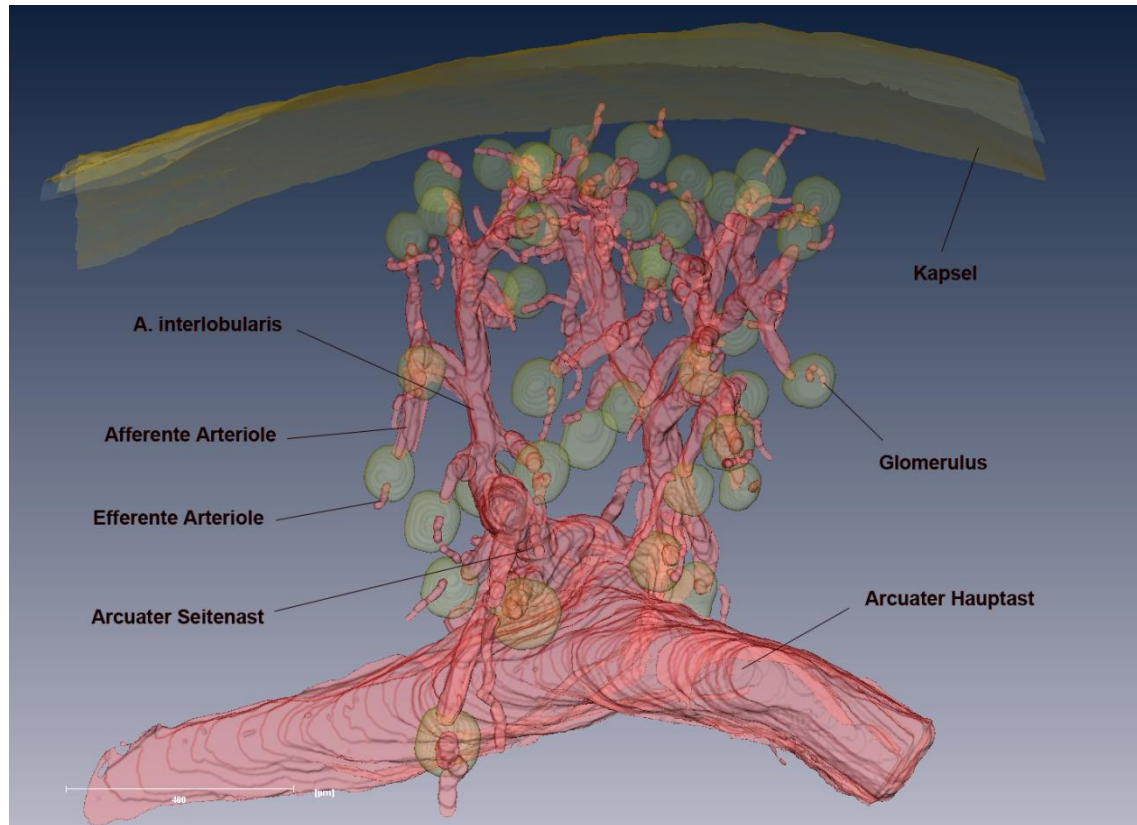


Abbildung 21: 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausnieren nach LS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm

In Abbildung 21 ist nur der Gefäßbaum ohne die Reninexpression abgebildet. So lässt sich der Gefäßbau der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit LS-Diät besser beurteilen. Dieser stellt sich, verglichen mit dem Wildtypen, analog zur Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit NS-Diät verdickt dar.

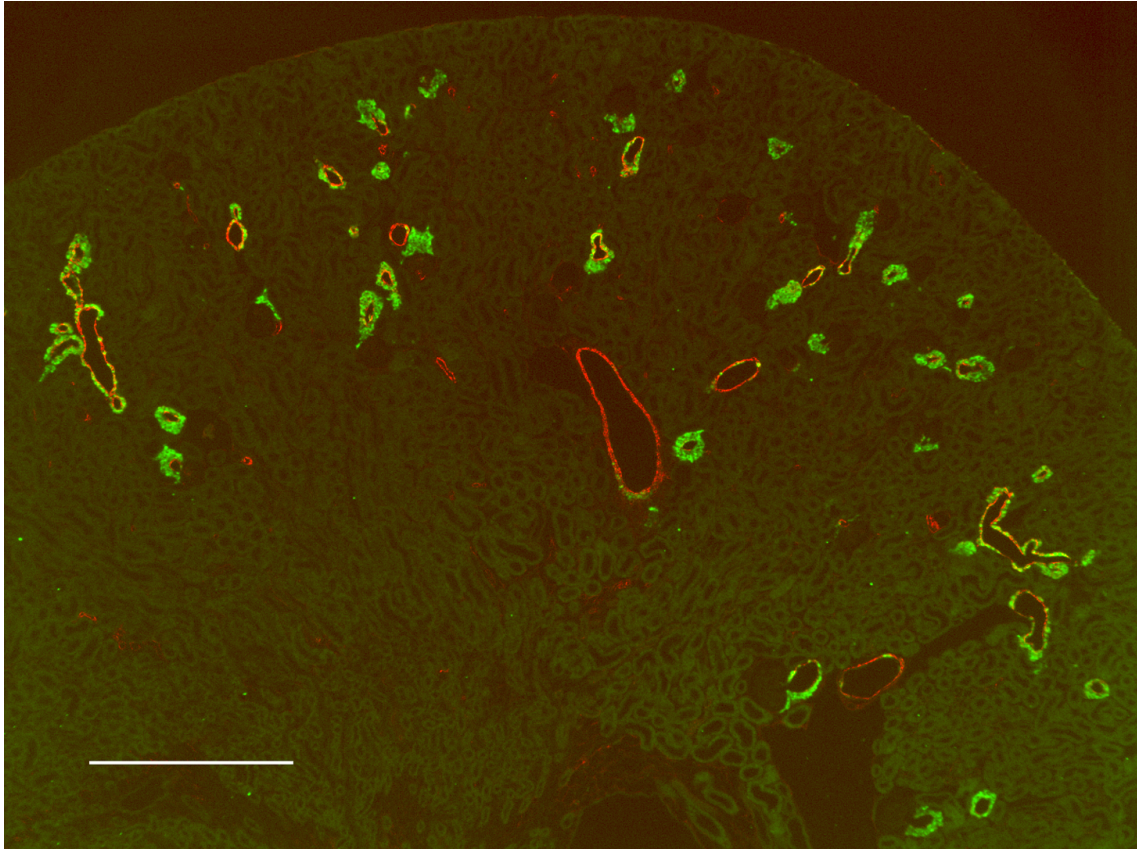
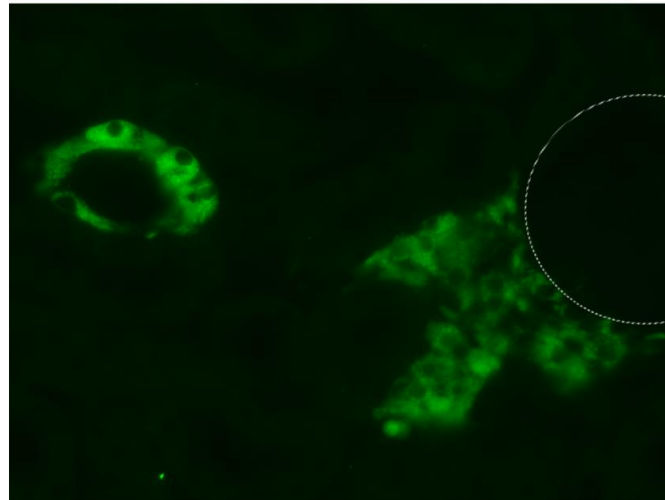
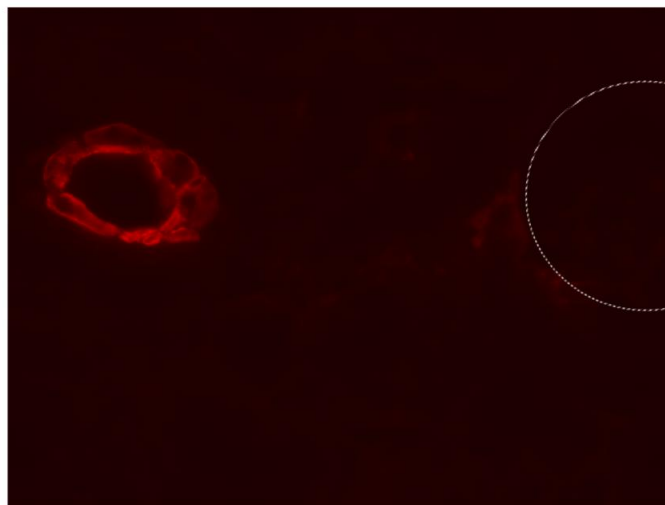


Abbildung 22: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere nach LS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500 μ m

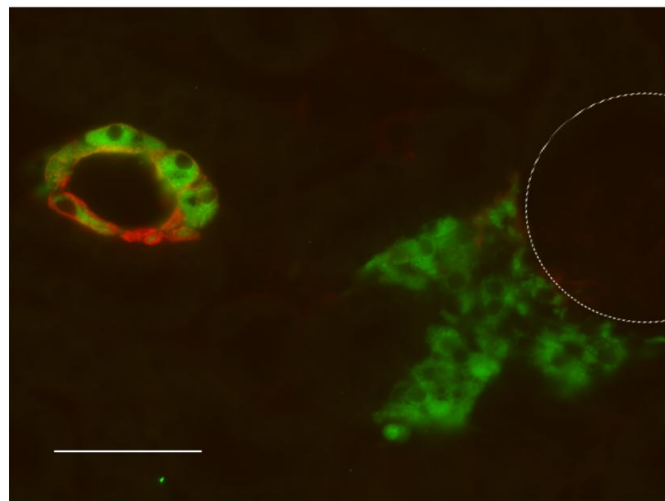
Die verstärkte Reninexpression lässt sich auch in der zellulären Analyse nachvollziehen. In der Übersichtsaufnahme in Abbildung 22 sieht man, dass die größeren Gefäße nur vereinzelt Reninexpression aufweisen. Hier findet sich Renin einschichtig in der Media der Gefäße. Im Gegensatz dazu weisen kleinere Gefäße auf ganzer Länge reninbildende Zellen auf. Dort treten sie zunehmend mehrschichtig auf.



Renin



Glattmuskel-
aktin



Merge

Abbildung 23: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere nach LS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 630-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 50µm

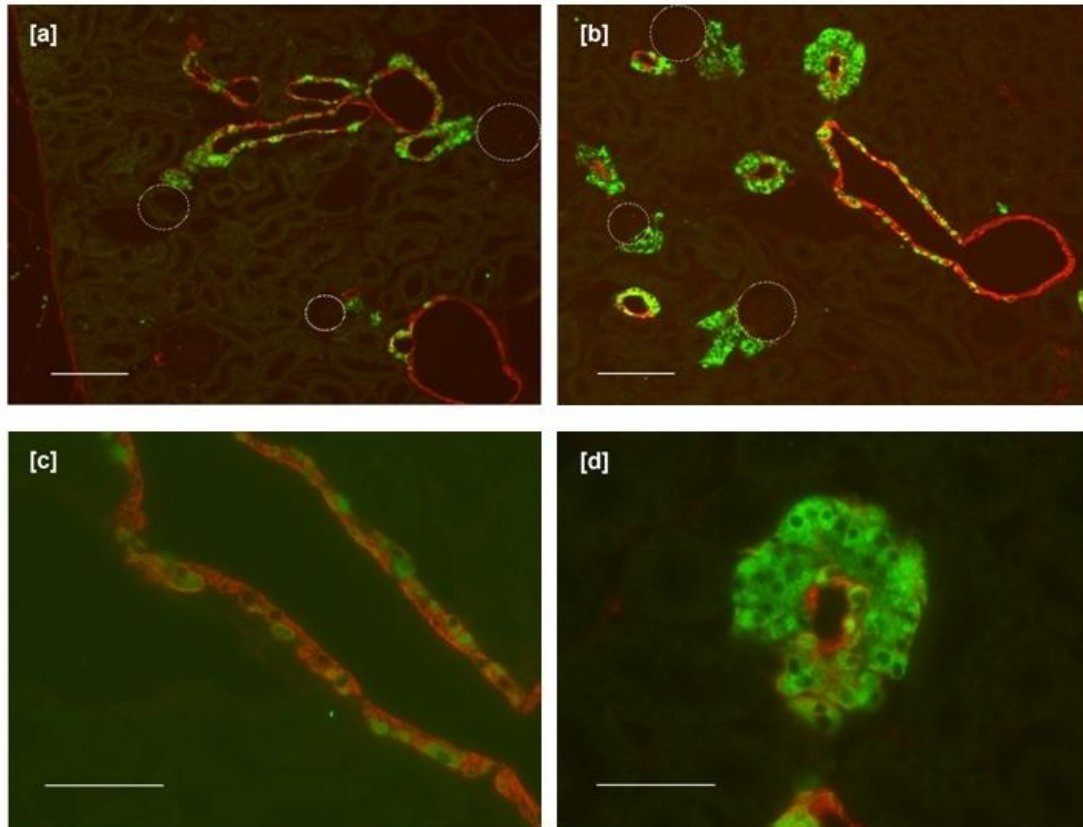


Abbildung 24: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthase-Knockout-Mausniere nach LS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); Vergrößerung; [a] und [b] 200-fach, [c] und [d] 630-fach; Maßstabsbalken: [a] und [b] 100 μ m, [c] und [d] 50 μ m

Durch die Vergrößerungen der zellulären Analyse lassen sich die Veränderungen noch deutlicher darstellen. In der Abbildung 23 ist gut zu erkennen, dass die glomerulusnahen reninbildenden Zellen nur Renin und kein Glattmuskelaktin exprimieren, während die glomerulusfernen reninbildenden Zellen der größeren Gefäße sowohl Renin als auch Glattmuskelaktin exprimieren. Die Abbildungen 23 [a] und [c] zeigen die Reninexpression in den größeren Gefäßen. Renin ist dort in der Media der Gefäße lokalisiert und tritt in Kolokalisation mit Glattmuskelaktin auf. Die Zellen sind hier einreihig formiert. Dagegen zeigen die Abbildungen 23 [b] und [d] die mehrreihig angeordneten reninbildenden Zellen in Form eines Clusters in den kleineren Gefäßen.

4.2. mRNA und Volumina

Um die beschriebene Reninvermehrung bei Nidrigsalzdiät in Kombination mit Enalapril sowie bei Aldosteronsynthase-Knockout-Mäusen quantifizieren zu können, wurden die Renin-mRNA-Level gemessen. Außerdem wurden die Volumina der 3D-Rekonstruktionen des Renins bezogen auf das Glattmuskelaktin mittels Amira gegenübergestellt. Die Volumina entsprechen hierbei den Proteinmengen. Das Volumen von Renin geteilt durch das Glattmuskelaktinvolumen des unstimulierten Wildtypen wurde hier als 1 gesetzt. In dieser Arbeit wurde zur Voluminaberechnung jeweils nur ein repräsentatives Tier verwendet, weswegen in Abbildung 25 keine Streuung angegeben ist.

Der Vergleich der mRNA lässt einen Anstieg der Renin-mRNA bei Nidrigsalzdiät in Kombination mit Enalapril, abhängig von der Dauer der Stimulation erkennen. Nach einer Woche pharmakologischer RAAS-Stimulation zeigt sich beim Wildtyp ein vierfacher, nach drei Wochen bereits ein 14-facher Anstieg ausgehend vom unstimulierten Wildtyp.

Die mRNA steigert sich bei der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus unter Normalsalzdiät siebenfach ausgehend vom Wildtypen ohne RAAS-Stimulation. Bei zusätzlicher RAAS-Stimulation der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus mit zehntägiger Nidrigsalzdiät lässt sich ein 32-facher Anstieg erzielen.

Die Aldosteronsynthase-Knockout-Maus weist nach zehn Tagen Salzdepletion eine mRNA-Erhöhung um den Faktor fünf gegenüber der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus bei Normalsalzdiät auf.

Die Ergebnisse der Volumenberechnung zeigen die gleiche Tendenz wie die mRNA-Daten. Die einwöchige Nidrigsalzdiät in Kombination mit Enalapril vervierfacht das Volumen des Wildtypen bei Normalsalzdiät. Drei Wochen ziehen einen 14-fachen Anstieg nach sich.

Eine elffache Vermehrung des Volumens gegenüber dem unstimulierten Wildtyp ist bei der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus mit Normalsalzdiät zu beobachten. Die zusätzliche RAAS-Stimulation der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus mit zehn Tagen Salzdepletion äußert sich in einer Volumenvermehrung um den Faktor 20 zum unstimulierten Wildtyp.

Zehn Tage Nidrigsalzdiät der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus bewirken eine Verdoppelung der Volumina-Werte bei Normalsalzdiät.

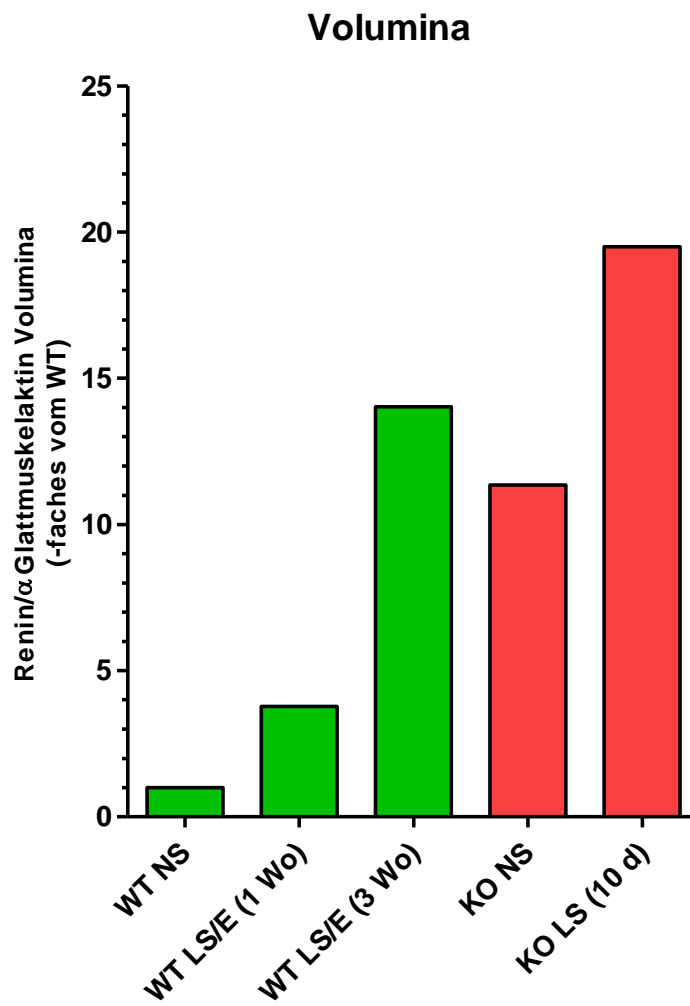


Abbildung 25: Quantitative Analyse der Renin- und Glattmuskelaktin-Volumina der dreidimensionalen Rekonstruktionen

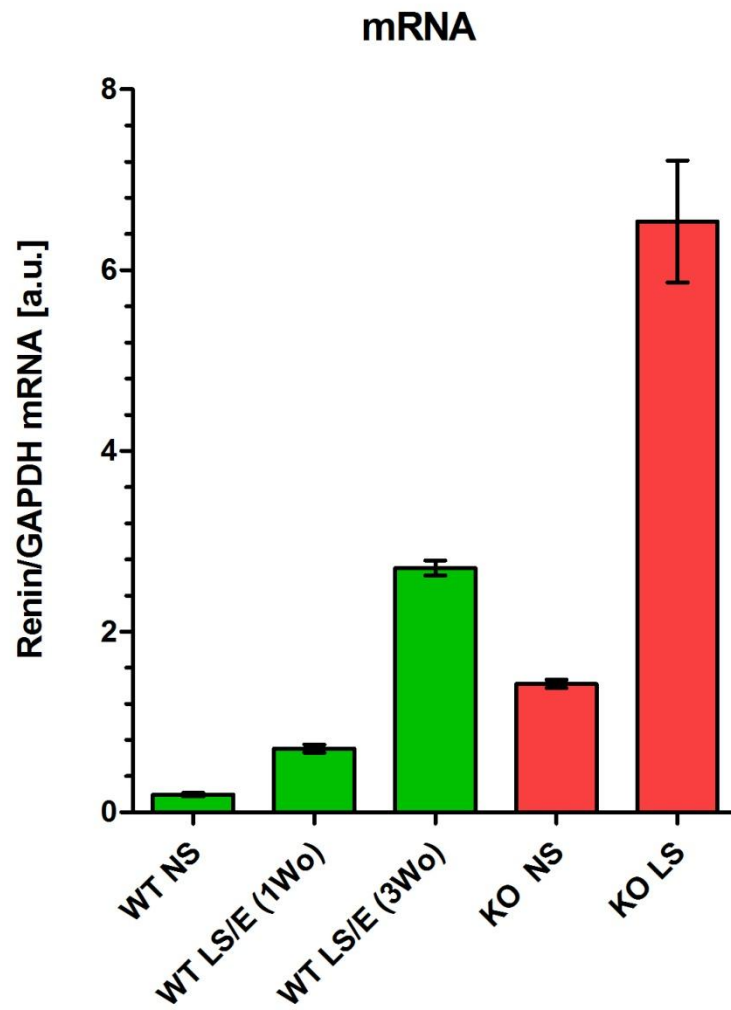


Abbildung 26: Quantitative Analyse der Reninexpression auf mRNA-Ebene

Die folgende Tabelle zeigt die x-fachen Anstiege der mRNA-Level und der berechneten Volumina gegenüber dem Wildtyp bei NS-Diät.

	mRNA	Volumina
WT NS	1	1
WT LS/E (1 Wo)	4	4
WT LS/E (3 Wo)	14	14
KO NS	7	11
KO LS (10 d)	32	20

5. Diskussion

5.1. Reninexpressionsmuster in der Mausniere nach Salzdepletion und Verabreichung eines ACE-Hemmers

Die Zahl der reninbildenden Zellen ist bekanntlich plastisch und kann unter anderem durch Salzverabreichung variiert werden. In dieser Arbeit wurde die RAAS-Stimulation des Wildtyp mit einer salzarmen Diät in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril (LS/E) vorgenommen, was zu einer deutlichen Steigerung der Reninzellen in den Mausnieren führt. Das Ausmaß der Veränderung zeigt sich abhängig von der Dauer der Verabreichung. In zahlreichen anderen Untersuchungen wurde eine gesteigerte Reninexpression in Mäusenieren, durch die Verabreichung von Niedrigsalzdiät und dem ACE-Hemmer Enalapril nachgewiesen (Neubauer et al., 2013; Machura et al., 2012; Gonzalez-Villalobos et al., 2010; Berka et al., 1990; Barrett et al., 1989).

In der dreidimensionalen Rekonstruktion zeigt sich beim Wildtyp bereits nach einer Woche LS/E-Diät eine Zunahme der reninbildenden Zellen im Vergleich zum Wildtyp ohne RAAS-Stimulation. Nach drei Wochen Niedrigsalzdiät tritt ein weiterer Anstieg der Zellzahl auf. Diese Vermehrung erfolgt zum einen durch retrograde Rekrutierung. Dabei breiten sich die Reninzellen in Richtung der größeren Gefäße aus. Diese Rekrutierung wurde auch von anderen Gruppen beobachtet (Karger et al., 2013; Neubauer et al., 2013; Fuchs et al., 2002; Reddi et al., 1998; Casellas et al., 1994). Nach einer Woche RAAS-Stimulation finden sich reninbildende Zellen retrograd ausgeweitet, aber weiterhin begrenzt auf die afferenten Arteriolen. Die Ausbreitung der Reninzellen erfolgt nach drei Wochen bis auf die A. interlobulares. Auffällig ist, dass die Rekrutierung an den juxtaglomerulären afferenten Arteriolen stärker ist, als an den superfiziellen Gefäßen. Außerdem zeigt sich, dass afferente Arteriolen, die direkt aus dem arcuaten Seitenast und nicht aus einer A. interlobularis abgehen, eine ausgeprägtere Reninexpression aufweisen.

Zum anderen erfolgt die Reninzellsteigerung entsprechend der Literatur durch juxtaglomeruläre Mehrschichtigkeit (Karger et al., 2013). Beim Wildtypen nach einer Woche LS/E-Diät zeigen sich die Reninzellen hauptsächlich einschichtig, treten am distalen Ende der afferenten Arteriolen gelegentlich zweischichtig auf. Nach drei Wochen RAAS-Stimulation ist eine Clusterbildung zu erkennen. Die Reninzellen werden zum Glomerulus hin mehrreihig (Abbildung 27). Während nach einer Woche Niedrigsalzdiät analog zum Wildtyp ohne RAAS-Stimulation die Reninzellen auf die Media der Gefäße beschränkt sind, treten sie nach drei Wochen Diät auch auf die Media aufgelagert auf. Die im Wildtyp vorherrschende Kolokalisation von Glattmuskelaktin und Renin ist nach einer Woche Salzdepletion glomerulusnah aufgehoben. Nach

dreiwöchiger Stimulation des RAAS geht die Kolokalisation noch weiter zurück. Das Glattemuskulaktin wird zunehmend durch Renin ersetzt.

Der Gefäßbaum zeigt sich in den Rekonstruktionen, übereinstimmend mit dem Wildtypen ohne spezielle Diät, auch nach einer bzw. drei Wochen Salzdepletion schlank und homogen.

Bei Untersuchung der Renin-mRNA-Level und der Renin-Volumina der Rekonstruktionen fällt, entsprechend den dreidimensionalen Rekonstruktionen, eine Steigerung bei Salzdepletion, abhängig von der Dauer der Diät auf. Die vierfach erhöhten Werte nach einer Woche Diät steigern sich nach drei Wochen auf den 14-fachen Wert des unstimulierten Wildtypen. Erhöhte mRNA-Level wurden entsprechend in weiteren Arbeiten beschrieben (Machura et al., 2012; Neubauer et al., 2013). Bei Karger et al. trat nach zwei Wochen LS/E ein zwölffacher Anstieg, gegenüber dem Wildtypen mit unstimuliertem RAAS, auf. Auch Makhanova et al. stellten einen Anstieg der Renin-mRNA beim Wildtypen unter Nidrigsalzdiät fest. Der weniger deutliche Anstieg auf 126% nach sechs bis acht Wochen Diät war bei ihnen allerdings nicht signifikant (Makhanova et al, 2006).

Insgesamt führt die Stimulation des RAAS in normalen adulten Nieren mit Salzdepletion und Enalapril zu einer gesteigerten Reninkonzentration in Form von zunehmender retrograder Rekrutierung entlang des Gefäßbaumes sowie zu einer Clusterbildung. Das Ausmaß der erhöhten Reninexpression zeigt sich abhängig von der Dauer der Diät. Je länger die Stimulation andauert, desto stärker lassen sich die Reninwerte steigern. Auf die Struktur des Gefäßbaumes scheint die Nidrigsalzdiät keine Auswirkungen zu haben.

5.2. RAAS-Defektmutante mit genetischer Deletion der Aldosteronsynthese

Eine starke Zunahme der reninbildenden Zellen kann durch Deletion einer Komponente der RAAS induziert werden. Die Aldosteronsynthese-Knockout-Mäuse verlieren die Fähigkeit Aldosteron zu produzieren (Lee et al., 2005). Dies zieht eine erhöhte Anzahl reninbildender Zellen nach sich, welche eine gesteigerte Produktion und Sekretion von Renin bewirken (Rasch et al., 1998, Machura et al., 2012). Die Veränderungen werden sowohl in den Immunfluoreszenzfärbungen als auch in den dreidimensionalen Rekonstruktionen deutlich.

Augenscheinlich findet sich in der dreidimensionalen Darstellung der unbehandelten Aldosteronsynthese-Knockout-Maus quantitativ mehr Renin als im Wildtypen. Es lässt sich eine Ausbreitung der Reninexpression über den juxtaglomerulären Apparat hinaus bis zum arcuaten Seitenast hin feststellen. Die Reninzellen kleiden die afferenten Arteriolen fast vollständig aus und dünnen sich zu den arcuaten Seitenästen, die diese nur noch vereinzelt aufweisen, schrittweise aus. Ähnliche Ergebnisse zeigten unter anderem Makhanova et al., die eine vermehrte Anzahl reninbildender Zellen in der juxtaglomerulären Region sowie entlang der präglomerulären Arteriolen bemerkten (Lee et al., 2005; Makhanova et al., 2006; Karger et al., 2013; Kurt et al., 2013). Die zusätzlichen rekrutierten Reninzellen scheinen denen der ursprünglichen juxtaglomerulären Reninzellen, beim Wildtyp mit unstimuliertem RAAS, funktionell sehr zu ähneln (Kurt et al., 2013).

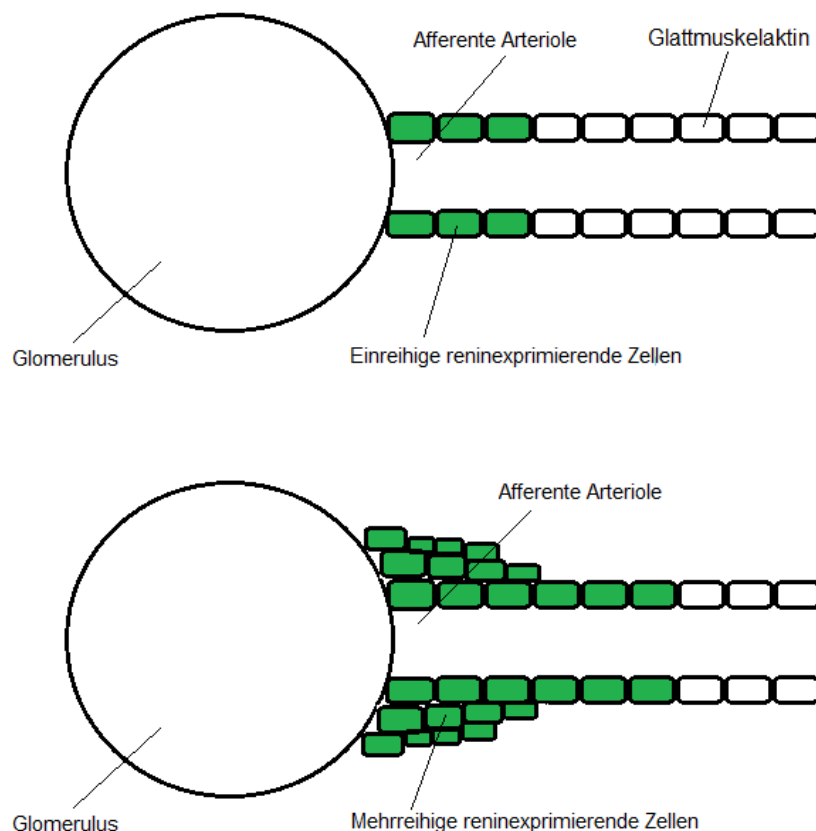


Abbildung 27: Schema einer afferenten Arteriole mit einreihigen reninexprimierenden Zellen, wie beim Wildtypen unter NS, im Vergleich zu einer afferenten Arteriole mit mehrreihigen reninexprimierenden Zellen, wie bei der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus unter NS und LS-Diät.

Neben der retrograden Rekrutierung der Reninexpression entlang der Gefäße fällt gegenüber dem Wildtyp bei NS-Diät eine juxtaglomeruläre Mehrschichtigkeit der reninbildenden Zellen auf (Abbildung 27). Diese nimmt in Glomerulusnähe, entsprechend einer Clusterbildung zu. Mehrschichtig formierte Reninzellen treten neben der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus auch bei AT1a-Knockout-Mäusen und ACE-Knockout-Mäusen auf (Oliverio et al., 1997; Hilgers et al., 1997). Darüber hinaus ist die Kolokalisation von Renin und Glattmuskelaktin in den afferenten Arteriolen endständig aufgehoben, da dort kein Glattmuskelaktin und vermehrt Renin nachzuweisen ist. Die rekrutierten glomerulusnahen Zellen verlieren die Fähigkeit neben Renin auch Glattmuskelaktin zu exprimieren. Auch Karger et al. stellten eine fehlende Kolokalisation in den Zellclustern fest (Karger et al., 2013).

In der dreidimensionalen Rekonstruktion des Gefäßbaumes der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus unter NS-Diät scheinen alle Gefäße verdickt, verglichen mit dem Wildtyp bei NS- oder LS-Diät. Ähnlich veränderte Gefäßsysteme traten auch bei Deletionen von anderen RAAS-Komponenten auf (Tanimoto et al., 1994; Sugaya et al., 1995; Machura et al., 2009).

Die Zunahme an reninexprimierenden Zellen ließ sich bei unserer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus, wie auch in anderen Experimenten (Makhanova et al., 2006) durch salzarmes Futter (LS) noch weiter steigern. Reninzellen sind bis zu den arcuaten Seitenästen, dort punktuell, und bei den afferenten Arteriolen sowie den Interlobulararterien auf ganzer Länge vorhanden.

Auch hier ist die Kolokalisation von Glattmuskelaktin und Renin glomerulusnah zunehmend aufgehoben.

Die Clusterbildung, wie in Abbildung 27 schematisch dargestellt, wird bei zusätzlicher salzarmer Diät noch deutlicher als bei NS-Diät. Zum distalen Ende der afferenten Arteriolen hin werden die reninbildenden Zellen zunehmend mehrreihig.

Auch bei einer Salzdepletion ist ein vergrößerter Durchmesser des Gefäßbaumes bei der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus zu erkennen. Diese Verdickung der intrarenalen Arterien bei der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus unter Nidrigsalzdiät wurde ebenso von Makhanova beobachtet (Makhanova et al., 2006). Diese Veränderung zeigte sich auch bei zahlreichen anderen Beeinträchtigungen des RAAS. Die Ursache ist noch nicht nachgewiesen. Pentz et al. ziehen in Erwägung, dass Reninzellen Faktoren mit entsprechender gefäßverdickender Wirkung herstellen, da Mäuse mit beeinträchtigten Reninzellen ein schlankes Gefäßsystem aufweisen (Pentz et al., 2004).

Die Renin-mRNA-Level und die Renin-Volumina der Rekonstruktionen zeigen die gleiche Tendenz wie die dreidimensionalen Rekonstruktionen. Bei der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus treten auch ohne RAAS-Stimulation deutlich erhöhte Werte im Vergleich zum unstimulierten Wildtyp auf. Die Renin-mRNA-Level ergeben eine siebenfache, die Volumina eine elffache Steigerung. Ähnlich angehobene Werte der Renin-mRNA bei Deletion der Aldosteronsynthese zeigten sich auch bei Kurt et al. mit einer zehnfachen Erhöhung (Kurt et al., 2013). Bei Makhanova et al. fanden sich, ausgehend vom Wildtyp, 14-fache Renin mRNA-Level bei der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus (Makhanova et al., 2006).

Diese Werte ließen sich durch Stimulation des RAAS mit Salzdepletion noch weiter steigern. Bei Nidrigsalzdiät zeigen die mRNA-Level der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus das Fünffache der Werte ohne Diät, die Volumina-Daten erreichen eine Verdopplung. Die Ergebnisse gleichen denen der Mäusenieren von Makhanova et al. Sie erzielten eine dreifache Erhöhung der Werte (Makhanova et al., 2006).

Bei Vergleich der mRNA- und Volumina-Werte zeigen sich, die Aldosteronsynthese-Knockout-Maus betreffend, leichte Unterschiede in der Ausprägung. In anderen Studien, wie bei Machura et al., spiegelt die Anzahl der Reninzellen, welche durch die Volumina-Werte gemessen wird, die Renin mRNA-Level wider (Machura et al., 2012). In dieser Arbeit nimmt die Reninzellzahl beim Wildtyp parallel mit der mRNA ab und zu. Bei der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus ist aber ein Unterschied zwischen der Zellzahl und der Renin-mRNA zu sehen. Eine mögliche Erklärung wäre ein unterschiedlicher Reningehalt der Zellen, der bereits in anderen Arbeiten feststellbar war (Karger et al., 2013). Dieser bleibt bei den Volumina-Werten, im Gegensatz zu den mRNA-Werten, unberücksichtigt. Ein potentieller Hinweis darauf zeigt sich in Abbildung 23. Dort scheinen die reninexprimierenden Zellen unterschiedliche Helligkeitsstufen aufzuweisen. Zusätzliche Gründe könnten technische Probleme darstellen.

Alles in allem bewirkte der RAAS-Defekt der Aldosteronsynthese-Knockout-Mäuse, bereits ohne zusätzliche Stimulation des RAAS durch Salzdepletion, eine erhöhte Renin-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp. Mit Nidrigsalzdiät konnten diese Werte weiter gesteigert werden. Die Lokalisation der reninbildenden Zellen breitet sich zunehmen retrograd entlang des Gefäßbaumes aus, zeigt Clusterbildung und ist zum Teil der Media aufgesetzt. Dieses Verteilungsmuster der reninexprimierenden Zellen ist in ähnlicher Weise sowohl beim Wildtyp nach RAAS-Stimulation, als auch bei der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus zu beobachten. Die Deletion der Aldosteronsynthese scheint, sowohl mit als auch ohne zusätzliche RAAS-Stimulation,

die Morphologie des Gefäßbaumes zu beeinflussen. Der Gefäßbaum zeigte sich, im Gegensatz zum Wildtyp mit und ohne RAAS-Stimulation, verdickt.

6. Literaturverzeichnis

Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS (1994): Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol Cell Endocrinol* 105(2):R11-R17

Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, et al. (1987): Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA : structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237:268-275

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

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

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

Barrett GL, Morgan TO, Smith M, et al. (1989): Effect of converting enzyme inhibition on renin synthesis and secretion in mice. *Hypertension* 14: 385–395

Bassett MH, White PC, Rainey WE (2004): The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol* 217:67–74

Berger S, Bleich M, Schmid W, et al. (1998): Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc Natl Sci USA* 95:9424-9429

Berka JLA, Alcorn D, Coghlan JP, et al (1990): Granular juxtaglomerular cells and prorenin synthesis in mice treated with enalapril. *J Hypertens* 8:229-238

Boon WC, Coghlan JP, Curnow KM, McDougall JG (1997): Aldosterone secretion: a molecular perspective. *Trends Endocrinol Metab* 8:346–354

Brilla CG, Pick R, Tan LB, et al. (1990): Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 67:1355–1364

Bruner KL, Derfoul A, Robertson NM et al. (1997): The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct* 7:85-98

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

Casellas D, Dupont M, Bouriquet N, et al. (1994): Anatomic pairing of afferent arterioles and renin cell distribution in rat kidneys. *Am J Physiol.* 267(6 Pt 2):F931-6.

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

Claassen K, Willmann S, Eissing T, et al. (2013): A detailed physiologically based model to simulate the pharmacokinetics and hormonal pharmacodynamics of enalapril on the circulating endocrine Renin-Angiotensin-aldosterone system. *Front Physiol* 4:4

Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, et al. (1991): The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Molecular Endocrinology* 5 1513–1522

DeBry RW, Seldin MF (1996): Human/mouse homology relationships. *Genomics* 33:337-351

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

Do YS, Shinagawa T, Tam H, et al. (1987): Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure. *J. Biol. Chem.* 262(3):1037-1043

Domalik LJ, Chaplin DD, Kirkman MS, et al. (1991): Different isozymes of mouse 11 β -hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 5:1853–1861

Dooley R, Harvey BJ, Thomas W (2011): Non-genomic actions of aldosterone: From receptors and signals to membrane targets. *Mol Cell Endocrinol* 350(2):223-34

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

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

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

Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smit AJ (1988): Mineralocorticoid action: Target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242:583-585

Golin R, Pieruzzi F, Munforti C, et al. (2001): Role of the renal nerves in the control of renin synthesis during different sodium intakes in the rat. *J Hypertens* 19:1271-1277

Gomez RA, Lynch KR, Cheyalier RL, et al. (1988): Renin and Angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol* 254:900-906

Gonzalez-Villalobos RA, Satou R, Ohashi N, et al. (2010): Intrarenal mouse renin-angiotensin system during ANG II-induced hypertension and ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F150–F157

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

Gros R, Ding Q, Sklar LA, et al. (2011): GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. Hypertension 57(3):442-451

Gyton AC (1991): Blood pressure control-special role of the kidney and body fluid. Science 252:1812-1816

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

Hellal-Levy C, Couette B, Fagart J, et al. (1999): Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. FEBS Lett 464: 9-13

Helman SI, Liu X, Baldwin K, et al. (1998): Time-dependent stimulation by aldosterone of blocker-sensitive ENaCs in A6 epithelia. AJP - Cell Physiology 274:C947- C957

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

Hirose S, Kim SJ, Miyazaki H, et al. (1985): In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate. J. Biol. Chem. 260(30):16400-16405

Hobart PM, Fogliano M, O'Connor BA, et al. (1984): Human renin gene: structure and sequence analysis. Proc Natl Acad Sci USA 81,5026-30

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

Holmer S, Rinne B, Eckard KU, et al. (1994): Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney. Am J Renal Fluid Electrolyte Physiol 266:F738-F745

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

Karger C, Kurtz F, Steppan D, et al. (2013): Procollagen I-expressing renin cell precursors. Am J Physiol Renal Physiol. 305(3):F355-61

Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Ohnishi T, et al. (1991): Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450aldo as related to primary aldosteronism. Biochem. Biophys. Res. Commun 173 (1): 309-16

Kemendy AE, Kleyman TR, Eaton DC (1992): Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia. AJP - Cell Physiology 263:C825-C837

Kim GH, Masilamani S, Turner R, et al. (1998): The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14552–14557

Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, et al. (2007): Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension* 50:103-109

Klinke R, Silbernagel S, Pape H, Kurtz A (2010): *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 6., vollständig überarbeitete Auflage:S.329-382

Kurt B, Karger C, Wagner C, Kurtz A (2013): Control of renin secretion from kidneys with renin cell hyperplasia. *Am J Physiol Renal Physiol* [Epub ahead of print] DOI: 10.1152/ajprenal.00536.2013

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

Lee G, Makhanova N, Caron K, et al. (2005): Homeostatic responses in the adrenal cortex to the absence of aldosterone in mice. *Endocrinology* 146: 2650–2656.

Lieberman S, Greenfield NJ, Wolfson A (1984): A heuristic proposal for understanding steroidogenic processes. *Endocrinol Rev* 5:128–148

Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, et al. (1992): A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355(6357):262-5

Loffing J, Zecevic M, Feraille E, et al. (2001): Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F675–F682

Lombes M, Kenouch S, Souque A, et al. (1994): The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 135: 834–840 32

Machura K (2008): *Zeitlich-räumliche Entwicklung der Reninexpression: Dreidimensionale Rekonstruktion von embryonalen, postpartalen und adulten Mausnieren*. VDM Verlag Dr. Müller

Machura K, Neubauer B, Steppan D, et al. (2012): Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 302:F1278–F1285

Machura K, Steppan D, Neubauer B, et al. (2009): Developmental renin expression in mice with a defective renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol*. 297(5):F1371-80

- Makhanova N, Lee G, Takahashi N, et al. (2006): Kidney function in mice lacking aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F61–F69
- Makhanova N, Sequeira-Lopez MLS, Gomez RA, et al. (2006): Disturbed homeostasis in sodium-restricted mice heterozygous and homozygous for aldosterone synthase gene disruption. *Hypertension* 48:1151e9.4
- McGowan RA, Kane-Haas C, Gross KW (1980): High resolution, low exposure times for insitu hybridization using 35S-labeled SP6 probe. *N Engl Nuclear Products News* 4(5):1
- Mercure C, Ramla D, Garcia R, et al. (1998): Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS Lett* 422(3):395-399
- Morrison N, Harrap SB, Arriza JL, et al. (1990): Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum Genet* 85:130–132
- Nafz B, Berthold H, Ehmke H, et al. (1997): Dissociation of blood pressure and blood flow. *Kidney Blood Press Res* 20(3):205-209
- Neubauer B, Machura K, Kettl R, et al. (2013): Endothelium-derived nitric oxide supports renin cell recruitment through the nitric oxide-sensitive guanylate cyclase pathway. *Hypertension* 61(2):400-7
- Nomoto S, Massa G, Mitani F, et al. (1997): CMO I deficiency caused by a point mutation in exon 8 of the human CYP11B2 gene encoding steroid 18-hydroxylase (P450C18). *Biochem Biophys Res Commun* 19;234(2):382-5
- Ogishima T, Suzuki H, Hata J, et al. (1992): Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-450 11 β in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology* 130:2971–2977
- Oliverio MI, Best CF, Kim HS, et al. (1997): Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *Am J Physiol.* 1997 Apr;272(4 Pt 2):F515-20.
- Pascoe L, Curnow K, Slutsker L, et al. (1992): Mutations in the human CYP1 B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyl oxidase II deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4996-5000
- Pascual-Le Tallec L, Lombes M (2005): The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol* 19(9): 2211–2221
- Pentz ES, Moyano MA, Thornhill BA, et al. (2004): Ablation of renin-expressing juxtaglomerular cells results in a distinct kidney phenotype. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286(3):R474-83. Epub 2003 Oct 16
- Peters JS, Clausmeyer S (2002): Intracellular sorting of renin: Cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol* 34:1561-1568

Rasch R, Jensen BL, Nyengaard JR, Skøtt O (1998): Quantitative changes in rat renin secretory granules after acute and chronic stimulation of the renin system. *Cell Tissue Res.*;292(3):563-71

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

Rosler A. (1984): The natural history of salt-wasting disorders of adrenal and renal origin. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 689–700

Sauter A., Machura K., Neubauer B. et al. (2008): Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney International* 73, 43–51

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

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B et al. (2001): Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281(2):F345-56.

Sielecki AR, Hayakawa K, Fujinaga M, et al. (1989): Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science*.243:1346 – 1351

Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, et al. (1953): Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism. *Experientia* 1953;9:333–335

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

Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, et al. (1995): Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J Biol Chem.*;270(32):18719-22

Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, et al. (1994): Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem.*;269(50):31334-7

Tannin GM, Agarwal AK, Monder C, et al. (1991): The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 266(25):16653-16658

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

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

Taymans SE, Pac S, Pak E, et al. (1998): Human CYP11B2(aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 1033-1036

Terajima M, Matsui Y, Copeland NG, et al (1994): Structural organization of the mouse glycoporphin A gene. *J. Biochem.* 116: 1105-1110

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

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

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

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

Yabu M, Senda T, Nonaka Y, et al. (1991): Localization of the gene transcripts of 11 β -hydroxylase and aldosterone synthase in the rat adrenal cortex by in situ hybridization. *Histochemistry* 96:391–394

Yamamoto KR (1985): Steroid receptor regulated transcription of genes and gene network. *Annu Rev Genet* 19:209–252

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

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Bestandteile des RAAS	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Glomerulus (Abbildung nach Junqueira, 2002)	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aldosteronsynthese	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Blutgefäßsystems der Niere (Machura, 2008)	20
Abbildung 5: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Mausniere des Wildtypen unter NS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm	44
Abbildung 6: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500µm	45
Abbildung 7: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 200-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 100µm	46
Abbildung 8: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Mausniere des Wildtypen nach einer Woche LS/E-Diät (Umrandungen: Vergleich der Ausprägung retrograden Rekrutierung an superfiziellen und juxtamedullären afferenten Arteriolen; Pfeil: afferente Arteriole, die direkt aus dem arcuaten Seitenast abgeht); Maßstabsbalken: 400µm	47
Abbildung 9: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach einer Woche LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500µm	48
Abbildung 10: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach einer Woche LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); Pfeil: mehrschichtige Reninzellen; 200-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 100µm	49
Abbildung 11: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Mausniere des Wildtypen nach drei Wochen LS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm	50
Abbildung 12: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach drei Wochen LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500µm	51

- Abbildung 13: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach drei Wochen LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); Vergrößerung; [a] 200-fach, [b] und [c] 630-fach; Maßstabsbalken: [a] 100µm, [b] und [c] 50µm 52
- Abbildung 14: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten von Wildtypnieren nach drei Wochen LS/E-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); Pfeil: Glattmuskelaktinfreie Zellen; 630-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 50µm 53
- Abbildung 15: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere unter NS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm 54
- Abbildung 16: 3D-Rekonstruktion der der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere unter NS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm 55
- Abbildung 17: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500µm 56
- Abbildung 18: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); Vergrößerung; [a] 200-fach, [b] und [c] 630-fach; Maßstabsbalken: [a] 100µm, [b] und [c] 50µm 57
- Abbildung 19: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere unter NS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 200-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 100µm 58
- Abbildung 20: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere nach LS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm 59
- Abbildung 21: 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin-Immunoreaktivität (rot) in einem Ausschnitt der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere nach LS-Diät; Maßstabsbalken: 400µm 60
- Abbildung 22: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere nach LS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 50-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 500µm 61
- Abbildung 23: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere nach LS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb); 630-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken: 50µm 62

Abbildung 24: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten der Aldosteronsynthese-Knockout-Mausniere nach LS-Diät: Immunreaktionen Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot), Kolo-kalisation beider Immunreaktionen (gelb); Vergrößerung; [a] und [b] 200-fach, [c] und [d] 630-fach; Maßstabsbalken: [a] und [b] 100µm, [c] und [d] 50µm 63

Abbildung 25: Quantitative Analyse der Renin- und Glattmuskelaktin-Volumina der dreidimensionalen Rekonstruktionen 65

Abbildung 26: Quantitative Analyse der Reninexpression auf mRNA-Ebene 66

Abbildung 27: Schema einer afferenten Arteriole mit einreihigen reninexprimierenden Zellen, wie beim Wildtypen unter NS, im Vergleich zu einer afferenten Arteriole mit mehrreihigen reninexprimierenden Zellen, wie bei der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus unter NS und LS-Diät. 71

7.2. Abkürzungsverzeichnis

Chemische und biologische Größen und Einheiten

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

Physikalische Größen und Einheiten

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

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

k	kilo (1x10 ³)	n	nano (1x10 ⁻⁹)
m	milli (1x10 ⁻³)	p	pico (1x10 ⁻¹²)
µ	micro (1x10 ⁻⁶)		

Sonstige

%	Prozent	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
A.	Arteria(e)		
ACE	Angiotensin-converting Enzyme	H2O bidest.	zweifach entionisiertes Wasser
AS -/-	homozygote Aldosteron-synthase-Knockout-Maus	HS	Pferdeserum (horse serum)
AS +/-	heterozygote Aldosteron-synthase-Knockout-Maus	i.p. Ig	intra peritoneal Immunglobulin
ATPase	Adenosintriphosphatase	HCL	Chlorwasserstoff
BSA	bovine serum albumin	JG	juxtaglomerulär
bzw.	beziehungsweise	K	Kalium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	K2HPO4	di-Kaliumhydrogenphosphat
cDNA	copy deoxyribonucleic acid	KCl KO NS	Kaliumchlorid Aldosteronsynthase-Knockout-Maus mit Normalsalzdiät
Cl	Chlorid		
CMO	Corticosteron-Methyloxidase	KO LS	Aldosteronsynthase-Knockout-Maus mit Niedrigsalzdiät
COX	Cyclooxygenase		
Cy2	Carbocyanin		
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	MR	Mineralocorticoid Rezeptor
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	mRNA	messenger RNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Na	Natrium
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	Na2HPO	di-Natriumhydrogenphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NaCl	Natriumchlorid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	NaOH NCC	Natriumhydroxid Natriumchlorid-Kotransporter
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	NO	Stickstoffmonoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	PBS PCR	phosphate buffered saline Polymerasekettenreaktion
et al.	und andere (et alii)		

RAAS	Renin-Angiotensin- Aldosteron-System	TRITC	Tetramethylrhodamin
		üN	über Nacht
RNA	Ribonukleinsäure	V.	Vena(e)
RNase	Ribonuklease	WT NS	Wildtyp-Maus mit
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium channel		Normalsalzdiät
		WT LS/E	Wildtyp-Maus mit
RT	Raumtemperatur		Niedrigsalzdiät
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer	z.B.	zum Beispiel
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl-) amino-methan		

7.3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in der letzten Zeit unterstützt haben und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe des interessanten Themas und der Bereitstellung der benötigten Geräte und Arbeitsmaterialien. Sein stetes Interesse und sein Engagement, waren mir eine Motivation und ein Ansporn.

Frau Dr. Katharina Machura möchte ich für die ununterbrochene und geduldige Unterstützung bei allen Teilaspekten der Arbeit danken. Sie war ein zuverlässiger Ansprechpartner bei Problemen und half mir bei der Einarbeitung in alle Arbeitsschritte.

Sehr hilfreich und motivierend war auch die gute Arbeitsatmosphäre am Institut dank der netten Mitarbeiter dort und ihrer schnellen Hilfe bei kleineren Schwierigkeiten.

Frau Anna M-Bangui und Marina Ivaysayuk bin ich für die freundliche Einweisung in das Arbeiten mit den Gerätschaften und den histologischen Arbeitstechniken sehr dankbar.

Zuletzt möchte ich erwähnen, wie wichtig meine Freunden und meine Familie waren, die mich während der gesamten Arbeit durchweg unterstützt haben.

7.4. Erklärung

Diese Dissertation wurde angeregt und während der Ausarbeitung überwacht von Professor Doktor Armin Kurtz.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 26.05.2014

Catharina Keßler