

Reninexpression in der
Angiotensin II-AT_{1a}-Rezeptor-
und Connexin 40-
Doppel-Knockout-Maus

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
vorgelegt der Fakultät für
Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Hanna Müller
aus Oberachern
im Jahr 2014

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Mai 2010 bis Dezember 2012 unter der Anleitung von Prof. Dr. Armin Kurtz und unter der Betreuung von Dr. Katharina Machura am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 04.06.2014

Die Promotion wurde verteidigt am: 13.10.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Armin Kurtz
2. Gutachter: Herr PD Dr. Rudolf Fuchshofer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie der Niere	1
1.2	Das Blutgefäßsystem in der adulten Mausniere	4
1.3	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	5
1.4	Reninsynthese und -sekretion	7
1.5	Regulation der Reninsynthese und -sekretion	8
1.5.1	Faktoren der physiologischen Regulation	9
1.5.1.1	Blutdruck	9
1.5.1.2	Salzhaushalt und Macula Densa	9
1.5.1.3	Das sympathische Nervensystem	10
1.5.1.4	Angiotensin II	10
1.5.2	Humorale und lokal sezernierte Faktoren	11
1.5.3	Faktoren der zellulären Regulation	11
1.5.3.1	Der cAMP-Signalweg	11
1.5.3.2	Der cGMP-Signalweg	12
1.5.3.3	Calcium und Proteinkinase C	12
1.6	Die juxtaglomeruläre Zelle	13
1.7	Gap junctions und Connexine	16
1.7.1	Gap junctions	16
1.7.2	Connexine in der Niere	17
1.8	Fragestellung und Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Verbrauchsmaterial	22
2.1.3	Chemikalien, Enzyme, Kits	23
2.1.4	Primer	24
2.1.5	Antikörper	25
2.1.6	Puffer und Lösungen	25
2.1.6.1	Immunhistochemie	25
2.1.6.2	Molekularbiologie	26
2.1.7	Software und Internetdienste	27
2.2	Methoden	27

2.2.1	Versuchstiere	27
2.2.1.1	Niedrigsalz- und Hochsalzbehandlung	27
2.2.2	Histologische Methoden	28
2.2.2.1	Fixierung des Nierengewebes	28
2.2.2.2	Retrograde arterielle Perfusion	28
2.2.2.3	Einbettung in Paraffin	28
2.2.2.4	Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung	29
2.2.2.5	Immunhistochemische Färbung	29
2.2.3	Dreidimensionale Rekonstruktion	31
2.2.3.1	Mikroskopie und Digitalisierung	31
2.2.3.2	AxioVision LE Rel.4.5	31
2.2.3.3	Datenaufbereitung mittels ImageJ	32
2.2.3.4	3D-Rekonstruktion mit Amira	32
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.4.1	Isolierung von Total-RNA aus Nieren	35
2.2.4.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	37
2.2.4.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)	37
2.2.4.4	Genotypisierung	39
3	Ergebnisse	42
3.1	Qualitative und quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters	42
3.1.1	Die adulte Wildtyp-Maus	43
3.1.2	Die adulte AT _{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus	47
3.1.3	Die adulte Cx40-Knockout-Maus	52
3.1.4	Die adulte AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus	58
3.1.4.1	Die AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus unter Normalsalzdiät [NS]	58
3.1.4.2	Die AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus nach 10d Niedrigsaldität [LS]	64
3.1.4.3	Die AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus nach 10d Hochsalzdiät [HS]	70
3.1.5	Quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters	75
3.2	3D-Analyse des renalen arteriellen Gefäßsystems	76
3.2.1	Die adulte Wildtyp-Maus	76
3.2.2	Die adulte AT _{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus	77
3.2.3	Die adulte Cx40-Knockout-Maus	79
3.2.4	Die adulte AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus	80
3.2.5	Vergleichende Analyse des renalen arteriellen Gefäßsystems	84
4	Diskussion	85
4.1	Vergleichende Analyse des Reninexpressionsmusters der rekonstruierten Modelle	86

4.1.1	Die adulte Wildtyp-Maus	86
4.1.2	Die adulte AT _{1a} -KO-Maus	86
4.1.3	Die adulte Cx40-KO-Maus	86
4.1.4	Die adulte AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus	87
4.2	Vergleichende Analyse der rekonstruierten Gefäßbäume	92
4.2.1	Die adulte Wildtyp-Maus	92
4.2.2	Die adulte Cx40-KO-Maus	92
4.2.3	Die adulte AT _{1a} -KO-Maus	92
4.2.4	Die adulte AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus	93
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	97
7	Anhang	109

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Anatomie der Niere

Die Niere von Nagetieren stimmt grundsätzlich mit der Struktur der Niere von Säugetieren, dem Menschen inbegriffen, überein (Weisert, 1990). Während es sich bei der Mäuseniere jedoch um eine unipapilläre Niere handelt, besteht die menschliche Niere aus 8-21 Einheiten.

Die Nieren befinden sich im Retroperitonealraum, umschlossen von einer großzügigen Fettkapsel, der Capsula adiposa renalis, die dem mechanischen und thermischen Schutz des Organs dient.

Makroskopischer Aufbau: Die Nieren haben eine bohnenförmige Gestalt und besitzen zentral an ihrer medialen Seite eine Einziehung, das Hilum renale. Dies ist die Eintritts- bzw. Austrittsstelle für die Vena renalis, die Arteria renalis, den Ureter sowie einige Lymphgefäße und Nerven. Der Hilus erweitert sich in den Sinus renalis, welcher das Nierenbecken (Pelvis renalis), Gefäße, Nerven und Fettgewebe enthält. Umgeben wird die Niere von der Nierenkapsel (Capsula fibrosa), welche aus straffem, geflechtartigem Bindegewebe aufgebaut ist.

Mikroskopischer Aufbau: Bei einem Schnitt durch die Niere lässt sich schon mit bloßem Auge eine Gliederung in Rinde (Cortex renalis) und Mark (Medulla renalis) erkennen, die sich in Struktur und Färbung unterscheiden (H.Hees/F. Sonowatz, 2000). Die Nierenrinde liegt von unten der Nierenkapsel an und umfasst von oben das pyramidenförmige Nierenmark. Sie enthält die Nierenkörperchen und die gewundenen Teile (Pars convoluta) des Tubulussystems.

Das Nierenmark wird in eine äußere Zone (Zona externa) mit einem Außen- und einem Innenstreifen und eine innere Zone (Zona interna) untergliedert. Von der Basis der Markpyramide aus ziehen Markstrahlen bis in die Rinde und unterteilen hierdurch den Kortex in die sogenannten Rindenlabyrinth. Die Pyramidenspitze, die Papille, ragt ins Nierenbecken (Pelvis renalis) und wird von diesem allseits umschlossen. Die Papille wird in der Längsrichtung von Sammelrohren, Intermediärtubuli und Blutkapillaren durchzogen (Junqueira et al., 2002; Weisert, 1990).

Die strukturelle und funktionelle Einheit der Niere stellt das Nephron dar (Abb. 1.1). Es besteht aus dem Nierenkörperchen (Corpusculum renale = Malpighisches

Körperchen) und dem sich anschließenden Tubulussystem (Tubulus renalis). In jedes Nierenkörperchen mündet eine afferente Arteriole, die sich am Gefäßpol in ein Kapillarknäuel (Glomerulus) mit zahlreichen anastomosierenden Kapillarschlingen teilt und als efferente Arteriole ebenfalls am Gefäßpol das Nierenkörperchen wieder verlässt. Die Filtrationsfläche ist durch die Schlingenbildung der Glomeruluskapillaren vergrößert (Junqueira et al., 2005).

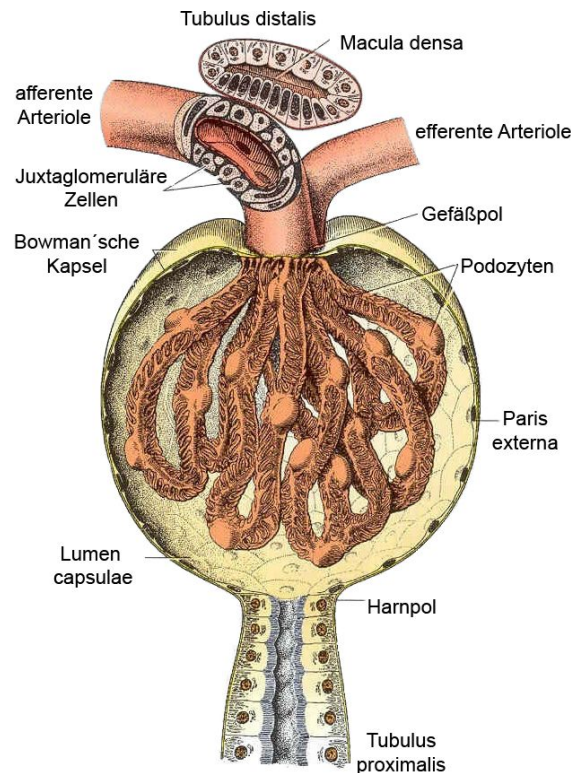


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Glomerulus (Abbildung nach Junqueira, 2002)

Die Kapillarschlingen werden vom Mesangium gestützt. Hierbei handelt es sich um verzweigte, kontraktile Mesangiumzellen und der sie umgebenden Mesangiummatrix. Eine besondere Stabilisierung der Wände erscheint nötig, da das transmurale Druckgefälle bei den glomerulären Kapillaren höher ist als bei üblichen Kapillaren (Lüllmann-Rauch, 2006). Das Mesangium setzt sich nach außen fort in das extraglomeruläre Mesangium, welches zwischen afferenter und efferenter Kapillare und Macula Densa zu liegen kommt. Die Macula Densa beschreibt einen Teil des distalen Tubulus mit schmalen, hochprismatischen Zellen mit dichtgelagerten Zellkernen, welcher Verbindung zum zugehörigen Glomerulus hat. Das extraglomeruläre Mesangium ist neben der Macula Densa und den juxtaglomerulären Zellen Bestandteil des juxtaglomerulären Apparates. Hierbei handelt es sich um eine am Gefäßpol der Glomerula gelegene Struktur, die im Dienste von renalen und extrarenalen Regulationsvorgängen steht (H.Hees/F. Sonowatz, 2000). Die juxtaglomerulären Zellen

sind granuliert, modifizierte glatte Muskelzellen, die ihre typische Lokalisation in der Wand der afferenten Kapillare kurz vor Eintritt in den Gefäßpol haben. Sie enthalten in Sekretgranula verpackt das vasoaktive Hormon Renin.

Umgeben wird das Glomerulus von der sogenannten Bowman'schen Kapsel (*Capsula glomeruli*). Ihr viszerales Blatt wird von speziellen Zellen, den sogenannten Podozyten gebildet, welche mit fußförmigen Fortsätzen die Kapillaren umfassen. Ihr parietales Blatt besteht aus einem einschichtigen Epithel, welches am Harnpol in das Tubulusepithel übergeht. Zwischen viszeralem und parietalem Blatt befindet sich der Kapselraum, in dessen Mitte die Filtration des Blutplasmas erfolgt. Das Filtrat muss hierbei drei Schichten überwinden. Zwischen Gefäßlumen und dem Kapselraum liegen das Kapillarendothel, die Basalmembran und das viszerale Blatt der Bowman'schen Kapsel. Das Endothel der Kapillaren ist vom fenestrierten Typ, dessen Fenster mit einem Durchmesser von 50-100 nm nicht von einem Diaphragma verschlossen sind. Das Glykoproteingeflecht der anschließenden Basallamina besitzt eine Maschenweite von 6-9 nm und wirkt als Ultrafilter. Das von den Podozyten gebildete innere Blatt enthält Schlitzporen von <50 nm Weite, die zwischen den nebeneinanderliegenden Podozytenfortsätzen entstehen. Durch diesen Filter presst der hydrostatische Kapillardruck den Primärharn, ein proteinfreies Ultrafiltrat des Blutplasmas, in das Lumen des Nephrons. Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 70 kDa werden von diesem Filter vollständig zurückgehalten (Wehner et al., 2007).

Der Primärharn verlässt das Nierenkörperchen über den Harnpol in das Tubulussystem (Abb. 1.2). Dieses wird in unterschiedliche Abschnitte unterteilt, beginnend mit dem proximalen Tubulus. Er besteht aus einem stark gewundenen Teil (*Pars convoluta* oder *Pars contorta*), welcher sich im Rindenbereich befindet und einem kurzen, geraden Teil (*Pars recta*), welcher im Mark lokalisiert ist. Der proximale Tubulus geht in den Intermediärtubulus (*Tubulus attenuatus*) über, der einen absteigenden Teil (*Pars descendens*) und einen aufsteigenden Teil (*Pars ascendens*) besitzt. Er setzt sich fort in den distalen Tubulus, der zunächst mit einem geraden Teil (*Pars recta*) im Mark aufsteigt und mit der *Macula Densa* den Gefäßpol seines Glomerulus berührt und schließlich in einen gewundenen Teil (*Pars convoluta* oder *Pars contorta*) übergeht, welcher ausschließlich im Rindenlabyrinth zu liegen kommt (Lüllmann-Rauch, 2006). Die *Pars recta* des proximalen Tubulus, der Intermediärtubulus und *Pars recta* des distalen Tubulus werden auch als Henle-Schleife bezeichnet. Im proximalen und distalen Tubulus findet der überwiegende Teil der Resorptionsvorgänge statt, welche zur Bildung des Sekundärharnes beitragen. Über den Verbindungstubulus wird der Harn in das Sammelrohr (*Tubulus renalis colligens*) weitergeleitet. Das Sammelrohr zieht von der Nierenrinde aus durch das Nierenmark und vereinigt sich mit weiteren Sammelrohren in der *Zona interna* des Marks zu den *Ductus papillares*, welche an der Papillenspitze in das Nierenbecken münden (Junqueira et al., 2002; Weisert, 1990). Über Ureter, Harnblase und Urethra wird der Harn schließlich abgelassen.

1.2 Das Blutgefäßsystem in der adulten Mausniere

Die Niere ist eines der am besten durchbluteten Organe. Auf sie entfallen 20-25% des Herzzeitvolumens. Hierbei ist die Anatomie des renalen Blutgefäßsystems einzigartig und entscheidend für die Funktion der Niere.

Die Arteria renalis geht beidseits direkt aus der Bauchaorta hervor und tritt im Nierenhilus ein, hierbei teilt sie sich bereits in einen ventralen und einen dorsalen Ramus. Im Sinus renalis erfolgt eine weitere Aufteilung in zwei Äste, die Arteriae interlobares, die in das Nierenparenchym eindringen und ein Stück in die Peripherie ziehen (H.Hees/F. Sonowatz, 2000). Ihr Versorgungsgebiet umfasst ein Nierensegment, wobei einige wenige Segmentarterien auch auf benachbarte Nierensegmente übergehen (Sauter et al., 2008; Weisert, 1990).

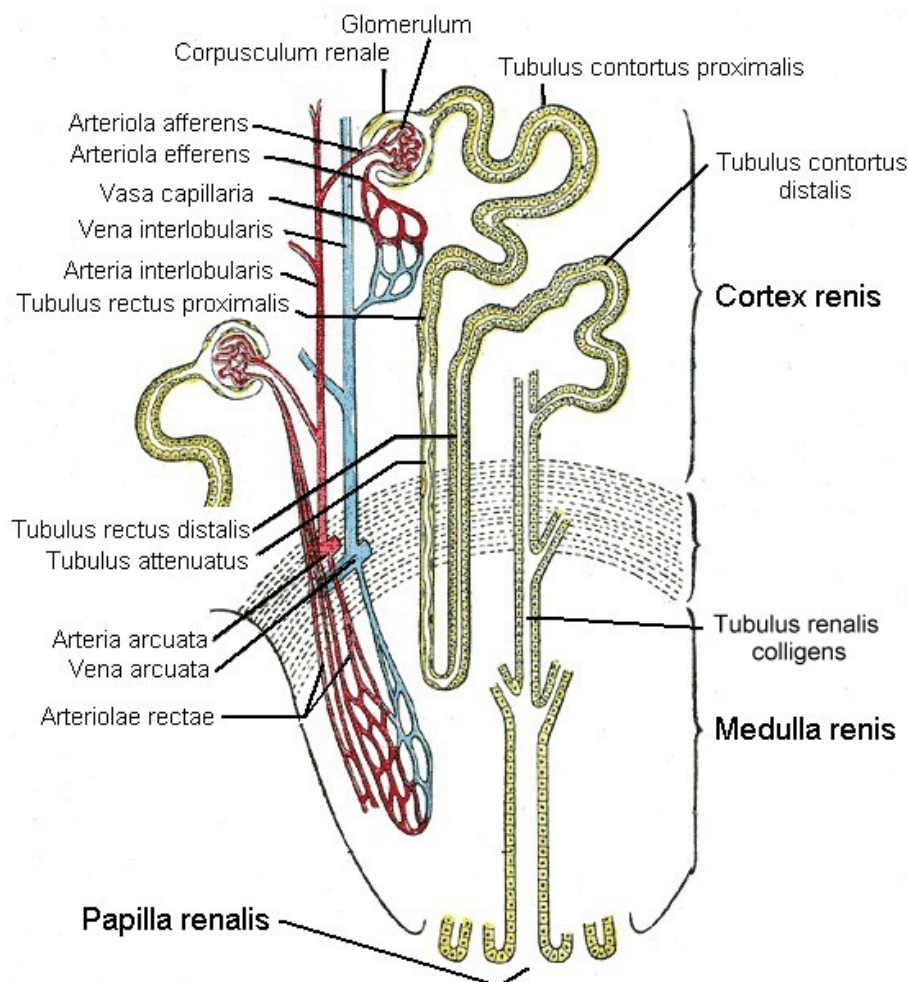


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Blutgefäßsystems (Gray's Anatomy)

Von den Arteriae interlobares entspringen die Arteriae arcuatae, die bogenförmig an der Mark-Rinden-Grenze verlaufen und sowohl Mark wie auch Rinde versorgen

(Abb. 1.2). Im Bereich des Kortex gehen die arcuaten Seitenäste und Arteriae interlobulares als Äste der Arteriae arcuatae hervor. Von ihnen gehen in unregelmäßigen Abständen die afferenten Arteriolen ab, welche im Glomerulus ein Kapillarknäuel, die glomerulären Kapillaren bilden. In diesen Gefäßschlingen findet die Ultrafiltration des Blutplasmas statt.

Die Kapillarschlingen verlassen das Glomerulus als efferente Arteriolen, die sich wiederum erneut aufzweigen. Der Durchmesser der afferenten Arteriolen ist deutlich größer als derjenige der efferenten Arteriolen. Dies trägt zur Aufrechterhaltung des Filtrationsdrucks innerhalb der Glomeruli bei (Sauter et al., 2008). Je nach Lokalisation der Glomeruli innerhalb der Niere, ob subkapsulär oder mark-nah gelegen, nehmen die efferenten Arteriolen unterschiedliche Wege. So geben die efferenten Arteriolen oberflächlich gelegener kortikaler Glomeruli die peritubulären Kapillaren ab, die ein Gefäßnetz um die Tubuli in der Nierenrinde bilden. An die efferenten Arteriolen aus tiefer gelegenen Glomeruli, den sogenannten juxtamedullären Glomeruli setzen die Vasa recta an, welche parallel zu den Henle-Schleifen und Sammelrohren zur Papille absteigen und ebenso wieder zur Mark-Rindengrenze aufsteigen (Junqueira et al., 2005). Sie bilden hierbei ein zweites Kapillargebiet, welches der Harnkonzentration und dem Abtransport in der Medulla resorbierter Stoffe dient und versorgen zudem das Nierenmark (Leonhardt et al., 1987).

Der venöse Abfluss der Vasa recta und peritubulären Kapillaren erfolgt schließlich über die Venae interlobulares, die das Blut über die Venae arcuatae und Venae interlobares zur Vena renalis leiten (Abrahamson et al., 1991; Anderhuber and Weiglein 1992; Klinke und Silbernagel, 1996).

1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Abb. 1.3) dient der Aufrechterhaltung des Blutdrucks und der Salz-Wasser-Homöostase (Davis and Freeman, 1976; Wagner and Kurtz, 1998). Somit setzen das Unterschreiten einer kritischen Blutdruckgrenze an Barorezeptoren des Vas afferens, eine zu niedrige Natriumchlorid-Konzentration am distalen Tubulus oder die Stimulierung der juxtaglomerulären Zellen durch das sympathische Nervensystem durch die Ausschüttung von Renin aus der juxtaglomerulären Zelle eine Signalkaskade in Gang.

Renin fungiert als Aspartylprotease und spaltet vom Glykoprotein Angiotensinogen, welches von der Leber synthetisiert und in das Blutplasma sezerniert wird, das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) ab. Angiotensin I wiederum wird hauptsächlich durch das an der Oberfläche der Endothelzellen der Lungenkapillaren befindliche Angiotensin Converting Enzym (ACE) unter Abspaltung eines Dipeptids am C-terminalen Ende, zum Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) hydrolysiert (Unger et al., 1996). Angiotensin II stellt den eigentlichen physiologischen Effektor des Systems dar (Levens et al., 1981). Die Signalweiterleitung erfolgt über ANG II-Rezeptoren, wobei verschiedene Subtypen unterschieden werden müssen, von denen der AT_1 - und der AT_2 -Rezeptor die Wichtigsten darstellen. Eine weitere Unterglie-

derung des AT_1 -Rezeptors in AT_{1a} - und AT_{1b} -Rezeptoren besteht.

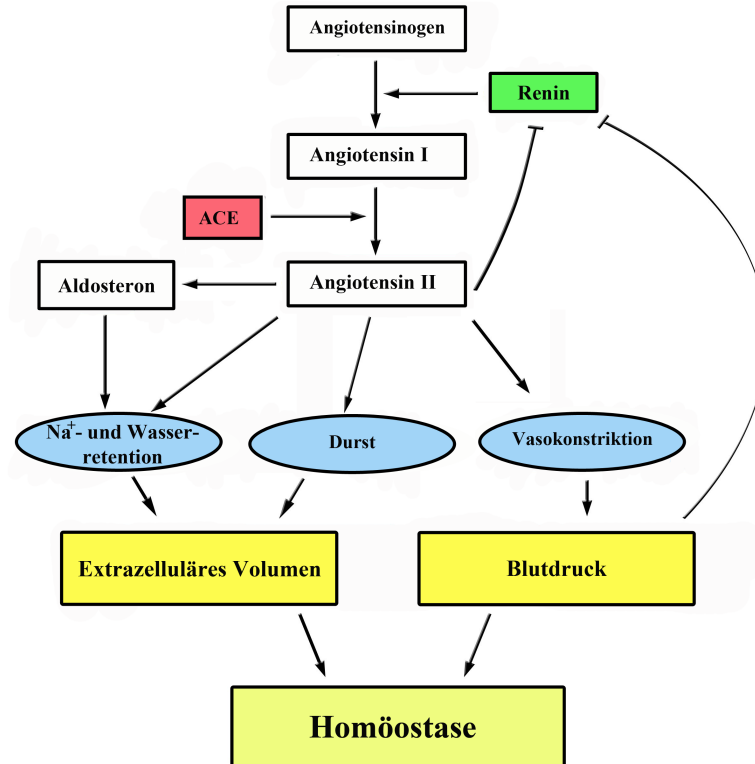


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Signalkaskade des RAAS

Im adulten Lebewesen wird der AT_1 -Rezeptor wesentlich stärker exprimiert als der AT_2 -Rezeptor (de Gasparo et al., 2000). Die vom AT_1 -Rezeptor vermittelten Effekte haben über unterschiedliche Wege Einfluss auf Blutdruck und den Salz-Wasser-Haushalt mit dem Ziel einen stabilen Kreislauf und eine ausreichende glomeruläre Filtration zu gewährleisten. Die Aktivierung des AT_1 -Rezeptors an den Endothelzellen der Gefäße hat eine Vasokonstriktion und somit eine Erhöhung des Gefäßwiderstands zur Folge. Eine systemische Vasokonstriktion erfolgt über die ANG II vermittelte Aktivierung des Kreislauf-Zentrums im Hypothalamus. Außerdem löst ANG II im Hypothalamus eine vermehrte ADH-Sekretion und Durstgefühl aus und fördert den NaCl-Appetit (Silbernagl et al., 2007).

Eine weitere Wirkung von ANG II vermittelt durch den AT_1 -Rezeptor findet an den Zellen der Nebennieren statt. Hier kommt es in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde zur vermehrten Synthese und Sekretion des Mineralocorticoids Aldosteron, welches zu erhöhter Kochsalz- und Wasserrückresorption in den Nierentubuli führt. Im Nebennierenmark erfolgt die vermehrte Freisetzung von Adrenalin, was über dessen vasokonstriktorische Wirkung ebenfalls eine Erhöhung des Gefäßwiderstands und somit des Blutdrucks bewirkt. Ist der Sollblutdruck wieder erreicht, so norma-

lisiert sich die Reninausschüttung.

Eine Hemmung der Reninausschüttung erfährt das RAAS im Sinne einer negativen Rückkoppelung. Hierbei wirken ANG II und Aldosteron inhibitorisch auf die juxtaglomerulären Zellen.

Die Aktivität des RAAS hängt unter physiologischen Bedingungen in erster Linie von der Reninsynthese und -sekretion ab. Angiotensinogen und ACE sind im gesunden Individuum im Überangebot vorhanden, so dass die Reninkonzentration im Blut den limitierenden Faktor darstellt (Kurtz, 1989; Mercure et al., 1998; Peters and Clausmeyer, 2002).

Die Funktion des AT₂-Rezeptors war lange Zeit ungeklärt. In den letzten Jahren erscheinen vermehrt Studien, die sich mit dessen Struktur und Funktion befassen. So ist inzwischen bekannt, dass ANG II an beide Rezeptorsubtypen mit annähernd gleicher Affinität bindet, obwohl diese lediglich eine 30-34%ige Homologie aufweisen (de Gasparo et al., 2000). Die Funktion des AT₂-Rezeptors unterscheidet sich allerdings maßgeblich von denen des AT₁-Rezeptors. So werden bisher eine anti-proliferative Wirkung auf Endothelzellen, ein gewebeprotektiver Effekt für neuronales Gewebe, Herz, Niere und weitere Organe und eine antiinflammatorische Wirkung beschrieben (Steckelings, 2011).

Neben dem renalen RAAS konnten in zahlreichen weiteren Organen lokale Renin-Angiotensin-Systeme nachgewiesen werden (Paul et al., 2006). Die jeweilige lokale Funktion der unterschiedlichen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systeme sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

1.4 Reninsynthese und -sekretion

Die Struktur des Reningens wurde bereits erfolgreich für verschiedene Spezies analysiert und charakterisiert. Sequenzanalysen zeigten große Übereinstimmungen zwischen den unterschiedlichen Arten. So besteht das Reningen von Maus, Ratte und Kaninchen aus 8 Introns und 9 Exons. Mensch und Schaf besitzen ein zusätzliches Exon (Exon 5A), das drei weitere Aminosäuren kodiert (Castrop et al., 2010; Dzau et al., 1988).

Eine Besonderheit ist die Existenz eines zweiten reninkodierenden Genortes bei einem Teil der Mäusepopulation. So besitzen einige Labormausstämme zwei Reningene Ren-1D und Ren-2 (129Sv), wohingegen andere Stämme lediglich ein Reningen, das Ren-1C (C57Bl6), aufweisen. Man erklärt sich das zusätzliche Reningen durch eine vor circa drei Millionen Jahren stattgefundenene Genduplikation (Dickinson et al., 1984; Holm et al., 1984). Das Genprodukt des Ren-2-Gens wird hauptsächlich in den submandibulären Drüsen exprimiert und besitzt im Gegensatz zum Ren-1C und Ren-1D-Genprodukt keine Glykosylierungsstellen und wird aufgrunddessen nicht reguliert exozytiert, sondern konstitutiv sezerniert (Dzau et al., 1988; Morris, 1992).

Die Reninsynthese in den JG-Zellen beginnt mit der Transkription und Translation unter Erhalt des Präprorenin-Proteins (Abb. 1.4). Dieses wird unter Abspaltung der

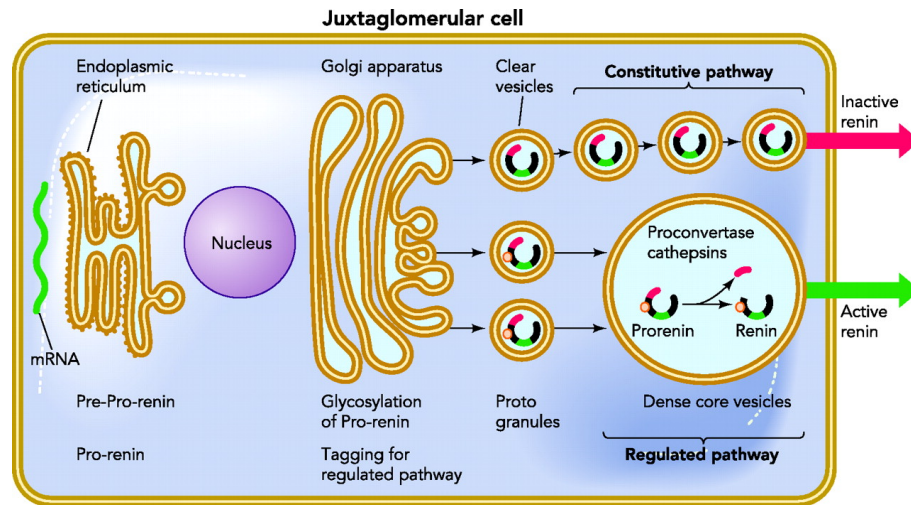


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Reninsynthese und –sekretion (Abbildung Schweda et al., 2007)

Signalsequenz in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums verlagert. Das hierdurch entstandene enzymatisch inaktive Prorenin gelangt zur weiteren Modifizierung und Verpackung in sekretorische Vesikel in den Golgi-Apparat (Morris, 1992; Schweda et al., 2007). Hier wird es entweder als inaktives Renin mittels kleiner Vesikel konstitutiv sezerniert oder zur regulierten Exozytose durch Mannose-6-Phosphatreste zunächst glykosyliert und anschließend mittels Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren in prälysosomale Kompartimente transportiert (Bader and Ganten, 2000; Chao et al., 1990; Faust et al., 1987). Das Prorenin wird an dieser Stelle in Speichervesikel verpackt und im Innern dieser Vesikel unter Verkürzung des N-Terminus um 46 Aminosäuren in die enzymatisch aktive Form überführt (Schweda et al., 2007; Taugner et al., 1987). Die Renin-Vesikel gelangen zur Zellmembran und fusionieren zu dichtbepackten Granula, die durch ihre hohe Anzahl der JG-Zelle ihre typische kubische Form und ihr gekörntes Aussehen verleihen. Bei einer regulierten Exozytose verschmelzen die Speichergranula mit der Plasmamembran und entlassen das Renin in die Blutbahn (Skott et al., 1986; Taugner et al., 1984). Die Sekretion erfolgt hierbei schubweise nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip (Peti-Peterdi et al., 2004).

1.5 Regulation der Reninsynthese und -sekretion

Die Synthese und Sekretion von Renin in den juxtaglomerulären Zellen der Niere war bereits Bestandteil zahlreicher Studien, die eine Fülle an Regulationsmechanismen zum Erhalt der Salz- und Wasserhomöostase zum Vorschein brachten. Diese komplexen Vorgänge finden sowohl auf zellulärer Ebene, wie auch auf klassischen physiologischen Wegen statt.

Die bedeutendsten Regulationsmechanismen sollen im Folgenden beleuchtet werden.

1.5.1 Faktoren der physiologischen Regulation

1.5.1.1 Blutdruck

Der Organismus ist bestrebt einen ausreichenden renalen Perfusionsdruck aufrecht zu erhalten. Kommt es nun im Rahmen eines generellen Blutdruckabfalls oder bedingt durch eine Stenose der Arteria renalis zum Absinken des renalen Perfusionsdrucks, hat dies eine gesteigerte Reninexpression und Reninsekretion zur Folge. Ein erhöhter Blutdruck führt hingegen zur Hemmung der Reninfreisetzung (Skinner et al., 1964). Es wird vermutet, dass dieser Effekt durch einen bisher nicht näher geklärten Barorezeptor vermittelt wird. Untersuchungen legen die Annahme nahe, dass es sich hierbei um einen in der Niere selbst lokalisierten Barorezeptor handeln muss, da Versuche an der isoliert perfundierten Niere ebenfalls einen blutdruckabhängigen Effekt der gesteigerten, bzw. gehemmten Reninsynthese und -sekretion ergaben (Bock et al., 1992; Scholz et al., 1994).

Weitere Forschungsgruppen befassten sich mit blutdruckassoziierten Mechanismen auf zellulärer Ebene. In isolierten JG-Zellen wurde gezeigt, dass mechanische Dehnung, die physiologisch durch einen erhöhten renalen Perfusionsdruck auf die JG-Zellen im Vas afferens zustandekommt, eine verminderte Renin-mRNA-Synthese und Reninsekretion zur Folge hat (Carey et al., 1997, Ryan et al., 2000). Im Detail vermutete man, dass es zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der Gefäßmuskelzellen im juxtaglomerulären Apparat kommt, bedingt durch den luminalen Druckanstieg. Die dadurch ausgelöste Kontraktion führt zur Dehnung der Zellmembran, was ein verändertes Membranpotential zur Folge hat (Bader and Ganten, 2000; Fray, 1976).

Auch wenn die genauen Zusammenhänge bisher noch nicht vollständig entschlüsselt sind, scheint die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ein unabdingbarer Faktor für die Regulation der Reninsekretion zu sein (Ryan et al., 2000; Scholz et al., 1994).

1.5.1.2 Salzhaushalt und Macula Densa

Seit langem ist bekannt, dass der Salzhaushalt des Körpers einen bestimmenden Faktor für die Regulation der Reninsynthese und -sekretion darstellt (Davis and Freeman, 1976). Tiere, die unter Nidrigsalzdiät gehalten werden, zeigen eine gesteigerte Reninexpression und -sekretion, wohingegen Tiere unter Hochsalzdiät eine gehemmte Reninexpression und -sekretion aufweisen (Holmer et al., 1993).

Perfusionsexperimente an mikrodissezierten JGAs, bei denen Einflussnahme durch sympathische Innervierung oder lokale hämodynamische Effekte ausgeschlossen werden konnten, zeigten eine direkte Beziehung zwischen NaCl-Konzentration und Reninsekretion (Skott und Briggs, 1987). Die Messung der tubulären NaCl-Konzentration erfolgt hierbei über die Zellen der Macula Densa (Schnermann, 1998; Vander, 1967). Die Macula Densa hat direkten Einfluss auf den Gefäßwiderstand von afferenter und efferenter Arteriole über den tubuloglomerulären Feedback (TGF). So vermittelt sie bei verminderter Salzkonzentration über Vasodilatation eine gesteigerte glomeruläre Filtration (Castrop et al., 2004). Über die regulierende Funktion der Macula Densa

auf den Salzhaushalt, hat sie Einfluss auf den Wasserhaushalt des Organismus und demzufolge auf den systemischen Blutdruck. Somit beeinflusst sie auf unterschiedliche Art und Weise die Reninsynthese und -sekretion.

1.5.1.3 Das sympathische Nervensystem

Die sympathische Innervierung am Nephron erfolgt an den Glattmuskelzellen afferenter und efferenter Gefäße, an proximalen und distalen Tubuli, an der Henle-Schleife und auf JG-Zellen (Barajas et al., 1992; DiBona, 2000). Somit hat der Sympathikus über verschiedene Wege Einfluss auf die Funktionen der Nephrone. Er kann über α - und β_2 -Rezeptoren an den Gefäßen Vasokonstriktion, bzw. -dilatation bewirken, somit den Blutdruck modulieren und indirekt Einfluss auf die Reninproduktion nehmen. Eine direkte Stimulation der Reninproduktion kann er mittels β_1 -Rezeptoren, die auf den JG-Zellen und Glomeruli nachgewiesen wurden, auf die JG-Zellen ausüben (DiBona, 2000; Lew and Summers, 1987). In Versuchen konnte über elektrische Stimulation renaler Nervenfasern eine gesteigerte Reninsekretion ausgelöst werden. Während nach Durchtrennung dieser Nervenfasern eine verringerte Reninproduktion und -sekretion festgestellt wurde (DiBona, 1994). Zirkulierende oder lokal sezernierte Katecholamine wie Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin können an die β_1 -adrenergen Rezeptoren binden und im Inneren der Zelle über das stimulatorische G-Protein Gs die Adenylatcyclase und damit den cAMP-Signalweg aktivieren. Die intrazelluläre Erhöhung des cAMPs führt zum Anstieg der Reninsekretionsrate (Holmer et al., 1997; Kurtz und Wagner, 1999; Wagner et al., 1999). Jedoch scheint diese direkte Beeinflussung des Sympathikus örtlich auf unmittelbare Nähe des JGA begrenzt zu sein. Kommt es im Rahmen der retrograden Rekrutierung zu einer Expansion reninhaltiger Zellen auf proximal gelegene Gefäßabschnitte, so konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung sympathischer Nervenfasern an den rekrutierten Zellen zu keiner Stimulation führt (Wagner et al., 1999).

1.5.1.4 Angiotensin II

Angiotensin II nimmt über seine bereits erwähnten physiologischen Funktionen Einfluss auf Blutdruck und Salzhaushalt und somit auch indirekt auf die Reninsekretion im Sinne einer negativen Rückkopplung (Hackenthal et al., 1990). Einige Versuche gaben Hinweise auf eine direkte Regulation der Reninproduktion durch ANG II. So kam es in der isoliert perfundierten Niere als Reaktion auf ANG II-Gabe zur Hemmung der Reninsekretion (Vandogen et al., 1974). Bei direkter intravenöser Gabe von Angiotensin II war ebenfalls eine Hemmung der Reninsekretion wie auch der Reninexpression zu beobachten (Schunkert et al., 1992). Weitere Forschungsergebnisse zeigten eine starke Zunahme der Reninproduktionsrate nach pharmakologischer Behandlung mit AT_1 -Rezeptor-Blockern oder Gabe von ACE-Hemmern (Höcherl et al., 2001; Kono et al., 1981; Oates et al., 1972). Bei der AT_{1a} -Knockoutmaus, bei der durch das Fehlen des AT_{1a} -Rezeptors die durch ANG II-Bindung ausgelösten intrazellulären Vorgänge nicht mehr kontrolliert aktiviert werden können, kam es zu einer massiven Rekrutierung reninbildender Zellen (Oliverio et al., 1998). Studien weisen

darauf hin, dass eine direkte intrazelluläre AT_{1a} -Rezeptor-vermittelte Wirkung des ANG II eher unwahrscheinlich ist. Die beobachteten Effekte werden dem Einfluss von ANG II auf den Blutdruck und dem Barorezeptor-Mechanismus zugeschrieben (Crowley et al., 2005).

1.5.2 Humorale und lokal sezernierte Faktoren

Neben diesen klassischen Faktoren der Reninregulation haben auch humorale und lokal sezernierte Faktoren Einfluss auf die Synthese und Sekretion von Renin. Untersuchungen belegen die Stimulation der Reningenexpression und Reninsekretion durch Adrenomedullin, Bradykinin, das Calcitonin Gene related Peptide (CGRP), Dopamin, Histamin, NO, die Prostaglandine PGE₂ und PGI₂, sowie Thyroxin und Triiodthyronin (Chen et al., 2007; Hackenthal et al., 1990; Jensen et al., 1997; Keeton und Campell, 1980; Kurtz et al., 1988; Schwertschlag und Hackenthal, 1982). Eine hemmende Wirkung auf das Reninsystem haben hingegen Adenosin, das atriale natriuretische Peptid (ANP), Endothelin, Interleukin-1 und -6, der platelet activating factor (PAF), TGF- β II, der Tumor Necrosis Factor TNF α oder auch das Hormon Vasopressin (Hackenthal et al., 1990; Kageyama 1990; Keeton und Campell, 1980; Kurtz et al., 1986; Kurtz et al., 1988; Petrovic et al., 1997; Pfeilschifter et al., 1985; Pietri et al., 2002; Scholz et al., 1995; Todorov et al., 2002;).

1.5.3 Faktoren der zellulären Regulation

Auf zellulärer Ebene findet die Steuerung der Reninproduktion über die klassischen Second-Messenger-Systeme cAMP, cGMP und Calcium statt.

1.5.3.1 Der cAMP-Signalweg

Unter den intrazellulären Signalwegen, die in Verbindung mit der Regulation der Reninsekretion stehen, ist die cAMP-Signalkaskade, die am meisten etablierte (Hackenthal et al., 1990). Die Aktivierung des cAMP-Signalwegs erfolgt über Ligandenbindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (Chen et al., 2007; Neubauer et al., 2009). Aktivatoren des Systems sind hierbei Calcitonin-related peptide (CGRP), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und I₂ (PGI₂), Prostazyklin und β -adrenerge Aktivatoren (Kurtz, 1989). Nach Bindung an den Rezeptor erfolgt die Übertragung des Signals auf das membranständige stimulierende G-Proteins G_s. Das G-Protein ist aus den drei Untereinheiten α , β und γ aufgebaut. Im aktivierten Zustand dissoziiert die α -Untereinheit von dem $\beta\gamma$ -Komplex und diffundiert zu der membranständigen Adenylatcyclase, die sie aktiviert. Diese wiederum katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. Somit kommt es zu einem cAMP-Anstieg in der Zelle. cAMP verhindert die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und reduziert die Calcium-Permeabilität der Zellmembran, was einen positiven Effekt auf die Reninsekretion hat (DellaBruna et al., 1993). Überdies aktiviert cAMP die Proteinkinase A, welche die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element binding protein) katalysiert (Lalli et al., 1994). CREB befindet sich am

CR-Elemente (CRE; cAMP response element) des Reningen-Promotors und bewirkt nach erfolgter Phosphorylierung die Transaktivierung der Reninexpression (Klar et al., 2002; Pan et al., 2001). Untersuchungen an einer reninzellspezifischen $G\alpha$ -Knockoutmaus (RC- $G\alpha$ -/-) bestätigten die zentrale Rolle der cAMP-Signalkaskade für die Reninregulation. So war die Reninexpression und Plasmapreninkonzentration drastisch reduziert (Chen et al., 2007; Neubauer et al., 2009).

1.5.3.2 Der cGMP-Signalweg

Ein weiteres Second-Messenger-System, welches Einfluss auf die Regulation der Reninproduktion hat, stellt der cGMP-Signalweg dar. Dem cGMP-Signalweg werden sowohl stimulierende, wie auch hemmende Eigenschaften zugesprochen (Kurtz und Wagner, 1998). Die Signalkaskade beginnt mit der Aktivierung zytosolischer oder membrangebundener Guanylatcyclasen durch NO oder ANP. Diese katalysieren die Bildung von cGMP aus GTP. Das entstandene cGMP kann nun unterschiedliche Signalwege einleiten. Zum einen übt cGMP eine Hemmung auf die Phosphodiesterase-3 (PDE-3) aus, die für den Abbau von cAMP zu AMP zuständig ist. Eine Hemmung des cAMP-Abbaus führt demnach zu einem erhöhten cAMP-Spiegel und damit zu einer gesteigerten Reninsynthese (Beavo, 1995; Beierwaltes, 2006; Friis et al., 2002). Zum anderen übt cGMP über die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII) einen ebenfalls inhibitorischen Effekt auf die Reninproduktion aus. Die cGKII wurde innerhalb der JG-Zellen in Verbindung mit den Reninspeichergranula und der Zellmembran nachgewiesen (Gambaryan et al., 1996). Untersuchungen an cGKII-Knockout-Mäusen und isolierten JG-Zellen mittels membrangängigen cGMP-Analoga bestätigten die inhibitorische Wirkung auf das Reninsystem (Gambaryan et al., 1998; Wagner et al., 1998). Welcher zelluläre Signalweg eingeschlagen wird, könnte von der intrazellulären cGMP-Konzentration abhängig sein. Bei niedrigen cGMP-Spiegeln war zunächst eine Aktivierung des RAAS durch Inhibition von PDE-3 zu beobachten, während hohe cGMP-Spiegel den cGKII-Weg begünstigen und somit zur Stimulation des RAAS führen (Kurtz und Wagner, 1998). Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass der PDE-3- und der cGKII-Signalweg zwei voneinander getrennte, selbstständige Signalwege darstellen (Castrop et al., 2010).

1.5.3.3 Calcium und Proteinkinase C

Einen entscheidenden Einfluss auf die Reninproduktionsrate haben die intra- und extrazelluläre Calciumkonzentration und in diesem Zusammenhang die Proteinkinase C. Die intra- und extrazelluläre Calciumkonzentration sind positiv miteinander korreliert (Castrop et al., 2010). So hat eine Abnahme der Calciumkonzentration in beiden Fällen eine Steigerung der Reninsekretion zur Folge (Antonipillai et al., 1985; Churchill et al., 1985; Fray et al., 1987; Kurz and Penner, 1989). Dahingegen hat eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration einen ausschließlich inhibitorischen Effekt sowohl auf die Reninfreisetzung als auch auf die Reninexpression in den JG-Zellen (Fuchs et al., 2003). Diese Tatsache wird als Calcium-Paradoxon

der Reninfreisetzung bezeichnet, da in den meisten sekretorischen Zellen mit ansteigender Calciumkonzentration auch die Sekretionsrate steigt (Cohen et al., 1997). Eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration führte zunächst zu einer vorübergehenden Hemmung, gefolgt von einer Stimulation der Reninsekretion und einer kontinuierlichen Suppression der Renin mRNA (DellaBruna et al., 1995). Der PKC, deren Funktion calciumabhängig ist, wird ebenfalls ein inhibitorischer Effekt auf das RAAS zugeschrieben. So zeigten isolierte, native JG-Zellen nach Stimulation der PKC eine Abnahme der Reninsekretion (Churchill and Churchill, 1984; Hano et al., 1990; Kurtz et al., 1986; Ritthaler et al., 1996). In den meisten sekretorischen Zellen hat die PKC positiven Einfluss auf die Exozytosevorgänge, die genaue Funktion in den JG-Zellen ist jedoch unklar. Die genaueren Wirkmechanismen, die hinter den calciumassoziierten Effekten stehen, sind weitestgehend noch nicht geklärt. Jedoch konnte ein inverser Zusammenhang zwischen dem zytosolischen Calcium- und dem cAMP-Spiegel nachgewiesen werden. So zeigte sich nach einem Anstieg der Calciumkonzentration, in Versuchen ausgelöst durch Endothelin-1, ANG II oder Thapsigargin, eine Abnahme der cAMP-Konzentration und damit einhergehend eine reduzierte Reninsekretion. Verantwortlich gemacht für dieses Phänomen werden die durch Calcium hemmbaren Adenylatcyclase-Isoformen AC5 und AC6. Die Expression von AC5 und AC6 in den JG-Zellen wurde bereits auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Grünberger et al., 2006; Ortiz-Capisano et al., 2007). Dieser Zusammenhang liefert eine mögliche Erklärung für das Calcium-Paradoxon, jedoch können nicht alle Fragen damit beantwortet werden. Es bedarf weiteren Studien, die die bisherigen Ergebnisse verifizieren und die andere Erklärungsmodellen, wie die Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase oder die Regulation von Ionen-Kanälen miteinbeziehen (Castrop et al., 2010).

1.6 Die juxtaglomeruläre Zelle

Die juxtaglomeruläre Zelle (JG-Zelle) ist Ort der Reninsynthese und -speicherung (Abb. 1.5). Es handelt sich hierbei um modifizierte glatte Muskelzellen, die typischerweise in der Tunica media im terminalen Gefäßabschnitt der afferenten Arteriole zu finden sind. Die JG-Zellen ersetzen an dieser Stelle die Glattmuskelzellen und bilden so einen Teil der Gefäßwand des Vas afferens. Im Gegensatz zu den Glattmuskelzellen exprimieren die JG-Zellen kein Glattmuskelaktin (α -SMA), ein kontraktiles Protein, welches im gesunden Individuum üblicherweise in perivaskulären Zellen kleiner Blutgefäße exprimiert wird (Liu et al. 1998; Yokota et al., 2006; Zhao et al., 2012). Die JG-Zelle ist bepackt mit zahlreichen Sekretgranula, welche den Reninvorrat der Zelle darstellen. Dies verleiht der Zelle ihre kubische, epitheloide Form, durch die sie gut zu unterscheiden ist von den sie umgebenden glatten Muskelzellen. Zusammen mit den in direkter Nähe befindlichen Macula Densa-Zellen, den extraglomerulären Mesangialzellen und den endothelialen Glattmuskelzellen bilden die JG-Zellen den juxtaglomerulären Apparat (Taugner et al., 1984). Ihre charakteristische Lokalisation im Eintrittsbereich in den Glomerulus gilt für das adulte, gesunde Individuum.

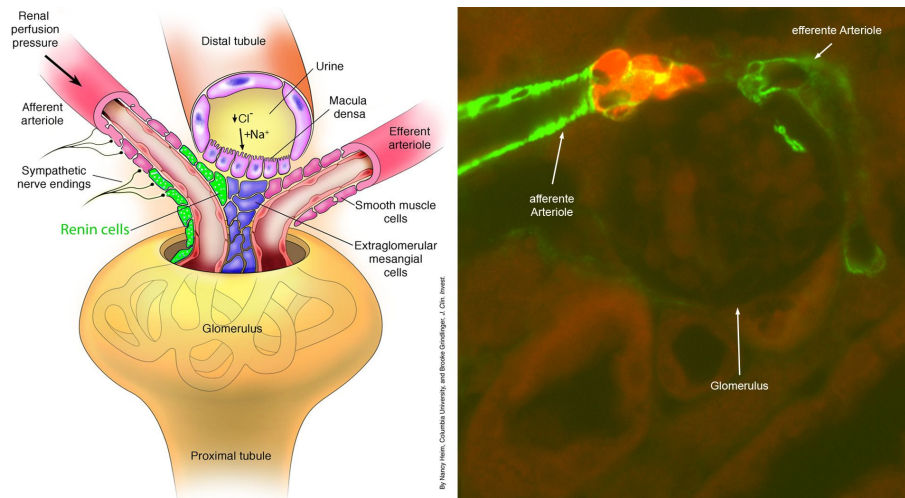


Abbildung 1.5: Links: Schematische Darstellung eines Glomerulus (Abbildung nach Francois und Coffman, 2004). Rechts: Immunhistochemische Aufnahme eines Glomerulus mit afferenter und efferenter Arteriole (grün) und den reninbildenden Zellen (rot).

Im Laufe der Entwicklung befindet sich die JG-Zelle an unterschiedlichen Stellen innerhalb des intrarenalen Gefäßsystems bis sie ihre Endposition erreicht. Die juxtaglomeruläre Zelle in Form einer renintragenden Zelle taucht zum ersten Mal am 15. Embryonaltag auf (Jones et al., 1990; Kon et al., 1998; Sauter et al., 2008). Zunächst sind sie diskontinuierlich in der Wand im distalen Bereich der arcuaten Hauptstämme zu finden. Mit fortschreitender Nierenreifeung weitet sich die Renin-expression sowohl nach proximal wie auch nach distal hin aus (Gomez et al. 1986; Minuth et al., 1981; Sauter et al., 2008). So findet man Reninsignale entlang der arcuaten Haupt- und Seitenäste bis hin zur Arteria renalis, den Interlobulararterien und afferenten Arteriolen, wobei die Gefäßenden in Entwicklung befindlicher Gefäße stets reninfrei sind. Nach der Geburt bildet sich das flächendeckende Reninmuster in den größeren intrarenalen Gefäßen zurück und hinterlässt ein punktförmiges diskontinuierliches Expressionsmuster. Ab dem 10. postpartalen Tag beschränkt sich das Reninvorkommen auf seine juxtaglomeruläre Position im terminalen Gefäßabschnitt der afferenten Arteriole (Sauter et al. 2008). Abseits ihrer juxtaglomerulären Position wurden vereinzelte granulierte Zellen ebenfalls in der Tunica media von efferenten Arteriolen, in der Tunica adventitia von Interlobulararterien und in Mesangialzellen vorgefunden (Kon, 1999).

Retrograde Rekrutierung

Die Anzahl reninhaltiger Zellen ist variabel. Der Aktivitätszustand des RAAS hat direkte Auswirkung auf Up- oder Downregulierung juxtaglomerulärer Zellen entlang des Gefäßastes. So kommt es durch Nidrigsalzdiät oder durch chronische Hypotonie, beispielsweise durch eine Stenose der Arteria renalis oder durch blutdrucksenkende

Medikamente, zur Rekrutierung reninpositiver Zellen entlang der afferenten Arteriole und Interlobulararterien. Hierbei wandeln sich Glattmuskelzellen der Gefäßwand in reninproduzierende Zellen um. Das Rekrutierungsmuster erfolgt diskontinuierlich, nach einem bisher noch nicht geklärten Schema (Casellas et al., 1994; Fuchs et al., 2002; Reddi et al., 1998). Analog hierzu verringert sich die Anzahl granulierter Zellen bei chronischer Suppression des RAAS, beispielsweise durch Bluthochdruck oder Hochsalzdiät oder auch bei pathophysiologischen Ereignissen wie Diabetes. Es erfolgt eine Umwandlung von der reninproduzierenden Zelle hin zur glatten Muskelzelle (Kurtz, 1989; Sequeira Lopez et al., 2001; Taugner und Hackenthal, 1989). Dieses Phänomen erinnert an die Plastizität granulierter Zellen während der embryonalen Nierenentwicklung und zeigt die Fähigkeit der Glattmuskelzellen zu einem früheren Muster der Reninverteilung und Reninexpression zurückzukehren (Gomez et al., 1990).

Durch diese Beobachtungen und die Tatsache, dass JG-Zellen Myofilamente beinhalten, entstand die Hypothese, dass sich die JG-Zellen durch eine reversible metaplastische Transformation aus den glatten Muskelzellen entwickeln (Barajas, 1979; Taugner and Hackenthal, 1989). Weitere Hypothesen über den Ursprung der granulierten Zellen werden derzeit diskutiert. So wird unter anderem angenommen, dass die JG-Zellen aus dem metanephrogenen Blastem abstammen und sich mit dem entwickelnden Gefäßbaum weiterverbreiten. Ein Teil von ihnen soll im Laufe ihrer Entwicklung die Fähigkeit erwerben Glattmuskelaktin zu exprimieren und daher dazu befähigt sein sich durch entsprechende Stimuli rekrutieren zu lassen (Reddi et al., 1998; Sequeira López et al. 2001).

Eine weitere Hypothese besagt: Aufgrund der Tatsache, dass sich reninbildende Zellen während der Entwicklung und auch im adulten Individuum in der Gefäßwand extrarenaler Arterien vorfinden lassen, entwickeln sich JG-Zellen ohne konkreten nierenspezifischen Stimulus in der Media von Gefäßen (Fuchs et al., 2002; Richoux et al., 1987). Sequeira Lopez et al. (2004) beschreiben die JG-Zellen als nicht ausdifferenzierte Vorläuferzelle für zahlreiche nicht reninexprimierende Zelltypen, welche unter bestimmten Bedingungen die Reninsynthese wieder aufnehmen können. So sollen glatte Muskelzellen, glomeruläre und tubuläre Epithelzellen, Mesangialzellen und auch extrarenale Zellen aus der undifferenzierten JG-Zelle hervorgehen und bei Störungen der Homöostase durch bislang ungeklärte Faktoren zur reninsekretierenden Zelle transformieren.

Über den Ursprung der juxtaglomerulären Zelle, den Mechanismus und die Faktoren, die die Wanderung oder Transformation der JG-Zelle bewirken, konnte letztendlich trotz intensiver Studien bislang keine eindeutige und zufriedenstellende Erklärung gefunden werden.

1.7 Gap junctions und Connexine

1.7.1 Gap junctions

Gap junctions zählen zu den sogenannten Kommunikationskontakten. Es handelt sich um fleckförmige Bereiche innerhalb der Zellmembran mit einem Durchmesser von ca. $0,3\ \mu\text{m}$, die die Koordination und Verständigung mehrerer Zellen untereinander ermöglicht. *In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man, dass sich die Plasmamembranen benachbarten Zellen an Gap Junctions sehr nahe kommen (bis auf $3\ \text{nm}$), aber nicht berühren. Der Spalt zwischen den Zellen wird vielmehr durch sehr feine Stränge überbrückt, die aneinander grenzenden Plasmamembranen durchziehen und sich zum Cytoplasma der Nachbarzellen hin öffnen* (Karp, 2005). Die molekulare Baueinheit von Gap junctions besteht aus dem Transmembranprotein Connexin. Hierbei lagern sich jeweils sechs Connexine zusammen und bilden ein Connexon, einen Halbkanal, welcher kreisförmig um eine zentrale Öffnung ausgerichtet ist. Zwei gegenüberliegende Zellen steuern jeweils ein Connexon zur Bildung der Gap junction bei, die sich End-zu-End aneinander legen und in ihrer Mitte einen hydrophilen Kanal mit einem Durchmesser von ungefähr $1,6\ \text{nm}$ besitzen. Über diese Verbindung können Ionen und kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von unter $1\ \text{kDa}$ von einer Zelle in die andere gelangen, wodurch sie elektrisch und metabolisch gekoppelt werden (Hees, 2000). Die Weite des Kanals ist regulierbar, so kann eine Gap junction auch eine geschlossene Konfiguration einnehmen, sodass kein Austausch mehr über sie stattfindet.

Bisher sind 20 Connexine-Gene in der Maus sowie 21 Connexingene im Menschen beschrieben. Die unterschiedlichen Connexine werden anhand ihres Molekulargewichts bezeichnet, z.B. Cx40 für ein Connexin mit der Masse $40\ \text{kD}$. Es gibt Connexingene, die ausschließlich bei der Maus existieren. Diese werden mit dem Kleinbuchstaben m für Maus beschrieben z.B. mCx33. Analoges gilt für spezifische Connexingene, die nur beim Menschen vorhanden sind. Sie werden durch den Kleinbuchstaben h für Human gekennzeichnet, z.B. hCx25 (Söhl und Willecke, 2004).

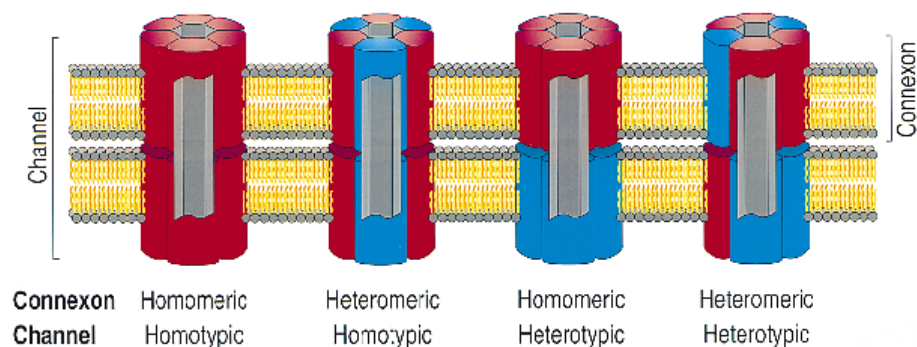


Abbildung 1.6: Mögliche Anordnungen von Connexin-Kanälen (Kumar und Gilula, 1996)

Ein Connexon kann aus unterschiedlichen Connexin-Isoformen zusammengesetzt

sein (heteromer) oder lediglich aus einer Connexin-Isoform bestehen (homomer) (Abb. 1.6). Ebenso kann eine Gap junction heteromer aus zwei gleichen Connexonen oder homomer aus zwei identischen Connexonen aufgebaut sein. Aus dieser Tatsache ergibt sich eine große Vielfalt an verschiedenartig zusammengesetzten Gap junctions, was deren unterschiedlichen Eigenschaften in Bezug auf Permeabilität, Selektivität und Leitfähigkeit erklärt (Hanner et al., 2010).

1.7.2 Connexine in der Niere

Mittels Gefrierbruchabdruck und Transmissionselektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass im Bereich des juxtaglomerulären Apparates zahlreiche Gap junctions zwischen den Zellen des extraglomerulären Mesangiums, den glatten Muskelzellen von Vas afferens sowie Vas efferens und den juxtaglomerulären Zellen ausgebildet sind. Zu den Zellen der Macula Densa konnten keine Gap junctions nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass der juxtaglomeruläre Apparat, mit Ausnahme der Macula Densa-Zellen, ein funktionelles Syncytium bildet (Taugner et al., 1978). Für dessen Funktion und Anatomie scheinen die Gap junctions und deren Connexine eine entscheidende Rolle zu spielen.

In den reninproduzierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates im adulten Organismus werden vornehmlich die Connexine Cx37, Cx40 und Cx43 exprimiert, wobei die Cx40 Expression dominiert. Während der Nierenentwicklung wurde parallel mit dem Erscheinen der reninproduzierenden Zellen Cx40 und in geringerem Ausmaß Cx45 nachgewiesen (Kurtz et al., 2009). In reninproduzierenden Zellen außerhalb des juxtaglomerulären Apparates, wie wir sie in der Fetalphase oder im Rahmen der retrograden Rekrutierung in der Gefäßwand größerer renaler Arterien finden, kann hingegen weitestgehend nur Cx40 nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Cx40 ein fundamentales Merkmal reninproduzierender Zellen ist (Castrop et al., 2010; Kurtz et al., 2009).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die sich mit den unterschiedlichen Connexinen in der Niere und deren Bedeutung für das Reninverteilungsmuster und den Auswirkungen auf das RAAS beschäftigen. So kam eine Studie von Wagner et al. (2009), in der homozygote Cx37-defiziente Mäuse untersucht wurden, zu der Erkenntnis, dass Cx37 für die Funktionalität des RAAS und der Lokalisation reninproduzierender Zellen in der Niere entbehrlich ist. Anders verhält es sich bei Cx40-defizienten Mäusen. Anhand homozygoter Cx40-Knockout-Mäusen wurde aufgezeigt, dass das Ausschalten des Cx40-Proteins zu Fehlpositionierung juxtaglomerulärer Zellen und zu Störungen innerhalb des RAAS führt. Während die Lokalisation der reninproduzierenden Zellen in der fetalen Niere unauffällig ist, befinden sich die JG-Zellen im adulten Organismus nicht mehr wie üblich in der Tunica media der Blutgefäße, sondern sind im juxta- und periglomerulären Interstitium. Des Weiteren erfolgte trotz intensiver Stimulation des RAAS keine retrograde Rekrutierung reninbildender Zellen (Kurtz et al., 2007).

Auch das Fehlen von Cx43 hat Auswirkungen auf das RAAS. So zeigten homozygote Knockin-Mäuse, in denen die kodierende Region von Cx43 durch Cx32 ersetzt

wurde (Cx43KI32), eine deutliche Reduktion der Reninexpression und -sekretion. Zudem hatte eine Stimulation durch Hochsalzdiät und induzierter Hypertonie mit Hilfe des 1Clip-2Kidney-Modells keinen Effekt auf die Reninsekretion dieser Mäuse (Haefliger et al., 2006).

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Die anatomisch-physiologischen Veränderungen bewirkt durch das Ausschalten von Connexin 40, bzw. des Angiotensin II-AT_{1a}-Rezeptors in Knockout-Mäusen wurden bisher nur getrennt voneinander untersucht. Welche Auswirkungen ein kombinierter Ausfall beider wesentlicher Elemente des RAAS auf die Reninexpression hat, ist Schwerpunkt dieser Arbeit. So sollen die Erkenntnisse vorheriger Arbeiten reproduziert und um die neuen Ergebnisse und Erfahrungen ergänzt werden.

Hierzu erfolgte die histologische Aufarbeitung von Serienschnitten von Wildtyp-, AT_{1a}-KO-, Cx40-KO und AT_{1a}-Cx40-DOKO-Mäusen. Um eine Stimulation, bzw. Suppression des RAAS zu erreichen, wurde ein Teil der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Mäuse für 10 Tage auf Niedrigsalzdiät (LS), bzw. Hochsalzdiät (HS) gesetzt. Der Gesichtspunkt Ernährung ist nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Serienschnitte wurden immunhistochemisch gegen Renin und zusätzlich als Strukturprotein gegen Glattmuskelaktin (α -SMA = α -smooth-muscle-aktin) fluoreszenzgefärbt. Die einzelnen histologischen Schnitte wurden für die zweidimensionale Betrachtung ausgewertet, während die 3D-Rekonstruktionen ein räumliches Bild der Reninexpression in einem ausgewählten Bereich eines Gefäßabschnitts vermitteln soll. Des Weiteren sind quantitative Aussagen über den Reningehalt anhand der ermittelten mRNA-Level möglich.

In vorangegangenen Untersuchungen wurden bereits die Funktionen des Angiotensin II-AT_{1a}-Rezeptors und die Auswirkungen auf das RAAS bei dessen Fehlen analysiert. So zeigten homozygote AT_{1a}Knockout-Tiere (AT_{1a}KO) gravierende anatomische und physiologische Veränderungen. Es kam zu Abnormitäten in der renalen Gefäßstruktur. Auffallend waren die afferenten Arteriolen, deren Anzahl reduziert und deren Gestalt dicker und kürzer als üblich war. Des Weiteren wurde eine Nierenmarksatrophie, eine Abnahme an Anzahl und Größe der Glomeruli und eine tubuläre Dilatation vermerkt (Oliverio et al., 1998; Sugaya et al., 1995; Tufro-McReddie et al., 1995). Es kam zu einer Hypertrophie des JGA und zu einer ausgeprägten proximalen Expansion der reninproduzierenden Zellen entlang der afferenten Arteriolen (Oliverio et al., 1998). Dies spiegelte sich durch eine Erhöhung der Plasmareninaktivität und des Renin mRNA-Gehalts wider. Darüber hinaus weisen AT_{1a}KO-Tiere einen um 10–22 mmHg erniedrigten systolischen Blutdruck auf (Ito et al., 1995). Ebenso existieren bereits Untersuchungen, die sich mit den Auswirkungen des Funktionsverlusts von Connexin 40 auf das RAAS befassen. Wie bereits erörtert, ist Cx40 ein elementares Merkmal reninproduzierender Zellen. Untersuchungen an Cx40-Knockout-Mäusen zeigten die ektopische Lokalisation der JG-Zellen im juxta- und periglomerulären Interstitium. Eine weitere Erkenntnis war das Ausbleiben der Rekrutierung reninproduzierender Zellen entlang der präglomerulären Gefäße trotz

intensiver Stimulation des RAAS (Kurtz et al., 2007). Außerdem weisen Cx40-defiziente Mäuse eine erhöhte Plasmanreninkonzentration trotz erhöhtem Blutdruck auf und stellen somit eine denkbare Variante eines genetischen Modells des reninabhängigen Bluthochdrucks dar (Krattinger et al., 2007; Wagner et al., 2007). Cx40 scheint somit für die korrekte Architektur des JGA und die interzelluläre Kommunikation im Rahmen von Feedback-Mechanismen innerhalb des RAAS unabdingbar zu sein.

Ziel dieser Arbeit ist es eine plastische Vorstellung von den Auswirkungen der kombinierten Deletion dieser beider wesentlichen Faktoren des RAAS zu erlangen. Somit gilt es die resultierende Reninexpression, deren Abundanz und die Lokalisation der Reninzellen zu erfassen.

Es stellt sich die Frage, wo die reninbildenden Zellen beim AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus lokalisiert sind. Denkbar wären a.) die Reninzellen sitzen innerhalb der inneren Gefäßwand der afferenten Arteriolen, b.) die Reninzellen befinden sich ektopisch außerhalb der inneren Gefäßwand der afferenten Arteriolen oder auch c.) eine Kombination aus a.) und b.). In diesem Zusammenhang gilt es zu klären, ob das Fehlen von Cx40 generell eine Lokalisation von Reninzellen in der inneren Mediaschicht verhindert. Ein weiterer Punkt, den es zu erörtern gilt, ist die Frage ob Cx40 für die geordnete Reinduktion der Reninexpression notwendig ist. Eine retrograde Rekrutierung fand bei der Cx40-KO-Maus nicht statt, hingegen reagiert die AT_{1a} KO mit einer massiven Zunahme an reninproduzierenden Zellen auf entsprechende Stimulation. Ob es im Rahmen der Cx40-Deletion zum Unterbinden der zellulären Kommunikation und trotz der gegensätzlichen Wirkung des AT_{1a} -Knockouts somit zum Ausbleiben der Rekrutierung kommt, ist eine Frage, die hierbei geklärt werden soll.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets	
TRITC-Filter: Anregung 533-558nm Emission 570-640nm	Filter set 43, Zeiss, Jena
Cy2-Filter: Anregung 450-490nm Emission 500-550nm	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences Industrial Division, Mississauga, Canada
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke und Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg

Geräte	Hersteller
Kühl- und Gefrierschränke	Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore, Schwalbach
PCR-Geräte	Thermocycler, OmniGene, MWG, Ebersberg Primus 96, Peqlab, Erlangen Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Scantisch	motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller) Ludl Electronic Products, München
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen Multidrive XL, Pharmacia, Ratingen
UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
UV-Spektrometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen
Waagen	Feinwaage W13, Mettler, Gießen

Geräte	Hersteller
Wärmeblöcke	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/1
Wasserbäder	Modell W13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Labofuge 400, Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Hochsalzfutter 4% NaCl	Ssniff, Soest
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Niedrigsalzfutter 0,02% NaCl	Ssniff, Soest
Normalsalzfutter 0,4% NaCl	Ssniff, Soest
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA

Produkt	Hersteller
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

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

Produkt	Hersteller
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	Merck, Darmstadt
KH_2HPO_4	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/ μ l	Invitrogen, Karlsruhe
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nuclease freies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0,5 μ g/ μ l	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Roti [®] -Safe GelStain	Roth, Karlsruhe
SYBR [®] Green PCR Kit	Roche, Mannheim
TRIzol [®] -Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4 Primer

Die Primer für die quantitative PCR und Genotypisierung wurden von der Firma Biomern.net in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und gefriergetrocknet geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100 pmol/ μ l erreicht.

2.1.5 Antikörper

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

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

2.1.6 Puffer und Lösungen

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

2.1.6.1 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	
KH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
NaCl	140 mM

PBS-Otto-Puffer, pH 7,4	
KH ₂ PO ₄	10 mM

Waschpuffer	
PBS-Otto-Puffer	
BSA	1%

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

2.1.6.2 Molekularbiologie

Agarosegel	
TAE	
Agarose	1,5%

NaOH für gDNA-Extraktion	
NaOH	25 mM

Tris HCl für gDNA-Extraktion	
Tris HCl	1 M, pH 8

10x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer	
Tris Base	0,4 M
Essigsäure	0,2 M
EDTA	10 mM

DEPC-H2O	
DEPC in H2O	1/1000 V
schütteln, üN geöffnet unter Abzug stehen lassen	dann autoklavieren

2.1.7 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit *LaTeX 2_E* erstellt. Zur Literaturrecherche diente *PubMed* von NCBI - The National Center for Biotechnology Information:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Die Mikroskopie erfolgte mit *AxioVision 4.7* von Zeiss. Die Serienbilder wurden mit *Adobe Photoshop CS4* und *ImageJ* (Wayne Rasband, NIH, USA) bearbeitet. Die 3D-Rekonstruktion wurde mit *Amira 5.4.1* visualization software (Mercury Computer Systems, Inc., USA) realisiert. Die Graphen wurden mit *GraphPad Prism 5* erstellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die durchgeführte Untersuchung der physiologisch-anatomischen Grundlagen der Mäusenieren wurden unbehandelte und behandelte adulte Mäuse verschiedener Tierstämme verwendet.

Alle Versuchstiere wurden dem “ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ entsprechend behandelt. Zudem wurde stets auf für Mäuse optimale Haltungsparemeter geachtet (Temperatur $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$, Hell-Dunkelintervall 12h, freier Zugang zu Futter und Wasser).

Folgende Tierstämme fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Tierstamm	genetischer Hintergrund	Herkunft
Cx40-KO	C57Bl6	Prof. Willecke, Bonn (Kirchhoff et al. 1998)
AT _{1a} -KO	129Sv	Prof. Coffman, USA (Ito et al. 1995)
Cx40-AT _{1a} -DOKO	C57Bl6-129Sv-Mix	Eigenzucht

2.2.1.1 Nidrigsalz- und Hochsalzbehandlung

Zur Stimulation, bzw. zur Suppression des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wurde ein Teil der Versuchstiere 10 Tage bis zum Versuchsende mit Nidrigsalzfutter

0,02% NaCl [LS], bzw. mit Hochsalzfutter 4% NaCl [HS] ernährt.

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Fixierung des Nierengewebes

Die Fixierung des Nierengewebes ist nötig um eine möglichst realitätsnahe Vorstellung der vitalen Niere zu erhalten. Sie dient der Bewahrung der Zellmorphologie durch Unterbinden des Zersetzungsprozesses und somit dem Erhalt der Gewebestruktur. Außerdem bewirkt die Fixierung eine Härtung des Gewebes, was eine verbesserte Schneidbarkeit des Organs bedeutet und somit von Vorteil beim Anfertigen von Serienschnitten ist.

2.2.2.2 Retrograde arterielle Perfusion

Die Mäuse wurden mittels Ketamin und Xylazin (80 mg/kg KG i.p.) in Narkose versetzt. Das Abdomen wurde eröffnet und die Aorta abdominalis dargestellt. Kurz unterhalb des Abgangs der Arteriae renales wurde die Bauchaorta mittels einer Klemme abgebunden, somit war die Blutversorgung der Nieren weiterhin gewährleistet. Kurz unterhalb der Klemme wurde der Perfusionskatheter eingeführt und fixiert. Durch einen Schnitt in die untere Vena cava wurde ein Ablass für die Perfusionslösung hergestellt. Die obere Klemme wurde abgenommen und über den Perfusionskatheter 10 ml isotone NaCl-Lösung und 10 I.E./ml Heparin retrograd perfundiert. Die erfolgreiche Perfusion erkannte man durch die zügige Entfärbung der Abdominalorgane. War dies der Fall, erfolgte anschließend die Fixierung mittels frisch angesetztem 3% Paraformaldehyd in PBS, welches mit einem konstanten Fluss von 40 ml/3 min infundiert wurde. Anschließend wurde das Organ entnommen und in 70% Methanol bei 4 °C bis zur darauffolgenden Paraffineinbettung aufbewahrt.

2.2.2.3 Einbettung in Paraffin

Nach vorangegangener Fixierung erfolgte zur Vorbereitung auf die Paraffineinbettung eine schrittweise Dehydrierung des Nierengewebes in Gewebe-Einbettkassetten durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration:

- 2 x 30 min 70% Methanol (bei RT)
- 2 x 30 min 80% Methanol (bei RT)
- 2 x 30 min 90% Methanol (bei RT)
- 2 x 30 min 100% Methanol (bei RT)
- 2 x 30 min 100% Isopropanol (bei RT)
- 1 x 30 min 100% Isopropanol (bei 45°C)
- Isopropanol/Paraffin (1:1)-Gemisch (bei 55°C)

Im Anschluss wurde das Gewebe zwei Mal 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 Silikon-Kautschuk-Einbettformen, die mit 60 °C warmem Paraffin gefüllt waren und die Aushärtung bei RT über Nacht.

2.2.2.4 Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung

Die angefertigten Paraffinblöcke wurden mittels eines erhitzten Spatels zurechtgeformt und auf einen Holzblock angebracht. Von diesem wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms 5 µm dicke Serienschnitte (ca. 70-75 Schnitte pro Präparat) angefertigt. Die einzelnen Schnitte wurden in ein 40°C warmes Wasserbad überführt um sich dort zu entfalten und zu strecken. Anschließend wurden die Schnitte auf superfrost plus Objektträger aufgezogen und über Nacht in einem Wärmeschrank bei 40°C zum Trocknen belassen.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte durch eine umgekehrte Alkoholreihe entparaffiniert nach folgendem Schema:

- 2 x 10 min 100% Xylol (bei RT)
- 2 x 5 min 100% Isopropanol (bei RT)
- 1 x 5 min 96% Isopropanol (bei RT)
- 1 x 5 min 80% Isopropanol (bei RT)
- 1 x 5 min 70% Isopropanol (bei RT)

2.2.2.5 Immunhistochemische Färbung

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis und die Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind (Romeis, 1989). Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zuerst der primäre, unkonjugierte Antikörper an das Antigen der Zellen im Gewebeschnitt. Anschließend werden die Schnitte mit einem zweiten, fluoreszierenden Antikörper, der gegen den Fc-Teil des ersten unmarkierten Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Durch Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge können die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht und detektiert werden.

Protokoll:**Tag 1**

- Waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer auf dem Schüttler: 3 x 5 min
- Herstellen der Stammlösung PBS-Otto/1% BSA, BSA in PBS-Otto auflösen und filtrieren
- Herstellung der Blockierlösung: 10% HS in PBS-Otto/1% BSA
- Puffer absaugen, Objektträger auf Feuchtkammer legen und Präparate mit Liquid-Blocker-Markierstift umranden

Blockieren

- Blockierlösung zur Blockierung unspezifischer Bindungen auftragen und 20 min bei RT auf dem Schüttler inkubieren
- Anschließend Blockierlösung absaugen

Primärer Antikörper

- Primären Antikörper aufbringen in Verdünnung mit 10% HS in PBS-Otto/1% BSA:
Chicken-Anti-Renin-IgG, Verdünnung 1:400
Mouse-Anti-Glattmuskelaktin-IgG, Verdünnung 1:50
- Aufpipettieren der Primärantikörper und Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei 4°C

Tag 2

- Absaugen des primären Antikörpers
- Waschen der Präparate in PBS-Otto/1% BSA auf dem Schüttler: 3 x 5 min
- Absaugen der Stammlösung

Sekundärer Antikörper

Aufgrund der Fluoreszenzeigenschaft der sekundären Antikörper und der hiermit verbundenen Lichtempfindlichkeit erfolgen sämtliche weitere Arbeitsschritte soweit möglich unter Lichtausschluss.

- Verdünnung mit PBS-Otto/1% BSA:
Cy2-konjugierter Donkey-Anti-Chicken-IgY, Verdünnung 1:400
Rhodamin-TRITC-konjugierter Donkey-Anti-Mouse-IgG, Verdünnung 1:400

- Vortexen und 10 min abzentrifugieren um das Aufbringen von Kristallen zu vermeiden
- Aufpipettieren der Sekundärantikörper und Inkubation bei RT für 90 min
- Waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer auf dem Schüttler: 3 x 10 min
- Objektträger mit Dako Glycergel Mounting Medium eindeckeln und ab sofort unter Lichtausschluss in einer Mappe unter Kühlung aufbewahren.

2.2.3 Dreidimensionale Rekonstruktion

2.2.3.1 Mikroskopie und Digitalisierung

Zur 3D-Rekonstruktion dienten die angefertigten Paraffinserienschnitte, die gegen Renin und Glattmuskelaktin doppelimmunfluoreszent gefärbt wurden.

Zur Aufnahme und Digitalisierung wurde das Axiovert 200M Mikroskop mit motorisierter Objektauflage und angeschlossener Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) sowie die Software *AxioVision LE Rel.4.5.* von Zeiss verwendet.

Die Fluorophore der Sekundärantikörper für Renin und Glattmuskelaktin besitzen eine eigene spezifische Anregungswellenlänge. Durch das Wechseln der Fluoreszenzfilter kann somit selektiv die gewünschte Komponente dargestellt werden. Der Filter für Cy2 mit einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm regt die Fluorophore der Glattmuskelzellen an, die bei einer Emission von 500-550 nm in grün sichtbar werden. Der Rhodamin-(TRITC)-Filter hingegen emittiert 533-558 nm und regt damit das Fluoreszenzsignal der markierten Reninmoleküle an, welche mit einer Emission von 570-640 nm in rot erscheinen.

Die Aufnahme der Einzelbilder einer Serie erfolgte hierbei mit 100facher Vergrößerung.

2.2.3.2 AxioVision LE Rel.4.5

Bevor mit den Aufnahmen begonnen werden konnte, mussten die Kanäle für Renin (grün), bzw. Glattmuskelaktin (rot) zunächst eingerichtet und die optimale Belichtung für den jeweiligen Kanal eingestellt werden. Anschließend wurde für jeden Objektträger ein Übersichtsbild erstellt und die Bereiche der Einzelaufnahmen markiert. Da der Nierenausschnitt unter einer Vergrößerung von 100 nicht mehr im Ganzen aufgenommen werden konnte, wurden die Ausschnitte quadrantenweise mit einer 15%igen Überlappung aufgenommen. Im Anschluss wurden Überlappungsunregelmäßigkeiten und -verschiebungen durch die Funktion Stitching im Bezug auf den Referenzkanal Aktin ausgeglichen. Zur Konvertierung der Kachelbilder wurde ein Helligkeitsausgleich durchgeführt, das erstellte Overlay-Bild benannt und im Rot-Grün-Blau (RGB)-Farbraum als *.zvi abgespeichert.

Für die weiteren Schritte war eine Konvertierung auf 8 Bit nötig. Um hierbei nicht an Bildqualität einzubüßen, wurde das Grafikformat TIFF benutzt:

- Beliebiges Bild öffnen
- Datei → exportieren → *.tif
- Stapelverarbeitung Start

2.2.3.3 Datenaufbereitung mittels ImageJ

Bildstapelgenerierung

Da durch das individuelle Stitching die Bilder nicht die gleiche Abmessung in Länge und Breite aufwiesen, mussten sie auf eine einheitliche Größe überführt werden. Dies ist eine Voraussetzung um die Daten in die Rekonstruktionssoftware *Amira* importieren zu können. Um dies zu erreichen, erstellte man zunächst ein leeres Bild mit *Photo Shop CS4*, welches in Länge und Breite das größte Format aufwies und speicherte es als TIFF zu den Serienbildern. Sämtliche Bilder wurden im folgenden Schritt auf diese Größe angeglichen. Durch das Bildanalyseprogramm *ImageJ* wurde wie folgt ein Bildstapel (Stack) erstellt:

- Öffnen aller Einzelbilder
- Plugins
- Stacks
- Stack Builder

Im Anschluss wurde das zuvor hinzugefügte leere Bild wieder entfernt und der erhaltene Stapel als Image Sequence abgespeichert.

2.2.3.4 3D-Rekonstruktion mit Amira

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Daten in die *Amira 5.4.1* Visualization Software auf einer Grafik-Workstation importiert. Um eine korrekte Skalierung der Daten zu gewährleisten, musste zunächst die Pixelgröße in μm berücksichtigt werden. Dies ist ein Objektiv- und Kamera-abhängiger Wert (bei einer Verwendung des 10x Objektives: 1Pixel=1x1 μm). Bezogen auf die maximalen Abmessungen des Bildstapels (Länge x und Breite y), die Gesamtzahl der Schnitte und die jeweilige Schnittdicke von 5 μm (z) wurde die BOUNDINGBOX definiert, welche die maximalen Abmessungen des Datensatzes in jeder Ebene beschreibt. Da fortan mit dreidimensionalen Daten gearbeitet wurde, wurde der Begriff Pixel durch den Begriff Voxel abgelöst, der der Geometrie des Raumes entsprechend eine quaderförmige Zelle darstellt. Ein Voxel hatte somit in dieser Arbeit 1x1x5 μm .

Farbkanaltrennung

Im nächsten Schritt wurde der RGB-Datensatz wieder in seine einzelnen monochromen Kanäle aufgetrennt (Abb. 2.1). Dies ist nötig um die Fluoreszenzmarkierungen

separat für Renin, bzw. Aktin anhand der Grauwerte der Pixel von jedem aufgenommenen Bild zu erkennen und für die Durchführung einer getrennten Datensegmentierung:

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

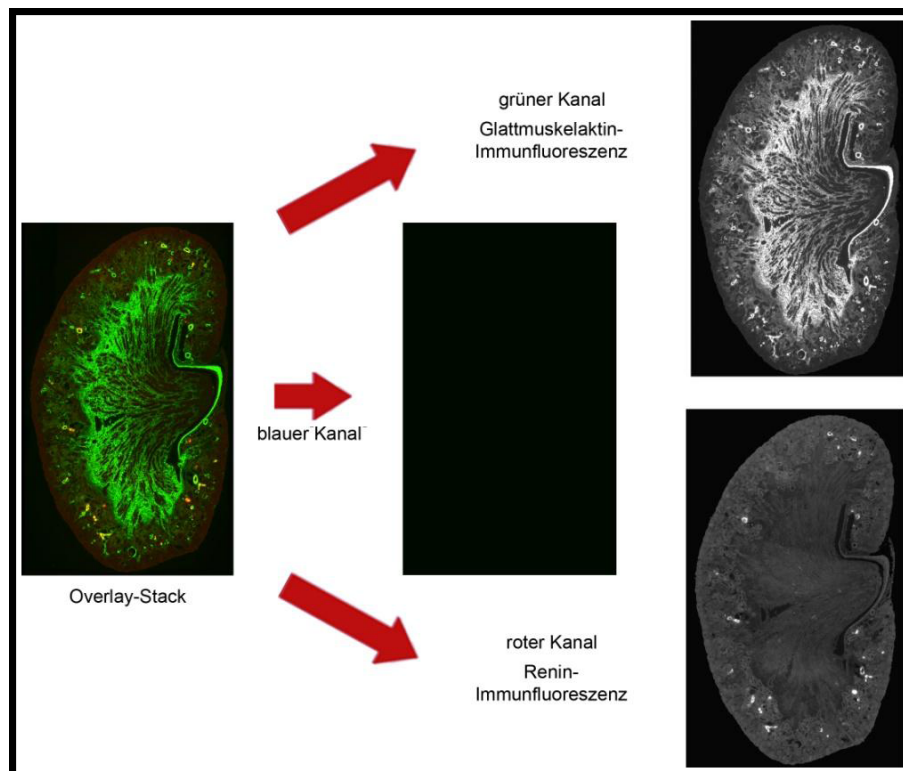


Abbildung 2.1: Farbkanaaltrennung zur Generierung eines Aktin- und eines Renin-Stapels (Abbildung modifiziert nach Machura, 2008)

Alignierung

Da die histologischen Serienschritte ungleich auf den Objektträgern angeordnet waren, mussten der Aktin- und Renin-Stapel aligniert werden, sprich zur Deckung gebracht werden. Dies erreichte man über Rotations- und Verschiebungsbewegungen, so wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende Schnitte des Bildstapels so exakt wie möglich aufeinander projiziert. Angewandt auf alle Schnitte entsteht hierdurch eine vollständig ausgerichtete Niere. Da aufgrund zahlreicher und zusammenhängender Immunreaktionen des Aktins ein besseres Alignierungs-Ergebnis möglich ist, orientierte man sich am Aktin-Bildstapel. Die Renin-Daten konnten dann unter Verwendung des Aktin-Stapels als Referenz auf dieselben Positionen gedreht werden,

um Deckungsgleichheit zu erreichen und das spätere Zusammenfügen der Dateien zu ermöglichen.

- COMPUTE
- ALIGN SLICES
- EDIT
- Automatische Alignierung und manuelle Feinabstimmung
- RESAMPLE

Datensegmentierung

Bei der Datensegmentierung, dem sogenannten Labeln, handelt es sich um den zeit- und arbeitsintensivsten Teil der Rekonstruktion. Hierbei werden Strukturen von Interesse durch verschiedene Verfahren markiert und einem definierten Material zugeordnet. Später kann aus der Gesamtheit der markierten Strukturen die Oberfläche für dieses Objekt berechnet werden.

Mit folgenden Programmfunktionen wird die Datensegmentierung eingeleitet:

- LABELLING
- LABEL FIELD

Für das Labeln der Immunreaktionen stehen verschiedene Segmentierungstools (Hilfswerkzeuge) zur Verfügung. Eine Übersicht der wichtigsten Tools:

- BRUSH: Fluoreszenzsignale können im Freihandmodus umfahren werden.
- MAGIC WAND: Hierbei nutzt man die unterschiedliche Verteilung der Grauwerte (0=schwarz bis 255=weiß). So können Immunfluoreszenzsignale durch Festlegen einer Grauwert-Schwelle markiert werden.
- FILL HOLES: Füllt Löcher in Materialien auf.
- REMOVE ISLANDS: Kleine Material-Inseln (Artefakte) werden automatisch entfernt.
- SMOOTH LABELS: Zur Glättung der Ränder der Materialien.
- THRESHOLD: Ermöglicht ähnlich der MAGIC WAND eine Selektion aller Voxel in einem definierten Grauwertbereich. Hierbei wirkt THRESHOLD auf den ganzen Schnitt, während MAGIC WAND nur den mit dem ausgewählten Voxel verbundenen Bereich markiert.
- INTERPOLATE: Eine fehlende Struktur lässt sich durch Markierung auf dem Schnitt vor und nach dem Fehler durch eine Interpolation berechnen und ergänzen.

- WRAP: Durch Markierung von Anfang, Mitte und Ende einer Zielstruktur konnten die Zwischenschnitte zu einer annähernd kugeligen Gestalt ergänzt werden.

Dabei konnten sämtliche Segmentierungsfunktionen sowohl auf alle Bilder (all slices) als auch nur auf das aktuelle Bild (current slice) angewandt werden. Ziel der Segmentierung war es aus den markierten Strukturen eine Oberfläche zu generieren. Anhand der Fluoreszenzsignale der Aktin-Daten konnten hiermit die Gefäße dargestellt werden. Aus den Renin-Daten wurden die reninpositiven Zellen, deren Anzahl und Lokalisation, ermittelt. Die Strukturen der Kapsel und der Glomeruli konnten aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz erkannt und markiert werden.

Oberflächengenerierung

Anhand der erstellten Label-Dateien konnte für jedes Material eine separate Oberfläche berechnet und im 3D-Modell räumlich dargestellt werden:

- SURFACE GEN
- Anhängen von SURFACEVIEW zur Darstellung der Oberfläche

Die 3D-Modelle konnten im Anschluss unter PROPERTIES bearbeitet und optimiert werden:

- SURFACE-EDITOR: Entfernen überflüssiger Ausschnitte.
- SIMPLIFIER: Reduktion der Polygonzahl und somit der Datenmenge.
- PARAMETER-EDITOR: Änderung von Farbeinstellung oder Skalierung.
- COMPUTE → SMOOTH SURFACE: Glättung der Oberfläche.

Es bestand nun die Möglichkeit die unterschiedlichen erzeugten Objekte einzeln oder gemeinsam zu betrachten und zu bearbeiten. Die Objekte konnten rotiert und räumlich analysiert werden. Die Darstellungsform konnte unter SURFACE VIEW separat geändert werden um somit beispielsweise ein Objekt transparent erscheinen zu lassen. Zudem war es möglich Strecken und Winkel zu messen und die Volumina und Flächen der einzelnen Modelle zu errechnen.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolierung von Total-RNA aus Nieren

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem TRIzol-Reagenz nach dem dazugehörigen Protokoll des Herstellers. Die Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Das TRIzol-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat. Durch das Chloroform wird das Homogenisat in drei Phasen getrennt. Mittels Isopropanol wird die RNA aus der

wässrigen Phase gefällt. Bei sämtlichen Vorgängen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen durch RNasen Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmaltartikel und Geräte verwendet. Benötigte Puffer und Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Alle Vorgänge wurden auf Eis durchgeführt.

Kurzprotokoll zur RNA-Isolation mit TRIzol-Reagenz:

- 1 ml TRIzol-Reagenz für $\frac{1}{2}$ adulte Mausniere in Sastedt-Tubes auf Eis vorlegen
- Überführen der Nieren aus dem flüssigem Stickstoff in das Röhrchen und ca. 30 s homogenisieren
- Mix in 2 ml Eppis umfüllen und 5 min bei RT stehen lassen (zur Denaturierung der Proteine, diese lösen sich in Phenol)
- 200 μ l Chloroform (entspricht $\frac{1}{5}$ des Vol. einer halben adulte Niere) zugeben, schütteln (nicht vortexen)
- 20 min bei 4°C bei 12000 rpm zentrifugieren → Auftrennung des Homogenisats in drei Phasen
- ca. 500 μ l wässrigen Überstand in 1,5 ml Eppi überführen, ohne Interphase (unten rote Phenolphase, dazwischen Interphase mit hydrophilen Proteinen)
- wässrige Phase 1:1 (500 μ l) mit Isopropanol mischen und kräftig schütteln
- 10 min bei RT Ausfällen der RNA
- 10 min bei 4°C bei 12000 rpm zentrifugieren, den Überstand verwerfen
- Pellet in 1ml 75% Ethanol aufnehmen
- 5 min bei 4°C bei 7500 rpm zentrifugieren, den Überstand verwerfen
- Pellet 10 min bei RT trocknen und je nach Größe in 50-300 μ l RNase-freiem Wasser lösen
- Resuspendieren im Schüttler bei 65°C max. 2 min
- Lagerung bei -80°C

Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm bestimmt. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260nm und 280nm wurde die Qualität der isolierten RNA bestimmt.

2.2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Mittels reverser Transkription (RT) wurde die isolierte RNA in copy DNA (cDNA) übersetzt. Durch die Übersetzung in cDNA sind die auf der RNA enthaltenen Informationen stabiler konserviert. Die cDNA dient als Template für die spätere Analyse durch die quantitative PCR. Als Primer wurden Oligo(dT)₁₅-Ketten verwendet, um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren.

10 µl Ansatz	
1 µg	Gesamt-RNA
1 µl	Oligo(dT) ₁₅ Primer (0,5 µg/µl)
add	DEPC-H ₂ O

Das Reaktionsgemisch (10 µl) wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und danach auf Eis gestellt.

Im Anschluss wurde folgender Mix zugegeben:

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

Die cDNA-Synthese erfolgte nun über 1h bei 37°C. Um zu Schluss die Inaktivierung das Enzym zu erreichen wurde der Reaktionsansatz 2 min auf 94°C erhitzt. Für die quantitative PCR wurde die erhaltene cDNA mit 20µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde mit dem Lightcycler 480 SYBR Green Master PCR Kit von Roche an einem Roche Lightcycler 480 durchgeführt. Bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch ermittelt. Dies ermöglicht den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green. Dieser weist eine hohe Affinität zur doppelsträngigen DNA im Bereich der kleinen Furche auf. Dort bindet er und leuchtet 1000-fach stärker als ungebundenes SYBR Green. Die Intensität der Fluoreszenzsignale ist hierbei proportional

zur entstehenden DNA-Menge.

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

Amplifizierungsprotokoll

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

Primer

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

Am Ende jedes Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Zu diesem Zweck wurde die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt. Währenddessen wurde die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Housekeeper diente GAPDH. Der Renin-mRNA-Gehalt der Niere konnte durch die Gesamtausbeute an extrahierter RNA und durch das Renin-mRNA-Level berechnet werden.

2.2.4.4 Genotypisierung

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

Protokoll zur gDNA-Extraktion

- Abschneiden von 2 mm Mausschwanz und in ein 0,5 ml PCR-Cup überführen, 100 μ l 25 mM NaOH hinzufügen
- Inkubation bei 96°C für 1h im Thermocycler
- Gut vortexen um den Schwanz aufzulösen und Zugabe von 10 μ l Tris HCl, pH8
- 6 min zentrifugieren bei 10000 rpm
- Einsetzen von 2 μ l des Überstandes (gDNA) in die Genotypisierungs-PCR

In dieser Arbeit lag der Fokus auf dem Nachweis der Banden für Connexin 40 und dem AT_{1a}-Rezeptor. Zu diesem Zweck erfolgte die Genotypisierung nach folgendem Reaktionsansatz und Amplifizierungsprotokoll für Connexin 40, bzw. AT_{1a}.

Genotypisierung Connexin 40

PCR-Reaktionsansatz Cx40

20 μ l Ansatz	
Cx40 WT s	1 μ l
Cx40 WT as	1 μ l
Cx40 494 s	1 μ l
Cx40 494 as	1 μ l
dNTPs	2,5 μ l
Taq	0,3 μ l
Puffer	4 μ l
H ₂ O	7,2 μ l
	18 μ l + 2 μ l gDNA

Amplifizierungsprotokoll Cx40

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
35	94°C	1 min	Denaturierung
	60°C	30s	Annealing
	72°C	30 s	Elongation

Produkte Cx40

WT 314 bp
 KO 494 bp

Primer-Sequenzen Cx40

Name	Sequenz	Produkt
Cx40 WT s	5'-GGG AGA TGA GCA GGC CGA CTT CCG GTG CG-3'	WT 314 bp
Cx40 WT as	5'-GTA GGG TGC CCT GGA CAA TCT TCC C-3'	
Cx40 WT s	5'-GGA TCG GCC ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC-3'	
Cx40 WT as	5'-CTG ATG CTC TTC GTC CAG ATC ATC CTG ATC G-3'	KO 494 bp

Genotypisierung AT_{1a}-Rezeptor**PCR-Reaktionsansatz AT_{1a}**

20 µl Ansatz	
Primer AT _{1a} _1	1 µl
Primer AT _{1a} _2	1 µl
Primer AT _{1a} _3	1 µl
dNTPs	2,5 µl
Taq	0,3 µl
Puffer	4 µl
H ₂ O	8,2 µl
	18 µl + 2 µl gDNA

Amplifizierungsprotokoll AT_{1a}

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
40	94°C	30 s	Denaturierung
	50°C	30 s	Annealing
	72°C	1 min	Elongation

Produkte AT_{1a}

WT 483 bp
 KO 520 bp

Primer-Sequenzen AT_{1a}

Name	Sequenz	Produkt
AT _{1a} 1	5'-TGA GAA CAC CAA TCT CAC TG-3'	WT 483 bp
AT _{1a} 2	5'-TTC GTA GAC AGG CTT GAG-3'	
AT _{1a} 3	5'-CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG-3'	KO 520 bp

Die PCR-Ansätze wurden auf ein Agarosegel (1,5%) aufgetragen. Durch horizontale Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Qualitative und quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters

Im Folgenden sollen die Erkenntnisse vorgestellt werden, die mittels der 3D-Modelle und der mikroskopischen Untersuchung der Nierenserienschnitte gewonnen wurden. Um das Reninexpressionsmuster und das renale Gefäßsystem möglichst realitätsnah darzustellen, wurde mit dem 3D-Rekonstruktionsprogramm Amira eine räumliche Darstellung der Renin- und Glattmuskelaktinimmunfluoreszenzsignale erarbeitet. Auf sämtlichen Rekonstruktionen wurde der Ausschnitt so gewählt, dass jeweils ein arcuater Seitenast mit mehreren Arteriae interlobulares und den afferenten Arteriolen zu sehen ist. Die efferenten Arteriolen wurden bei der Rekonstruktion nur exemplarisch dargestellt.

Die histologisch-mikroskopischen Aufnahmen erlauben detailliertere Aussagen bezüglich der Reninexpression. Die Detailaufnahmen zeigen hierbei in beibehaltener Reihenfolge eine separate Aufnahme des Aktinkanals und des Reninkanals und ein gematchtes Bild beider Immunfluoreszenzsignale.

Des Weiteren erfolgt die quantitative Analyse der Reninexpression in den Nieren aller Versuchstiere anhand der Renin-mRNA-Levels. Die erfassten Werte und Faktoren unterliegen hierbei statistischen Schwankungen entsprechend der Standardabweichung.

3.1.1 Die adulte Wildtyp-Maus

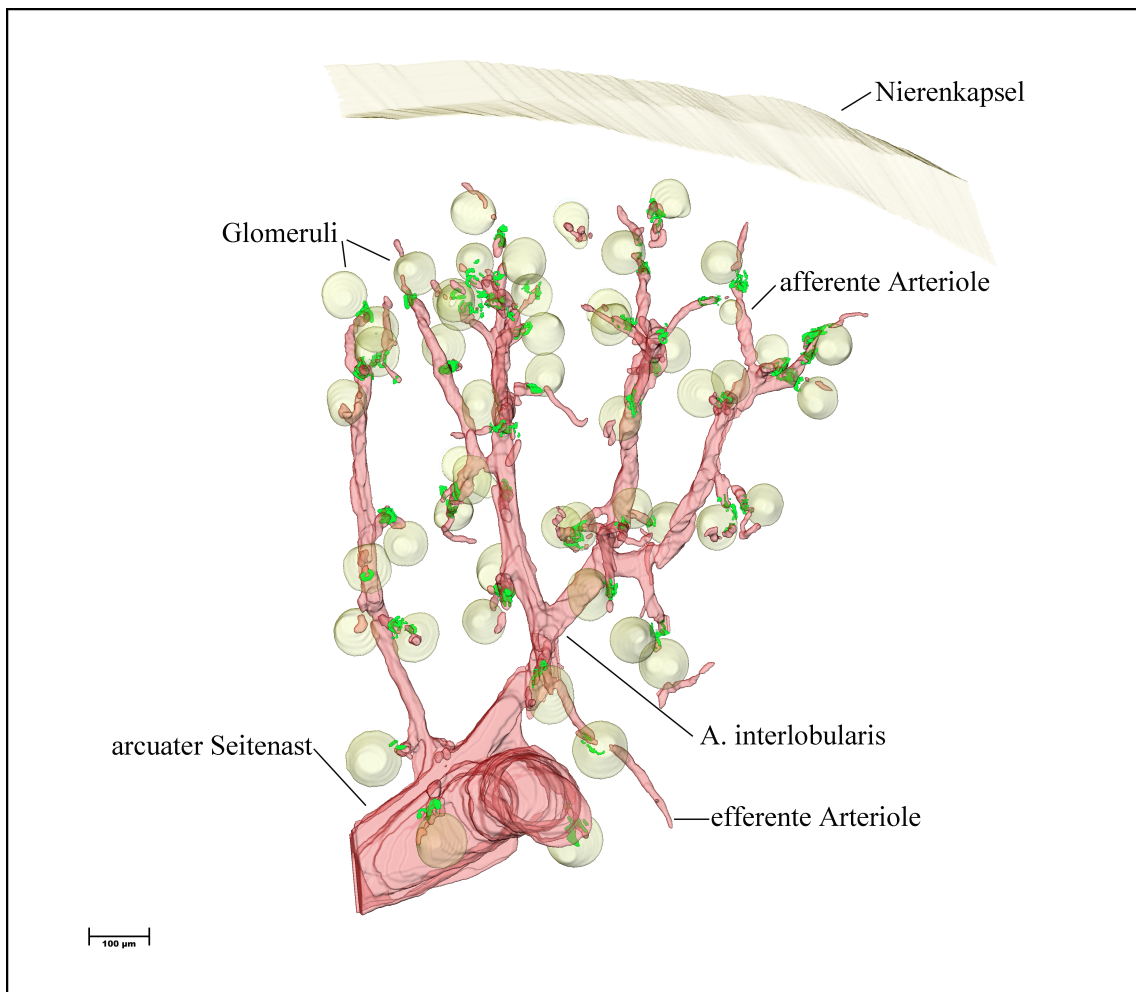


Abbildung 3.1: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten unbehandelten Wildtyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel (gelb).

Der rekonstruierte Gefäßbaum der unstimulierten Wildtyp-Maus (Abb. 3.1) soll als Referenz für die weiteren Rekonstruktionen dienen. Er vermittelt uns das charakteristische Vorhandensein von Menge und Lokalisation reninbildender Zellen in der Niere.

Hierbei befinden sich die reninbildenden Zellen an ihrer typischen juxtaglomerulären Position an den jeweiligen Enden der afferenten Arteriolen. Ausnahmslos an jedem Glomerulus findet die Reninexpression statt.

Innerhalb der Interlobulararterien, der arcuaten Seitenäste und der efferenten Arteriolen ist hingegen kein Renin vorzufinden (Abb. 3.1, Abb. 3.3).

Die Menge an Renin entspricht dem physiologischen Normalzustand bei normaler

Salzzufuhr (0,4% NaCl).

Die Detailaufnahme (Abb. 3.2) veranschaulicht die typisch juxtaglomeruläre Reninexpression einer afferenten Arteriole.

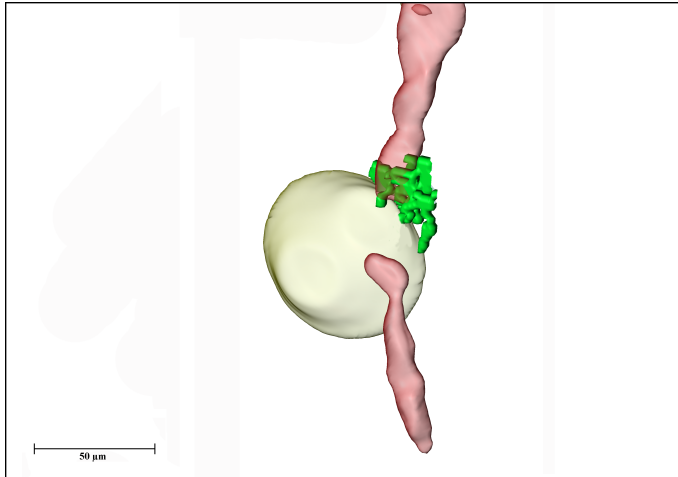


Abbildung 3.2:

[Detailansicht]

3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität einer afferenten Arteriole einer unbehandelten Wildtyp-Maus mit Glomerulus (gelb) und efferenter Arteriole.

Die histologische Übersichtsaufnahme (Abb. 3.3) zeigt das Reninvorkommen am distalen Ende der afferenten Arteriolen. Im arcuaten Seitenast, in den Interlobulararterien und in den efferenten Arteriolen kann keine Reninexpression nachgewiesen werden.

Betrachtet man die histologisch-mikroskopische Detailaufnahme (Abb. 3.4), so ist erkennbar, dass sich die Reninzellen in der Media der afferenten Arteriole befinden. Sie exprimieren überwiegend Renin und nur in sehr geringem Maße Glattmuskelaktin.

Die Zellen sind anhand ihrer typisch kubischen Zellform zu erkennen. Sie reichen hierbei über das Niveau der eher flachen und länglichen Glattmuskelzellen hinaus. Anstelle der Glattmuskelzellen bilden die Reninzellen an dieser Position die Gefäßwand.

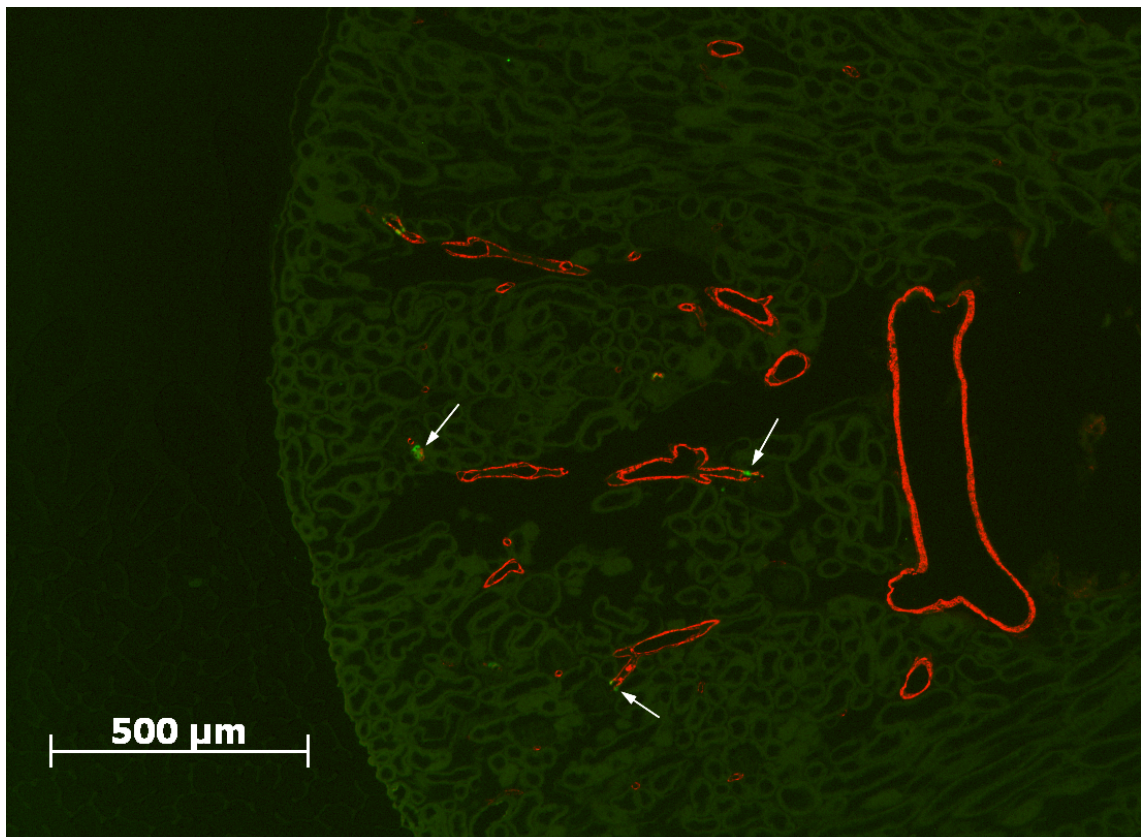


Abbildung 3.3: [Übersicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus. Glattmuskulaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün). Pfeile: typische juxtaglomeruläre Reninexpression der afferenten Arteriolen. 50fache Vergrößerung.

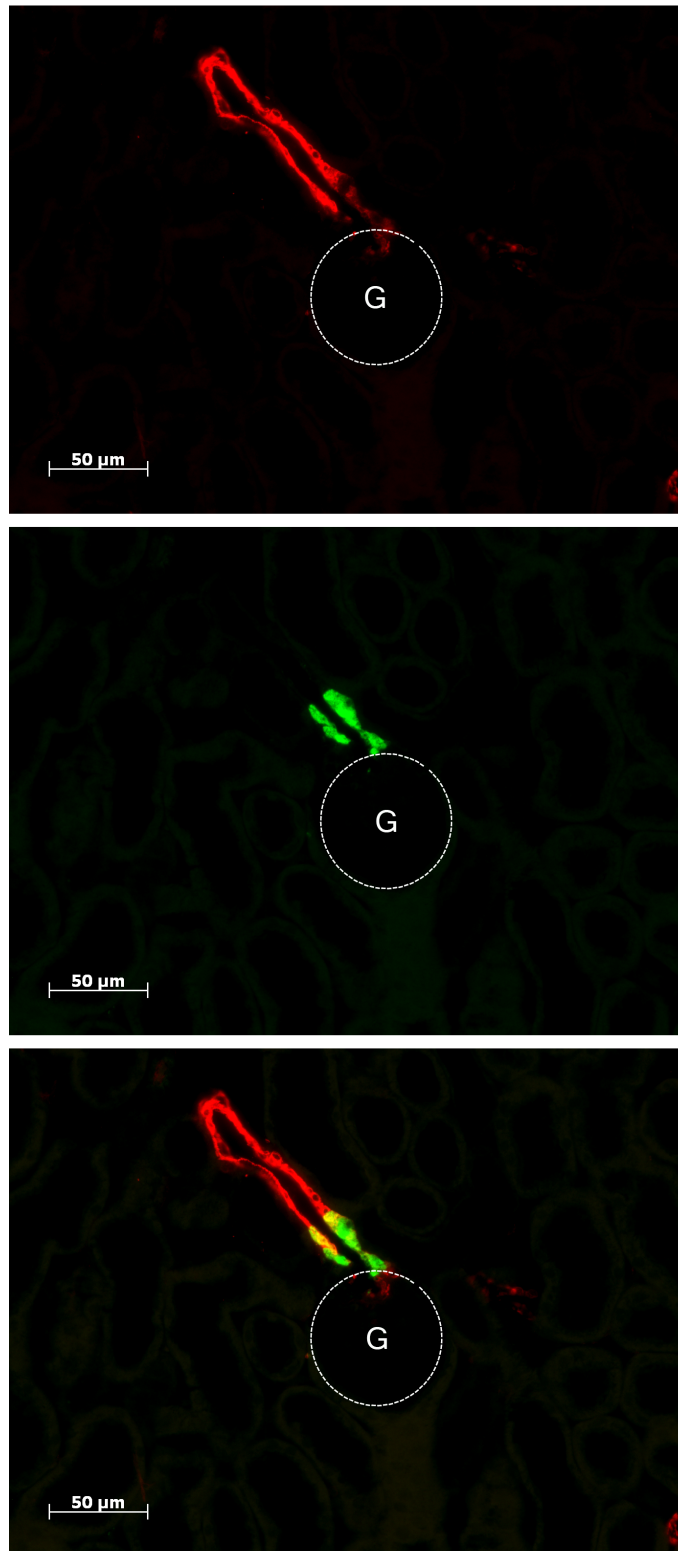


Abbildung 3.4: [Detailansicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer unbehandelten Wildtyp-Maus. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

3.1.2 Die adulte AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus

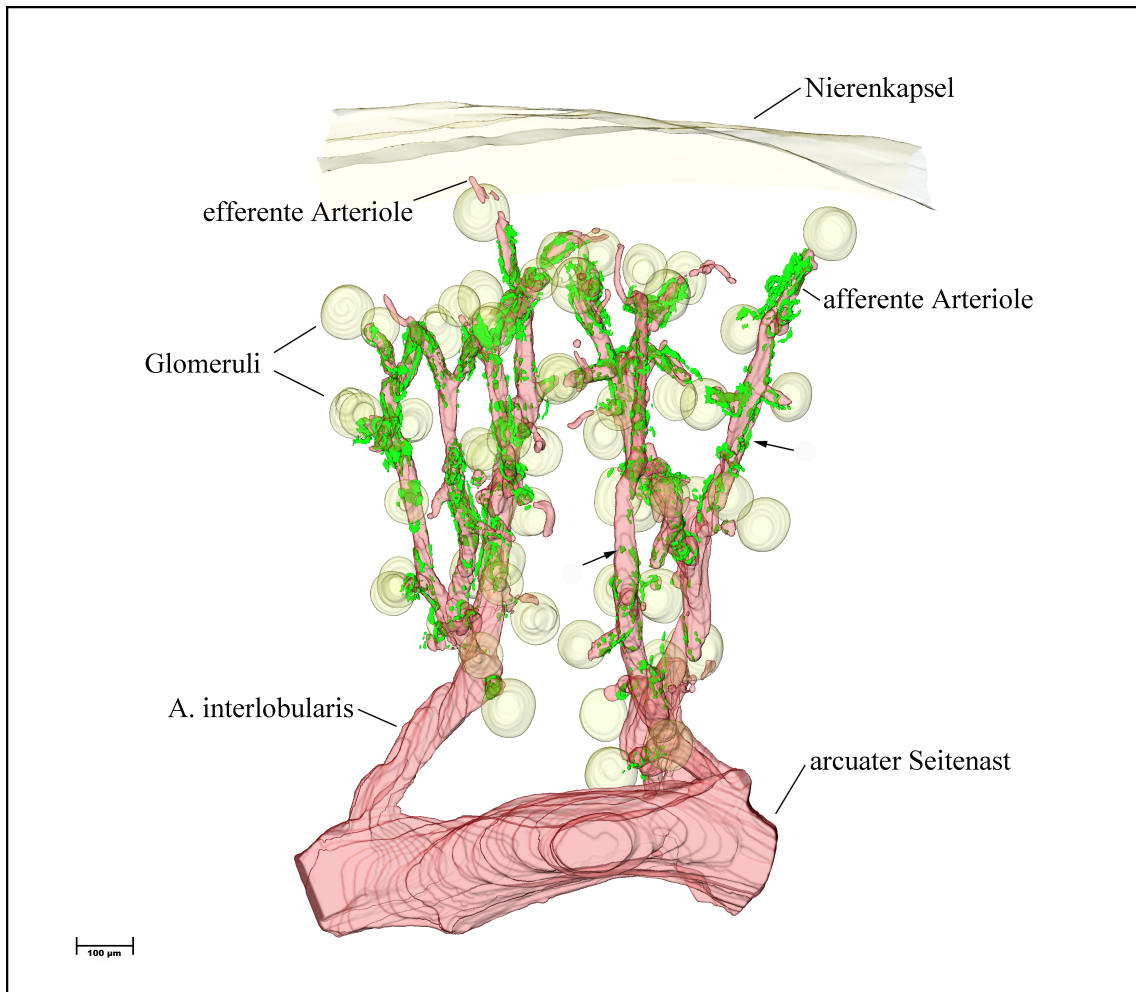


Abbildung 3.5: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten unehandelten AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Pfeile: Reninzellen in den Interlobulararterien.

Durch den Verlust des Angiotensin-II-Typ-1a-Rezeptors (AT_{1a}) fehlt die Angiotensin II-vermittelte Hemmung der Reninsynthese im Rahmen der negativen Rückkopplung. In der 3D-Rekonstruktion der AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus zeigen sich daher signifikante Unterschiede zur Wildtyp-Maus.

Es kommt zu einer massiven Rekrutierung von Reninzellen entlang des Gefäßsystems. So ergeben sich nicht nur am terminalen Ende der afferenten Arteriolen Reninsignale, sondern es kann nahezu im gesamten Verlauf der afferenten Arteriole Renin nachgewiesen werden. Bei den superfiziellen afferenten Arteriolen ist dieser Effekt verstärkt zu beobachten. Sie exprimieren deutlich mehr Renin als die juxtaglomerulären afferenten Arteriolen.

Auch innerhalb der Interlobulararterien sind verstreut reninpositive Zellen vorzufinden (Abb. 3.5, Abb. 3.6, Abb. 3.7, Abb. 3.8).

Der arcuate Seitenast und die efferenten Arteriolen enthalten hingegen keine Renin-Immunfluoreszenz-Signale.

In einem Ausschnitt des 3D-Modells (Abb. 3.6), auf dem der distale Abschnitt einer Interlobulararterie mit den aus ihr hervorgehenden afferenten Arteriolen und dazugehörigen Glomeruli dargestellt ist, wird der Unterschied besonders deutlich. Die Reninzellen befinden sich nicht mehr ausschließlich an ihrer juxtaglomerulären Position, sondern wurden entlang des Gefäßastes rekrutiert. Die retrograde Rekrutierung ist hierbei nicht kontinuierlich. Es finden sich einzelne und kleinere Gruppen von Reninzellen in der A. interlobularis (Pfeil Abb. 3.6). Die rekrutierten Reninzellen erscheinen der Gefäßwand teilweise aufgelagert.

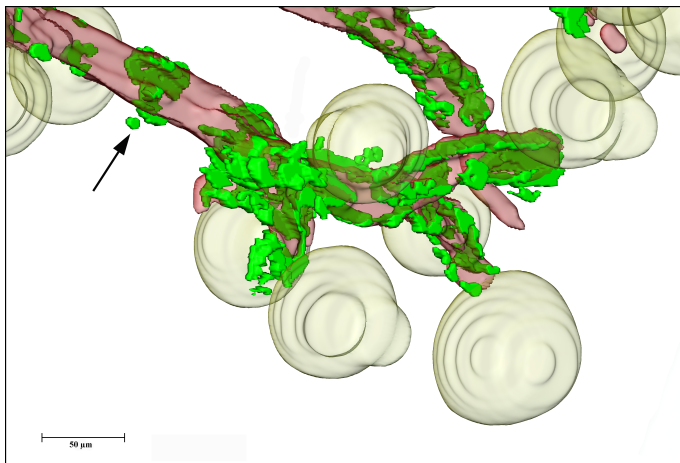


Abbildung 3.6:
[Detailansicht]
3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität eines Ausschnitts einer Interlobulararterie einer unbehandelten AT_{1a} -KO-Maus mit Glomeruli (gelb). Pfeil: Reninzellen in der Interlobulararterie.

Diese Beobachtung ist in der mikroskopischen Detailaufnahme deutlicher zu sehen (Abb. 3.8). Es ist erkennbar, dass sich die Reninzellen nicht mehr ausschließlich in der Media der Gefäßwand befinden, sondern auch der Gefäßwand aufsitzen. Während die Reninzellen am Gefäßpol des Glomerulus nahezu ausschließlich Renin exprimieren und kein Glattmuskelaktin, ist bei den rekrutierten Reninzellen eine sichtbar luminal betonte Expression von Glattmuskelaktin erkennbar. Einige rekrutierte Zellen stellen sich durch die Koexpression von Glattmuskelaktin und Renin auf Grund der überlagerten Immunfluoreszenzsignale gelb dar.

Zusammenfassend sind die wesentlichen Unterschiede der AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus bezüglich des Reninexpressionsmusters die stark gesteigerte Reninexpression und die retrograde Rekrutierung von Reninzellen in afferenten Arteriolen und den Interlobulararterien. Ebenfalls typisch für die AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus ist die mehrschichtige Reninzellanordnung.

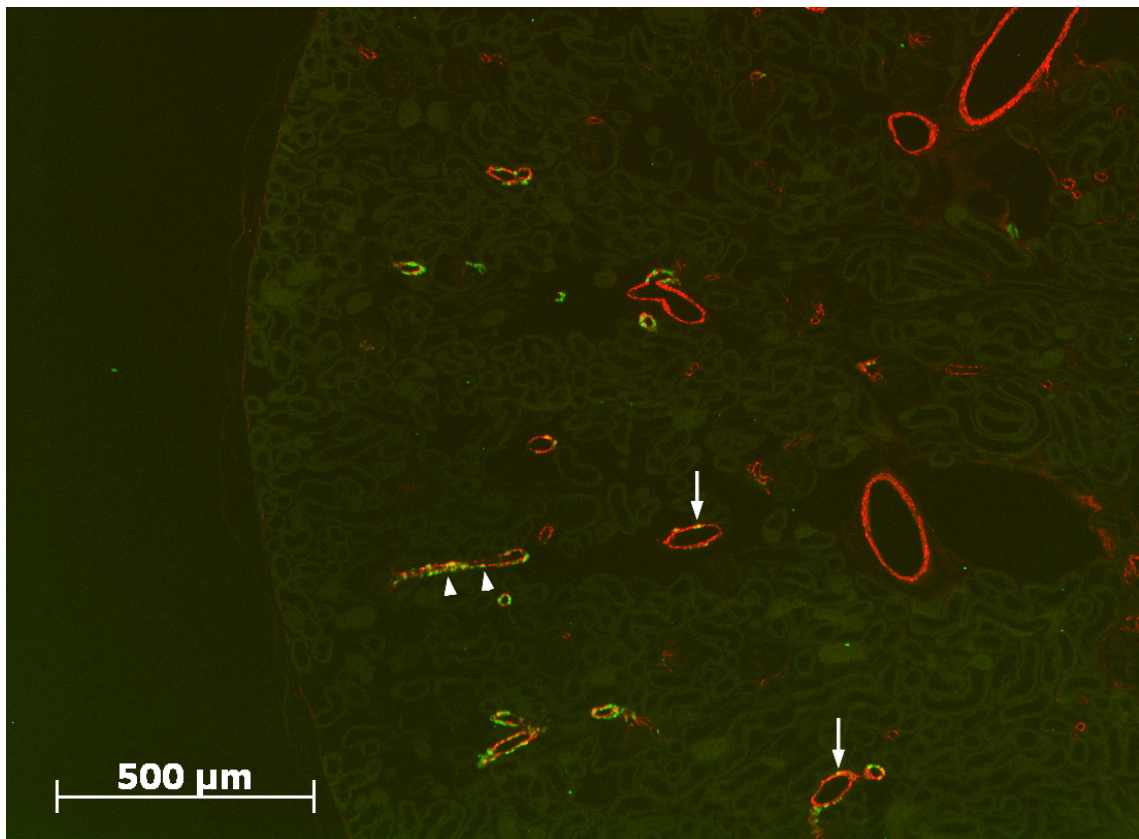


Abbildung 3.7: [Übersicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). Pfeile: in der Interlobulararterie befindliche Reninzellen. Pfeilspitzen: rekrutierte Reninzellen entlang einer afferenten Arteriole. 50fache Vergrößerung.

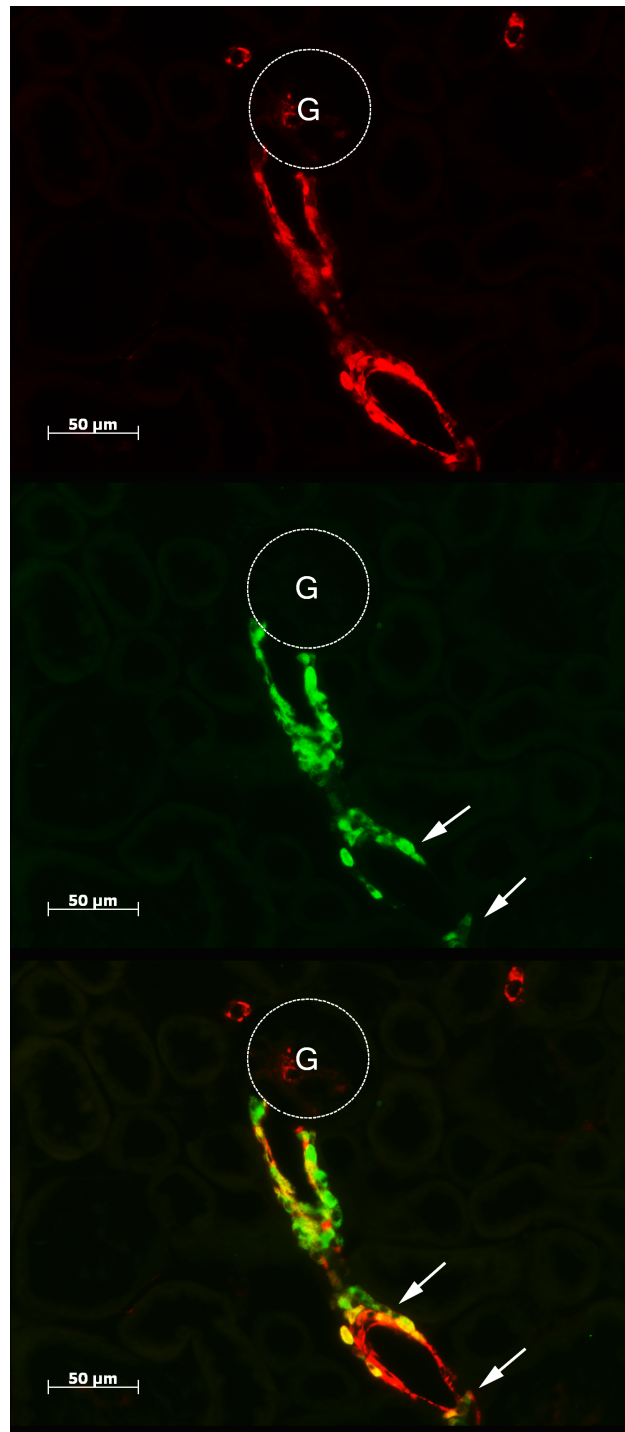


Abbildung 3.8: [Detailansicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). Pfeile: rekrutierte Reninzellen in der Interlobulararterie. 50fache Vergrößerung.

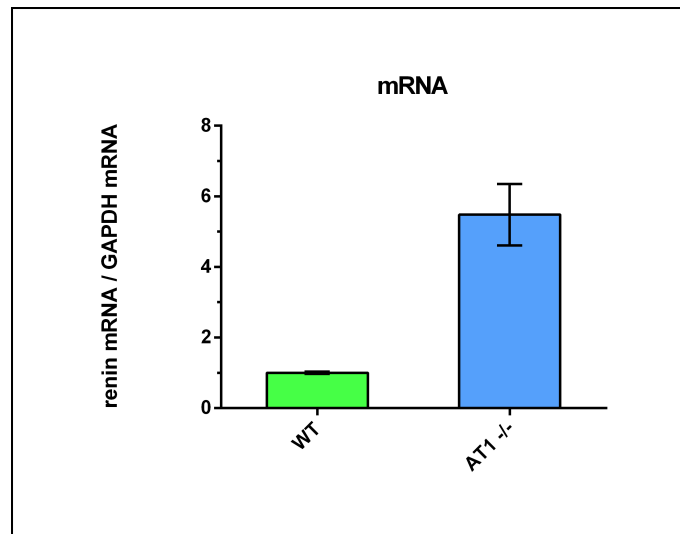


Abbildung 3.9: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Levels des Wildtyps und des AT_{1a}-Rezeptor-Knockouts; Normierung des Wildtyp-Werts auf 1.

Die erfassten mRNA-Level erlauben eine quantitative Aussage über die Reninexpression. Den in Abb. 3.9 gezeigten Werten liegen willkürliche Einheiten zugrunde. Für die Wildtyp-Maus wurde der Wert 1 definiert. Die Reninexpression in der Niere der adulten AT_{1a}-Rezeptor-Knockout-Maus ist im Vergleich mit der Wildtyp-Maus um das 5fache erhöht.

3.1.3 Die adulte Cx40-Knockout-Maus

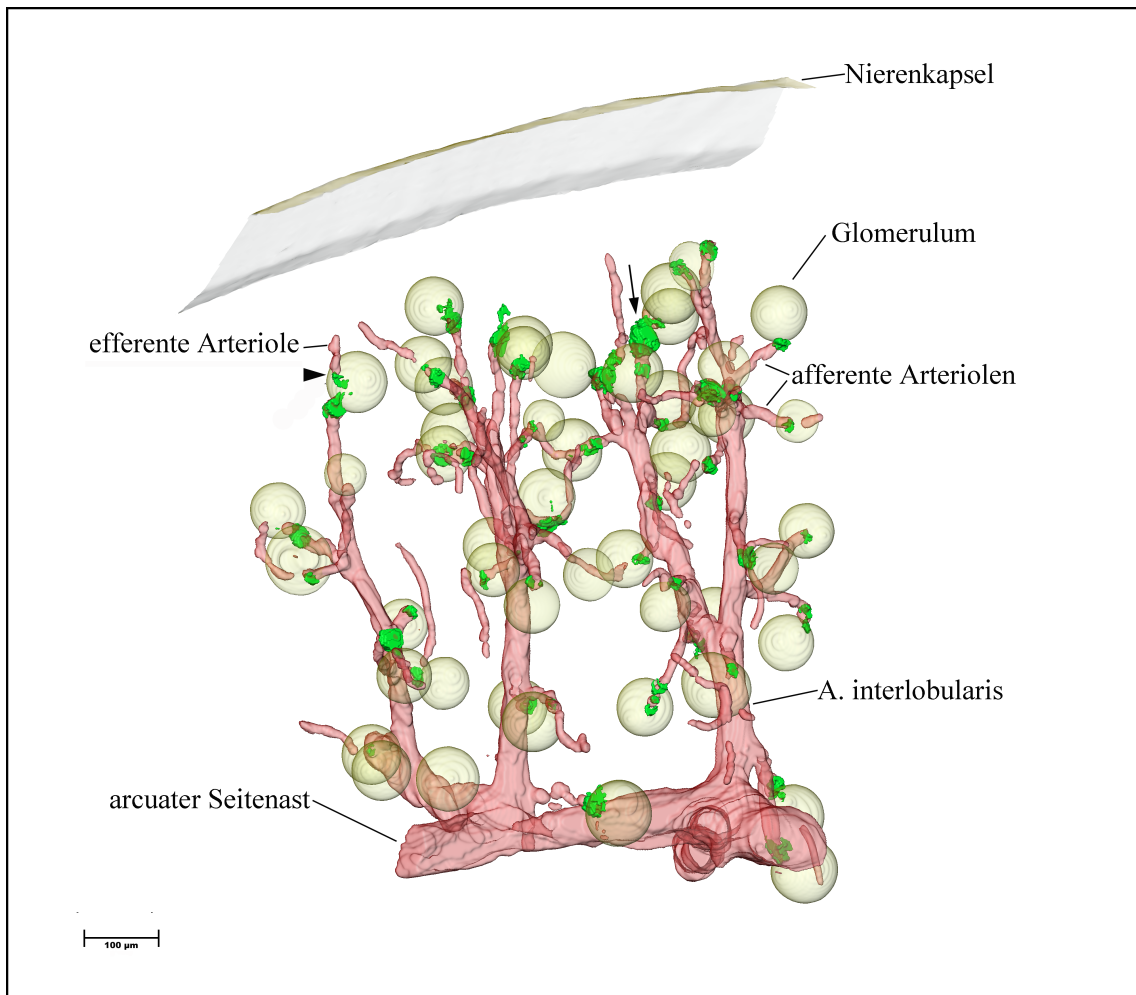


Abbildung 3.10: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten unbehandelten Cx40-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Pfeilspitze: ektopisch lokalisierte Reninzellen im extraglomerulären Mesangium. Pfeil: eine afferente Arteriole mit stark gesteigerter Reninexpression.

Connexin 40 (Cx40) ist ein bedeutender Baustein interzellulärer Verbindungen zwischen reninbildenden Zellen. Connexin40 ist somit ein entscheidender Faktor für die korrekte Funktion der Reninzellen.

Die Reninexpression in der 3D-Rekonstruktion des Gefäßausschnittes der Cx40-Knockout-Maus erscheint auf den ersten Blick unauffällig.

Die reninpositiven Zellen sind vornehmlich an ihrer juxtaglomerulären Position lokalisiert. In einem vergrößerten Ausschnitt des 3D-Modells (Abb. 3.11) ist jedoch zu sehen, dass sich reninexprimierende Zellen auch im extraglomerulären Mesangium befinden (siehe Pfeilspitze). Ebenso lassen sich reninpositive Zellen der Bow-

man'schen Kapsel aufgelagert nachweisen (siehe Pfeil).

Die Interlobulararterien und der arcuate Seitenast sind reninfrei. Der Reningehalt ist im Vergleich zur Wildtyp-Maus nicht signifikant erhöht. Eine Rekrutierung von Reninzellen scheint nicht stattgefunden zu haben. Vereinzelt gibt es jedoch afferente Arteriolen, die eine auffällig stark gesteigerte Menge an Reninzellen am juxtaglomerulären Apparat aufweisen (Abb. 3.10, siehe Pfeil).

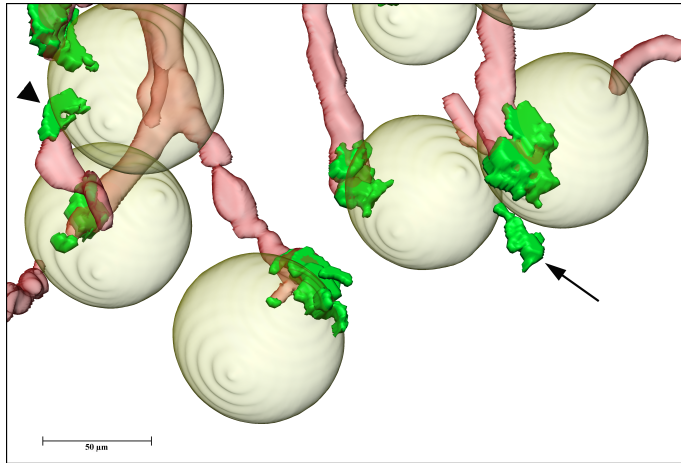


Abbildung 3.11:

[Detailansicht]

3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität afferenter Arteriolen einer unbehandelten Cx40-KO-Maus mit Glomeruli (gelb). Pfeilspitze: ektopisch lokalisierte Reninzellen im extraglomerulären Mesangium. Pfeil: der Bowman'schen Kapsel anliegende Reninzellen.

Bereits in der histologischen Übersichtsaufnahme (Abb. 3.12) sind neben den juxtaglomerulären Zellen in den afferenten Arteriolen einzelne reninexprimierende Zellen im extraglomerulären Mesangium zu sehen. Diese sitzen ektopisch zwischen Vas afferens und Vas efferens am glomerulären Gefäßpol.

Abb. 3.13 (linke Bilderserie) erlaubt eine genauere Aussage bezüglich der ektopischen Reninvorkommen.

Neben Reninzellen, die sich an ihrer typischen juxtaglomerulären Position befinden und sowohl Renin als auch Glattmuskelaktin exprimieren, sind weitere Reninzellen zu sehen, die dem Gefäß aufsitzen (siehe Pfeilspitze). Sie exprimieren ausschließlich Renin und kein Glattmuskelaktin und haben eine kubische Gestalt.

Den efferenten Arteriolen aufsitzende reninexprimierende Zellen, die sich in ihrer Gestalt deutlich von den anderen reninpositiven Zellen unterscheiden, sind ebenfalls zu beobachten (siehe Pfeil). Sie haben keine kubische Form, sondern sind von schmaler, länglicher Gestalt.

In der rechten Bilderserie in Abb. 3.13 sind ebenfalls reninexprimierende Zellen in der efferenten Arteriole zu sehen (siehe Pfeil). Diese wiederum besitzen eine kubische Gestalt.

In einer weiteren histologischen Aufnahme (Abb. 3.14, linke Bilderserie) sind Renin-Immunfluoreszenzsignale innerhalb des Glomerulus dargestellt (siehe Pfeil). Sie sind

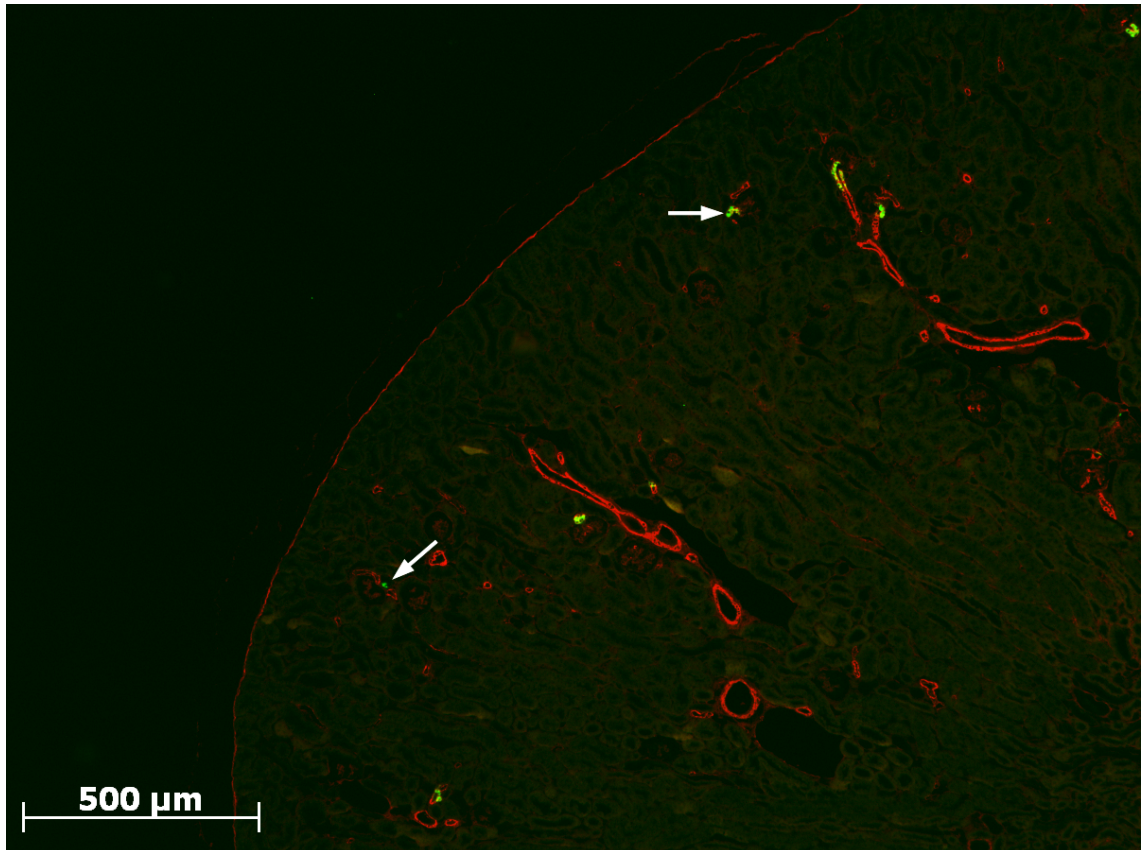


Abbildung 3.12: [Übersicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer Cx40-Knockout-Maus. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). Pfeile: reninbildende Zellen im extraglomerulären Mesangium. 50fache Vergrößerung.

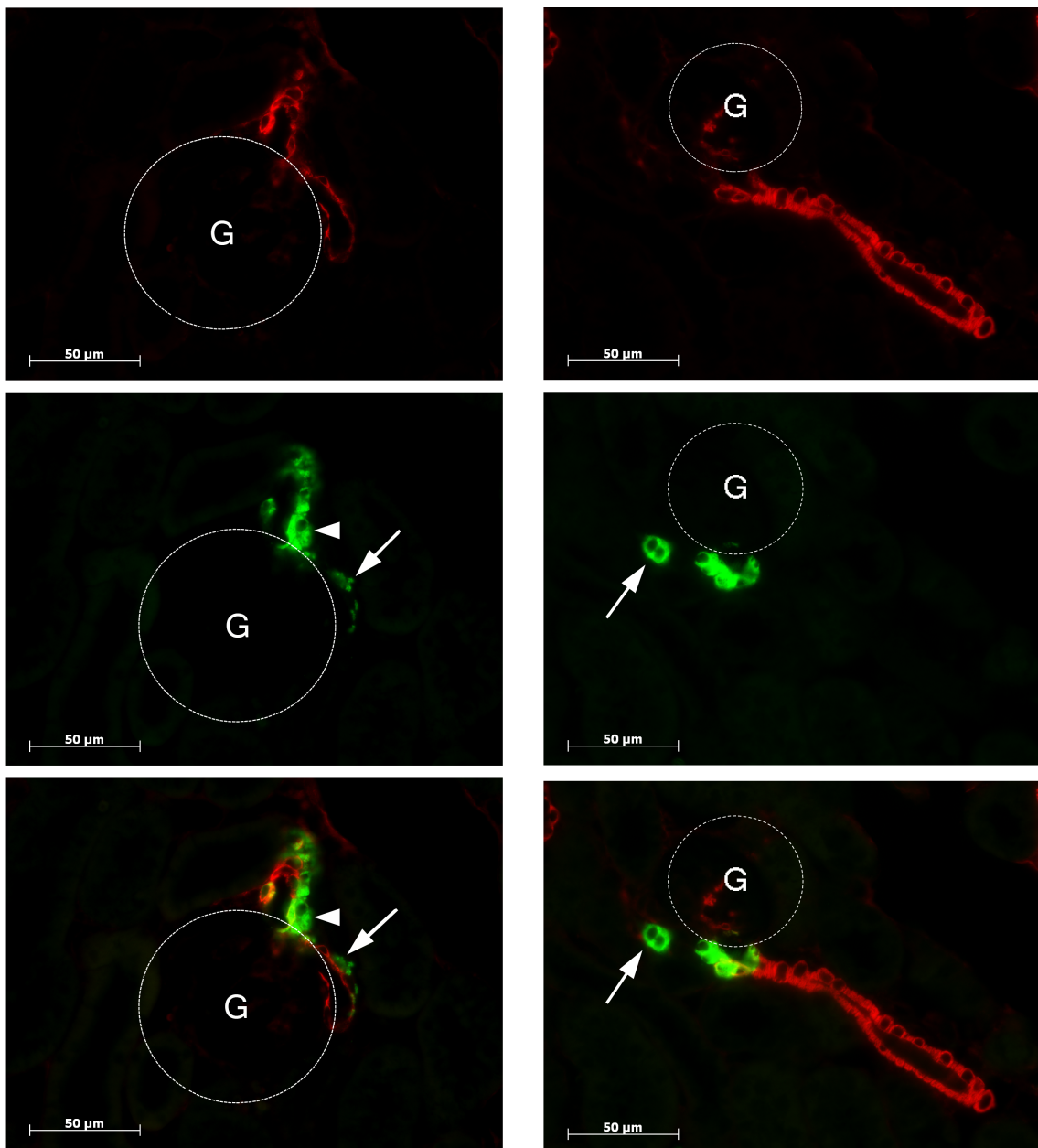


Abbildung 3.13: [Detailansicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer Cx40-KO-Maus. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). G = Glomerulus. 630fache Vergrößerung.

Linke Bilderserie: Ektopische Reninsynthese im extraglomerulären Mesangium. Pfeil: schmale, längliche Reninzellen, die der efferenten Arteriole aufsitzen. Pfeilspitze: der afferenten Gefäßwand aufsitzende reninexprimierende Zellen.

Rechte Bilderserie: Pfeil: kubische Reninzellen in der efferenten Arteriole.

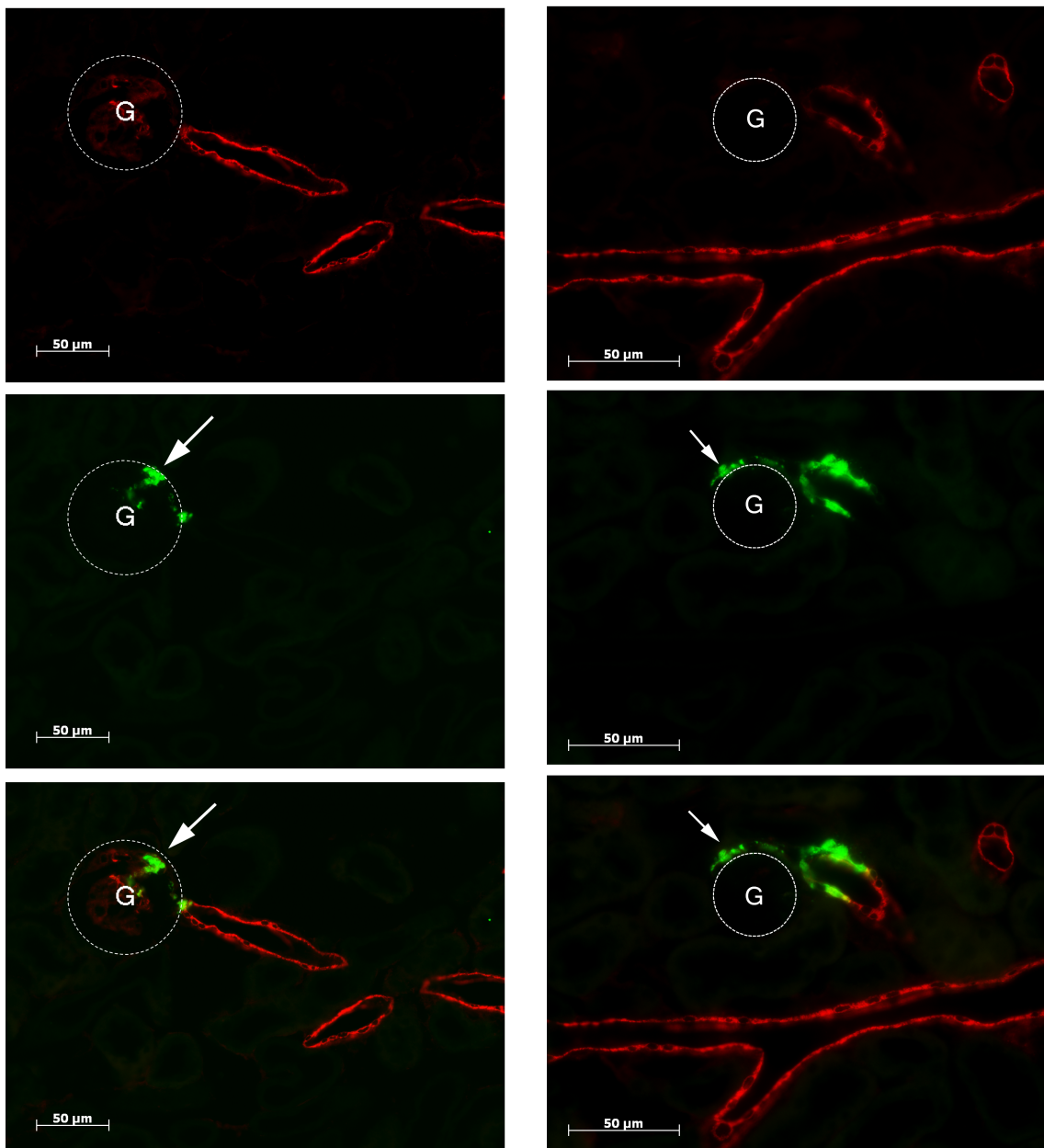


Abbildung 3.14: [Detailansicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer Cx40-KO-Maus. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). G = Glomerulus.

Linke Bilderserie: Pfeil: Reninexpression im Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

Rechte Bilderserie: Pfeil: ektopisch gelegene, reninexprimierende Zellen länglicher Gestalt, die sich der Bowman'schen Kapsel anlagern. 630fache Vergrößerung.

diffus verteilt und lassen sich keiner konkreten Zellstruktur zuordnen.

In der rechten Bilderserie (Abb. 3.14) sind atypisch lokalisierte reninexprimierende Zellen zu sehen, die der Bowman'schen Kapsel aufsitzen (siehe Pfeil). Sie haben ebenfalls eine schmale und längliche Gestalt und lagern sich, ausgehend vom glomerulären Gefäßpol der Bowman'schen Kapsel an. Die Form und Gestalt der Zelle erinnert hierbei an die der efferenten Arteriole aufsitzende reninexprimierende Zelle aus Abb. 3.13 (linke Bilderserie).

Die histologischen Detailaufnahmen zeigen, dass die Reninzellen nicht mehr ausschließlich am Ende der afferenten Arteriole zu finden sind. Stattdessen findet die Reninexpression bei der Cx40-Knockout-Maus auch im umgebenden extraglomerulären Mesangium, in und auf efferenten Arteriolen und im Bereich der Bowman'schen Kapsel statt. Vereinzelt sitzen Reninzellen mehrschichtig der Gefäßwand auf. Ebenso wurden atypisch geformte schmale Reninzellen gefunden.

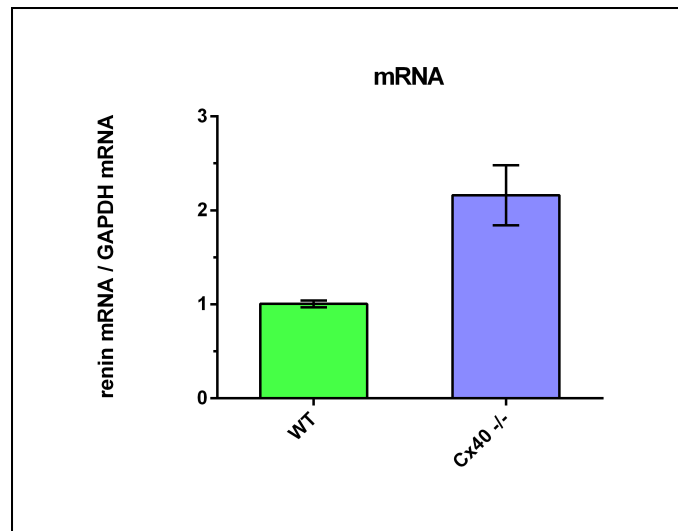


Abbildung 3.15: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Werte des Wildtyps und des Cx40-Knockouts; Normierung des Wildtyp-Werts auf 1.

Wie in Abb. 3.15 zu sehen, ist die Reninexpression in der Niere der Cx40-Knockout-Maus in Bezug zur Reninexpression des Wildtyps um den Faktor 2 gesteigert.

3.1.4 Die adulte AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus

3.1.4.1 Die AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus unter Normalsalzdiät [NS]

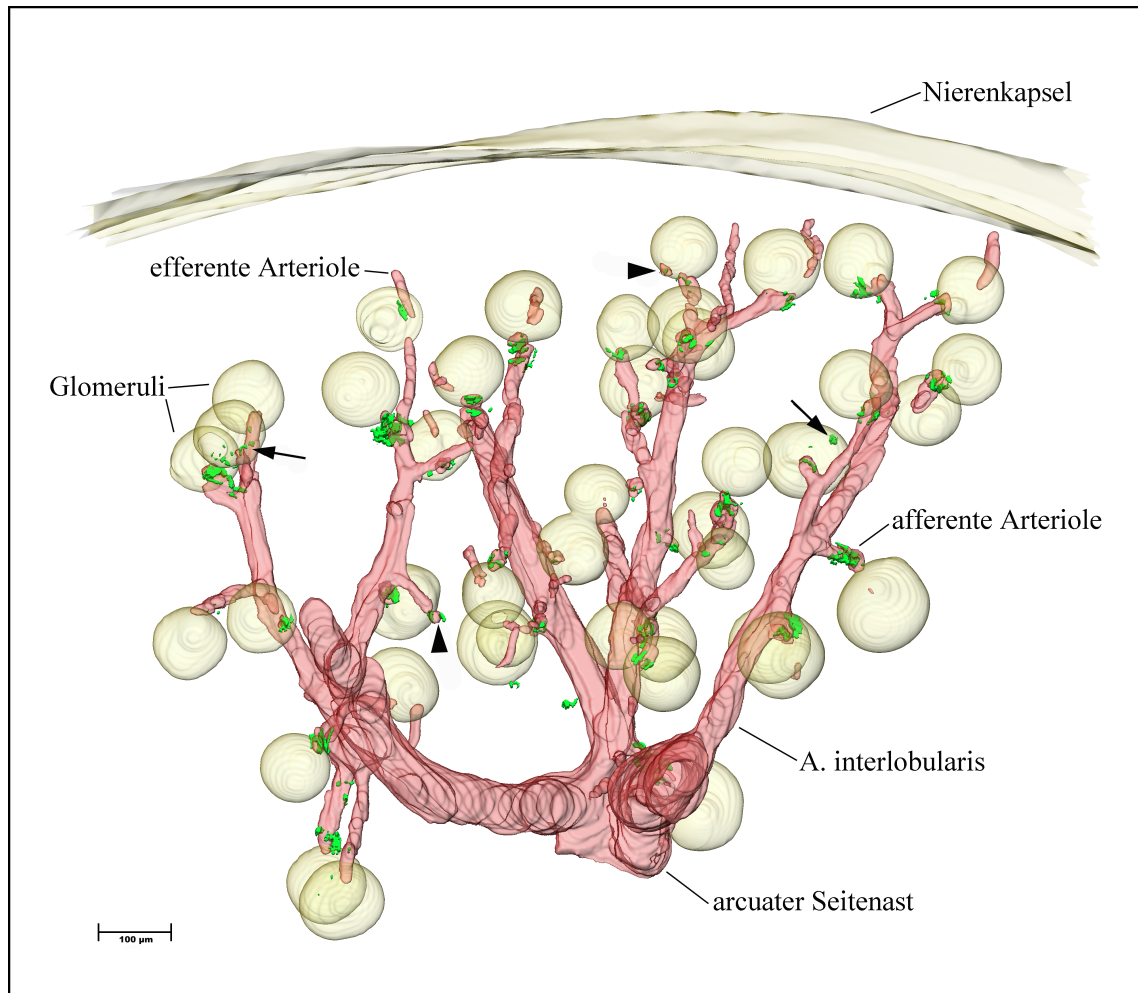


Abbildung 3.16: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten unbehandelten AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Pfeilspitzen: Reninexpression im extraglomerulären Mesangium. Pfeil: Reninsignale im Bereich der Bowman'schen Kapsel.

In der 3D-Rekonstruktion der Niere einer adulten AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus unter Normalsalzbehandlung (Abb. 3.16) zeigen sich zahlreiche Unterschiede zur Wildtyp-Maus.

So befinden sich reninexprimierende Zellen nicht mehr ausschließlich an ihrer juxtaglomerulären Position in der Media der afferenten Arteriolen, sondern zeigen sich im Bereich von efferenten Arteriolen und der Bowman'schen Kapsel. Die arcuaten Seitenäste und die Interlobulararterien sind reninfrei.

In einem vergrößerten Ausschnitt aus Abb. 3.16 sind zwei afferente Arteriolen mit ihren zugehörigen Glomeruli dargestellt (Abb. 3.17). Auffällig hierbei ist das diskontinuierliche Reninexpressionsmuster, das sich über die gesamte Länge der links abgebildeten afferenten Arteriole erstreckt. Neben den juxtaglomerulären Reninzel- len befinden sich auch im proximalen Bereich der afferenten Arteriole reninbildende Zellen.

Ein völlig anderes Reninexpressionsmuster weist das rechts abgebildete Gefäß auf. An der juxtaglomerulären Position ist keine Reninexpression vorzufinden, stattdessen lassen sich innerhalb der Bowman'schen Kapsel einzelne Renin-Fluoreszenzsignale feststellen.

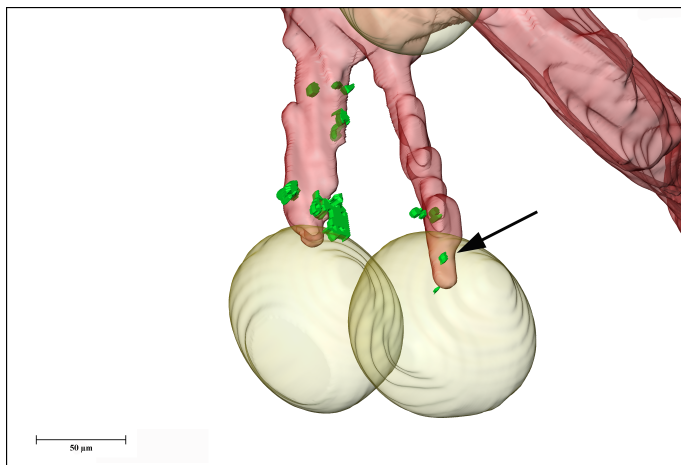


Abbildung 3.17:

[Detailansicht]

3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität afferenter Arteriolen einer unbehandelten AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus mit Glomeruli (gelb). Pfeil: Reninsignale in der Bowman'schen Kapsel.

In der histologischen Übersichtsaufnahme Abb. 3.18 sind bereits Abweichungen vom normalen Reninexpressionsmuster festzustellen. Die Reninmenge erscheint nur leicht gesteigert, jedoch stellt sich die Reninverteilung bei der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [NS] insgesamt sehr inhomogen dar. So existieren neben auf gesamter Länge Renin exprimierenden Vasa afferentia (Abb. 3.19), auch afferente Arteriolen, die nahezu reninfrei erscheinen. Neben der Rekrutierung von reninbildenden Zellen ist eine weitere Auffälligkeit der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [NS] die ektopische Reninexpression. Im extraglomerulären Mesangium im Bereich des Gefäßpols, in der Bowman'schen Kapsel und im umgebenden Interstitium lässt sich Renin nachweisen.

In der Detailaufnahme Abb. 3.19 ist zu sehen, dass sich die Reninexpression nahezu über die gesamte Länge der afferenten Arteriole erstreckt. Die rekrutierten Reninzellen haben eine kubische Gestalt und sitzen einer schmalen Glattmuskelaktin-exprimierenden Zellschicht der Gefäßwand auf. An einigen Stellen sitzen die Reninzellen mehrschichtig dem Gefäß auf (siehe Pfeilspitze). Die Gefäßwand der afferenten Arteriolen ist bei der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [NS] somit nicht einschichtig, sondern mehrschichtig.

Im Bereich des glomerulären Gefäßpols und der efferenten Arteriole befinden sich

ebenfalls reninsynthetisierende Zellen (siehe Pfeil). Auffällig hierbei sind die Reninzellen, die der efferenten Arteriole anliegen (siehe *). Diese unterscheiden sich deutlich von der kubischen Form der anderen Reninzellen und besitzen eine äußerst schmale, längliche Gestalt.

Wie in Abb. 3.20 ersichtlich, sind Bereiche zu finden, in denen in der afferenten Arteriole keine Reninexpression nachweisbar ist. Hingegen erscheinen punktuelle Immunfluoreszenzsignale innerhalb der Bowman'schen Kapsel.

Eine weitere Besonderheit der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [NS] ist der Fund größerer Reninansammlungen im Interstitium (Abb. 3.20, rechte Bilderserie). Hierbei erscheinen diffuse Immunfluoreszenzsignale im tubulären Interstitium, die in keinem näheren Zusammenhang mit einem arteriellen Gefäß stehen.

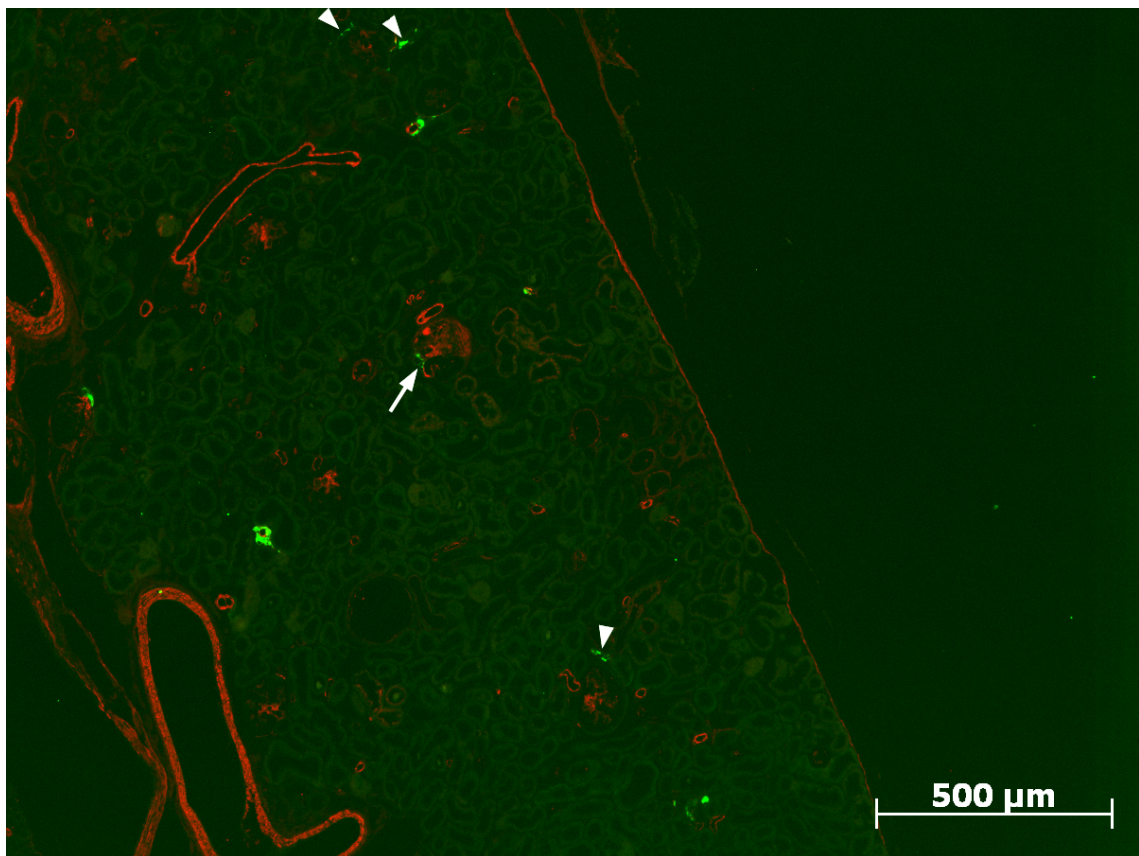


Abbildung 3.18: [Übersicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [NS]. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). Pfeil: Reninvorkommen im extraglomerulären Mesangium. Pfeilspitzen: Renin-Fluoreszenzsignale im Bereich der Bowman'schen Kapsel. 50fache Vergrößerung.



Abbildung 3.19: [Detailansicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [NS]. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). G = Glomerulus. Pfeilspitze: mehrschichtige Anordnung von Reninzellen. Pfeil: ektopisch gelegene Reninzellen im Bereich des glomerulären Gefäßpols im extraglomerulären Mesangium. * atypische Reninzelle in der efferenten Arteriole. 400fache Vergrößerung.

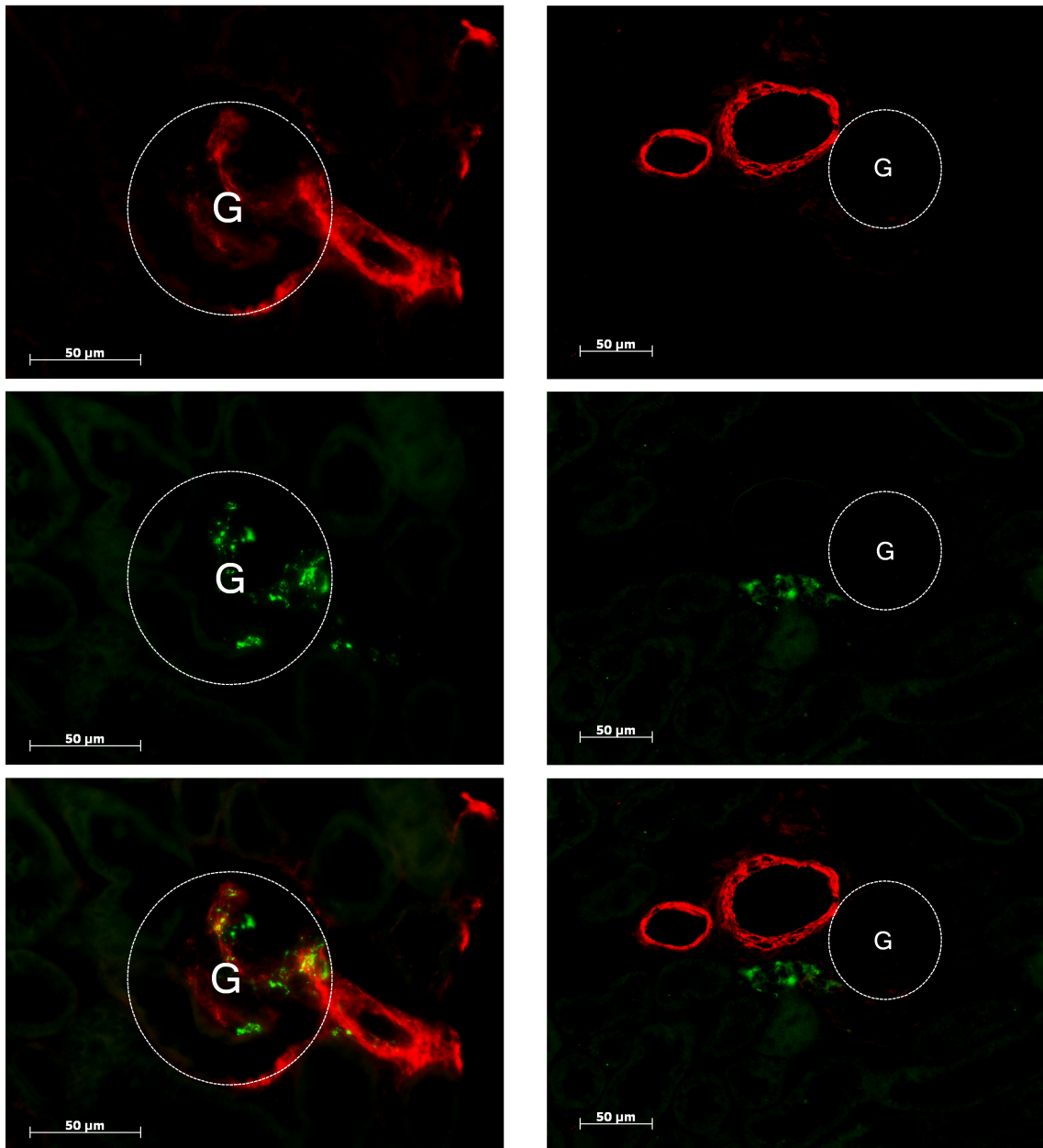


Abbildung 3.20: [Detailansicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [NS]. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). G = Glomerulus.

Linke Bilderserie: Diffus verteilte Renin-Fluoreszenzsignale im Glomerulus. 630fache Vergrößerung

Rechte Bilderserie: Reninvorkommen im tubulären Interstitium. 400fache Vergrößerung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [NS] zu Reninvorkommen in den Interlobulararterien, in efferenten Arteriolen, an der Bowman'schen Kapsel, im extraglomerulären Mesangium und im Interstitium kommt. Die Reninexpression ist inhomogen verteilt. Vereinzelt kommt es zu mehrschichtigen Reninzellanordnungen auf dem Gefäß. Neben den kubischen Reninzellen tauchen atypische Reninzellen auf, die sich deutlich in ihrer Gestalt unterscheiden.

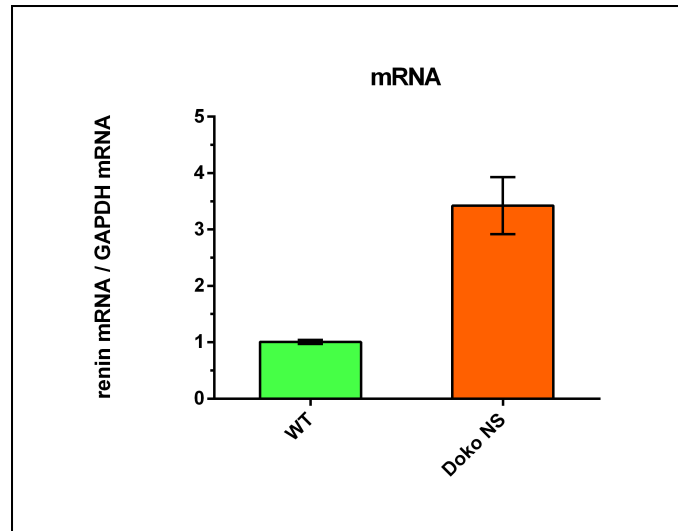


Abbildung 3.21: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Levels des Wildtyps und des AT_{1a} -Cx-40-Knockouts [NS]; Normierung des Wildtyp-Werts auf 1.

Wie Abb. 3.21 zeigt, ist der Renin-mRNA-Level der AT_{1a} -Cx-40-Knockout-Maus unter Normalsalzbehandlung in Bezug auf den Wert des Wildtyps erhöht. Hierbei ergibt sich für den AT_{1a} -Cx-40-Knockout [NS] ein 3fach erhöhter Renin-mRNA-Level.

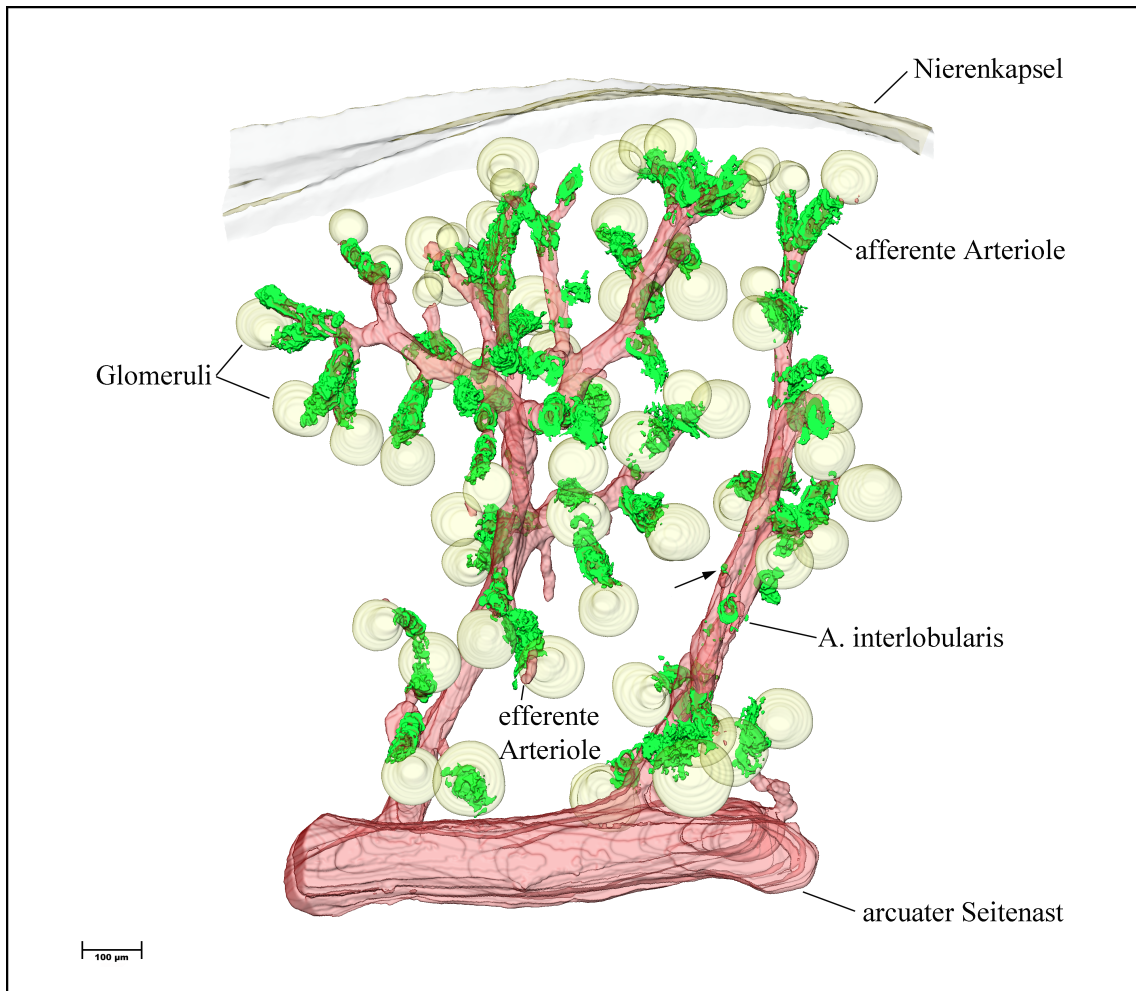
3.1.4.2 Die AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus nach 10d Niedrigsalzdiät [LS]

Abbildung 3.22: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [LS] mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Pfeil: rekrutierte Reninzellen in der Interlobulararterie.

Durch eine Niedrigsalzdiät kommt es zur Stimulation der Reninfreisetzung vermittelt durch die Macula Densa-Zellen des juxtaglomerulären Apparates. Dies führt zur Rekrutierung von reninbildenden Zellen entlang der afferenten Arteriolen. Dieser Effekt ist in dem 3D-Modell der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [LS] deutlich zu erkennen (Abb. 3.22). Die afferenten Arteriolen exprimieren auf gesamter Länge Renin. Ebenso kommt es zu Renin-Immunfluoreszenzsignalen innerhalb der Aa. interlobulares. Die Reninproduktion erscheint massiv gesteigert. Die arcuaten Seitenäste sind reninfrei.

Ein vergrößerter Ausschnitt des 3D-Modells (Abb. 3.23) zeigt bereits die wesentlichen Charakteristika der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus. Zu sehen ist der Endabschnitt einer Interlobulararterie mit zwei abgehenden afferenten Arteriolen, deren Glomeruli und eine efferente Arteriole. Die afferenten Arteriolen exprimieren auf ganzer Länge Renin. Die Reninzellen scheinen der Gefäßwand teilweise aufzusitzen. In der Interlobulararterie befinden sich ebenfalls reninexprimierende Zellen. Auch an efferenten Arteriolen befinden sich Reninsignale.

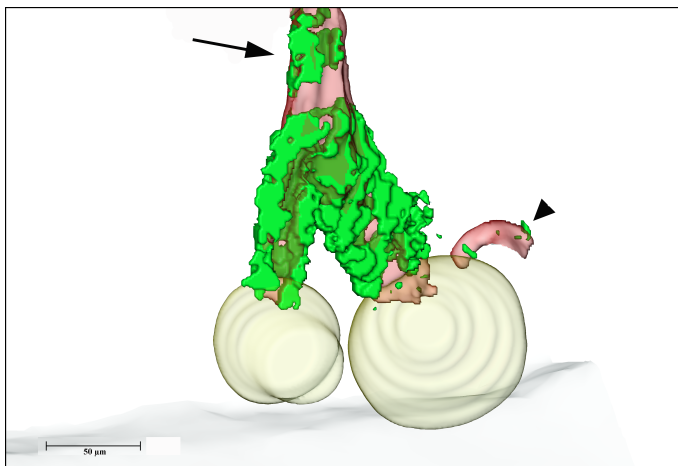


Abbildung 3.23:

[Detailansicht]

3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität afferenter Arteriolen einer AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [LS] mit Glomeruli (gelb). Pfeilspitze: Reninzellen an einer efferenten Arteriole. Pfeil: Reninzellen in der Interlobulararterie.

Die histologischen Aufnahmen verdeutlichen die bisherigen Befunde. Es kommt zur Rekrutierung von reninbildenden Zellen entlang der afferenten Arteriolen (Abb. 3.24, Abb. 3.25, Abb. 3.26). Einzelne Reninzellen sind auch in den Interlobulararterien zu finden (Abb. 3.24, Abb. 3.25). Die die Gefäßwand bildenden Zellen exprimieren sowohl Glattmuskelaktin als auch Renin. Durch die hohe Koexpression von Renin und Glattmuskelaktin ergeben sich zahlreiche gelbe Immunfluoreszenzsignale. Bereits in der histologischen Übersichtsaufnahme Abb. 3.24 sind Reninzellen zu sehen, die mehrschichtig auf den Gefäßen sitzen (siehe *). In der Detailaufnahme Abb. 3.25 bestätigt sich, dass sich die Gefäßwand der afferenten Arteriole nicht mehr einschichtig sondern mehrschichtig darstellt. Diese Beobachtung zeigt sich besonders deutlich im Gefäß-Querschnitt (siehe Pfeilspitze). Hierbei ist zu sehen, dass der Gefäßwand mehrere Reihen reninbildender Zellen aufsitzen. Die Reninexpression reicht teilweise weit ins Interstitium.

Neben der Rekrutierung reninbildender Zellen in den afferenten Arteriolen und interlobularen Arterien kommt es bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus, die zehn Tage einer Nidrigsalzdiät unterzogen wurde, auch zu ektopischen Reninvorkommen (Abb. 3.25, Abb. 3.26). In Abb. 3.25 sind innerhalb des Glomerulus im Bereich des Gefäßpols Reninsignale zu sehen (siehe Pfeil). Auch in Abb. 3.26, rechte Bilderserie findet die Reninsynthese innerhalb des Glomerulus statt (siehe Pfeilspitze). Ebenfalls kommt es zu einer erkennbaren Reninexpression in der efferenten Arteriole (siehe Pfeil). In

Abb. 3.26, linke Bilderserie fällt ein schmaler Reninraum auf, der sich im Interstitium um einen Tubulus legt (siehe Pfeilspitze).

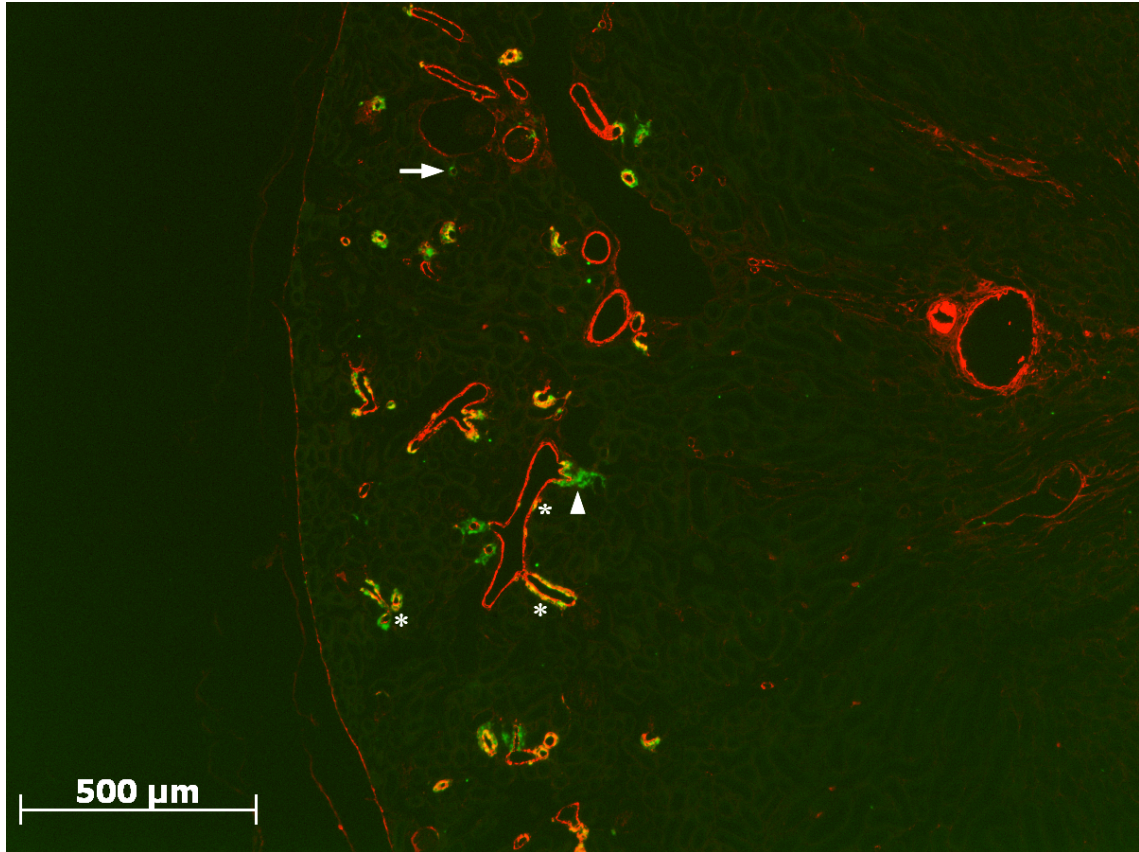


Abbildung 3.24: [Übersicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [LS]. Glattmuskulatur Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). Pfeil: Renin-Fluoreszenzsignale in einer efferenten Arteriole. Pfeilspitze: größere ektopische Reninansammlung im Interstitium. * weist auf rekrutierte Reninzellen entlang der afferenten Arteriole und in der A. interlobularis hin. 50fache Vergrößerung.

Zusammenfassend ergeben sich bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [LS] folgende Besonderheiten: Es kommt im Rahmen der retrograden Rekrutierung zu einer massiv gesteigerten Reninexpression entlang der afferenten Arteriolen und in den Interlobulararterien. Zudem lassen sich ektopische Reninvorkommen in efferenten Arteriolen, im Bereich der Bowman'schen Kapsel, im extraglomerulären Mesangium und im Interstitium nachweisen. Die Reninzellen sitzen zu Großteilen mehrschichtig der Gefäßwand auf und es existieren ektopisch gelegene atypisch geformte reninexprimierende Zellen.

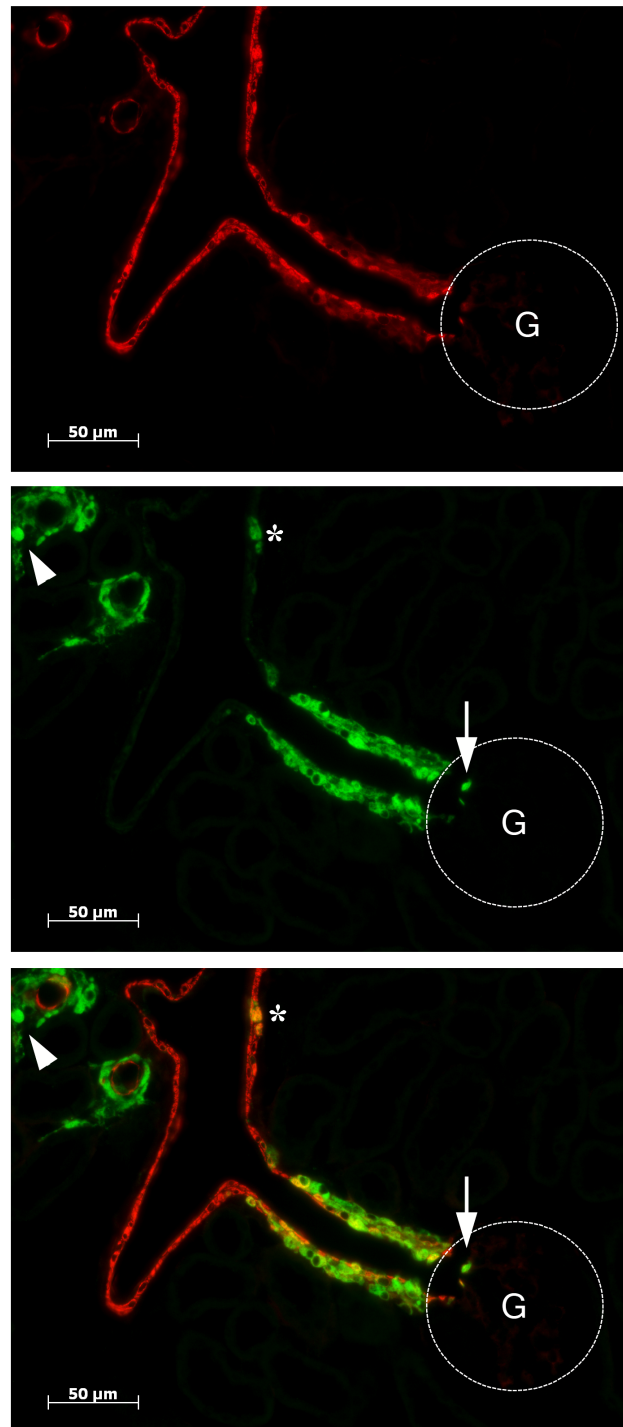


Abbildung 3.25: [Detailansicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [LS]. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolo­kalisierung beider Immunreaktionen (gelb). G = Glomerulus. Pfeil: Reninvorkommen im Glomerulus. Pfeilspitze: Reninzellen, die mehrreihig einer afferenten Arteriole aufsitzen. * markiert renin­expressierende Zellen in der Interlobulararterie. 400fache Vergrößerung.

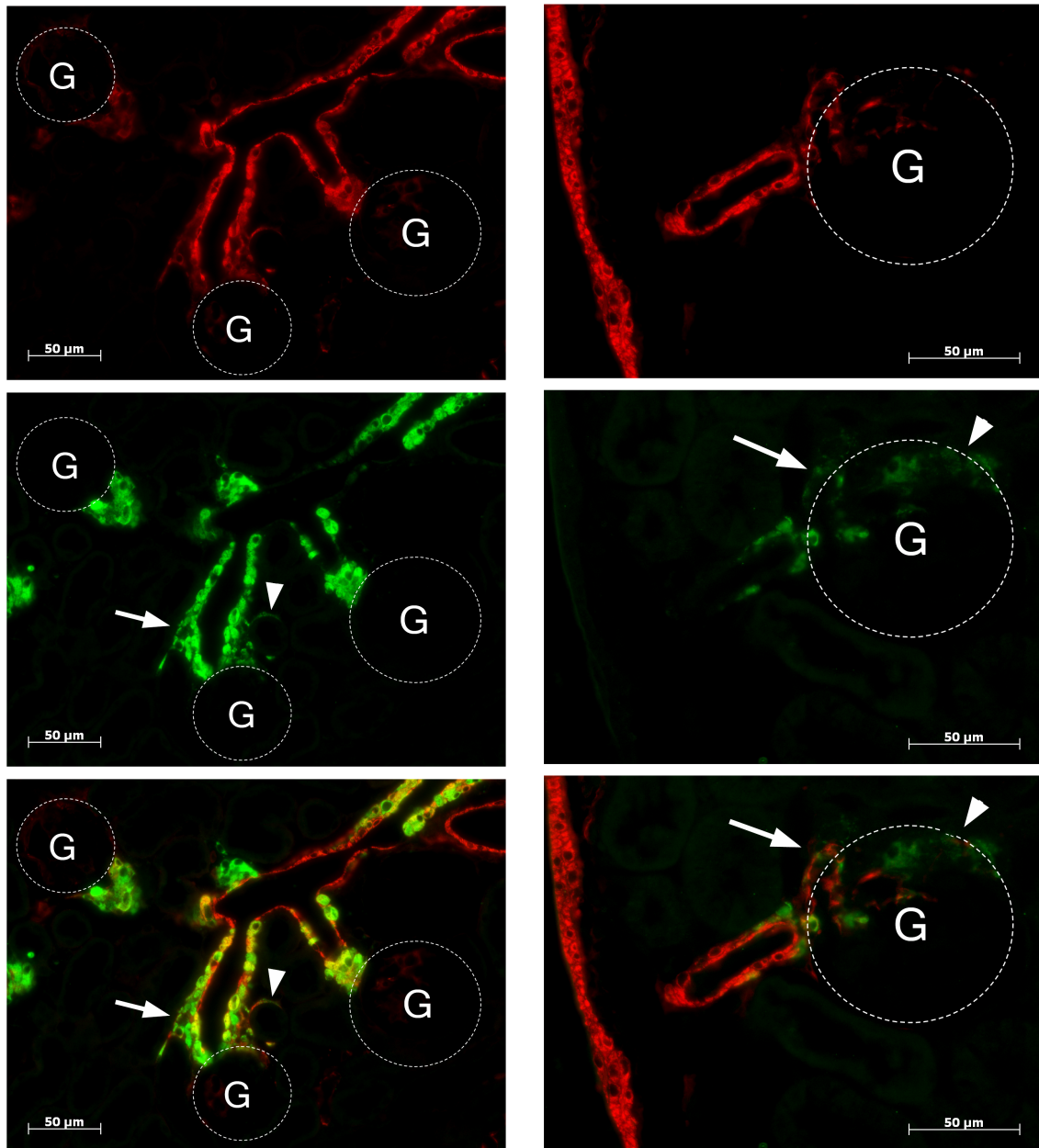


Abbildung 3.26: [Detailansicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [LS]. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün), Kolokalisation beider Immunreaktionen (gelb). G = Glomerulus.

Linke Bilderserie: Pfeilspitze: schmale, längliche Reninzelle. Pfeil: mehrschichtige Anordnung von Reninzellen. 400fache Vergrößerung.

Rechte Bilderserie: Pfeilspitze: diffus verteilte Renin-Fluoreszenzsignale im Glomerulus. Pfeil: Reninvorkommen in der efferenten Arteriole. 630fache Vergrößerung.

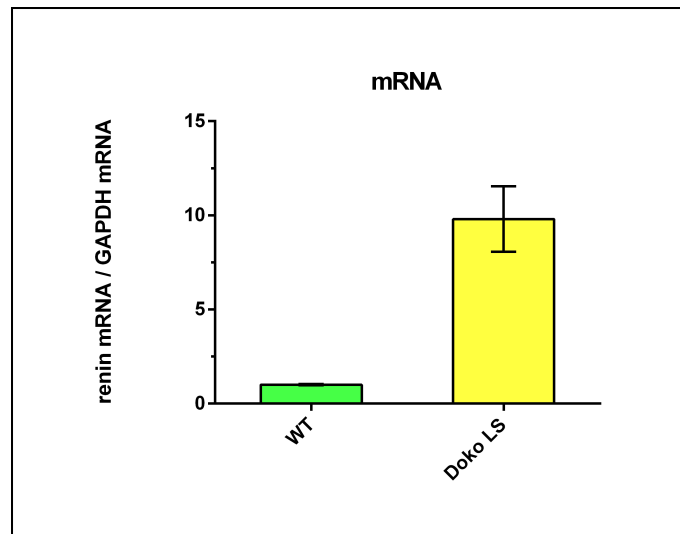


Abbildung 3.27: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Levels des Wildtyps und des AT_{1a} -Cx-40-Knockouts [LS]; Normierung des Wildtyp-Werts auf 1.

Die Reninexpression in der Niere der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus nach 10 Tagen Nierensalzdiät ist im Bezug zur Reninexpression der Wildtyp-Maus massiv erhöht (Abb. 3.27). Hierbei ergibt sich ein Renin-mRNA-Wert für den AT_{1a} -Cx40-DOKO [LS], der um den Faktor 10 gesteigert ist.

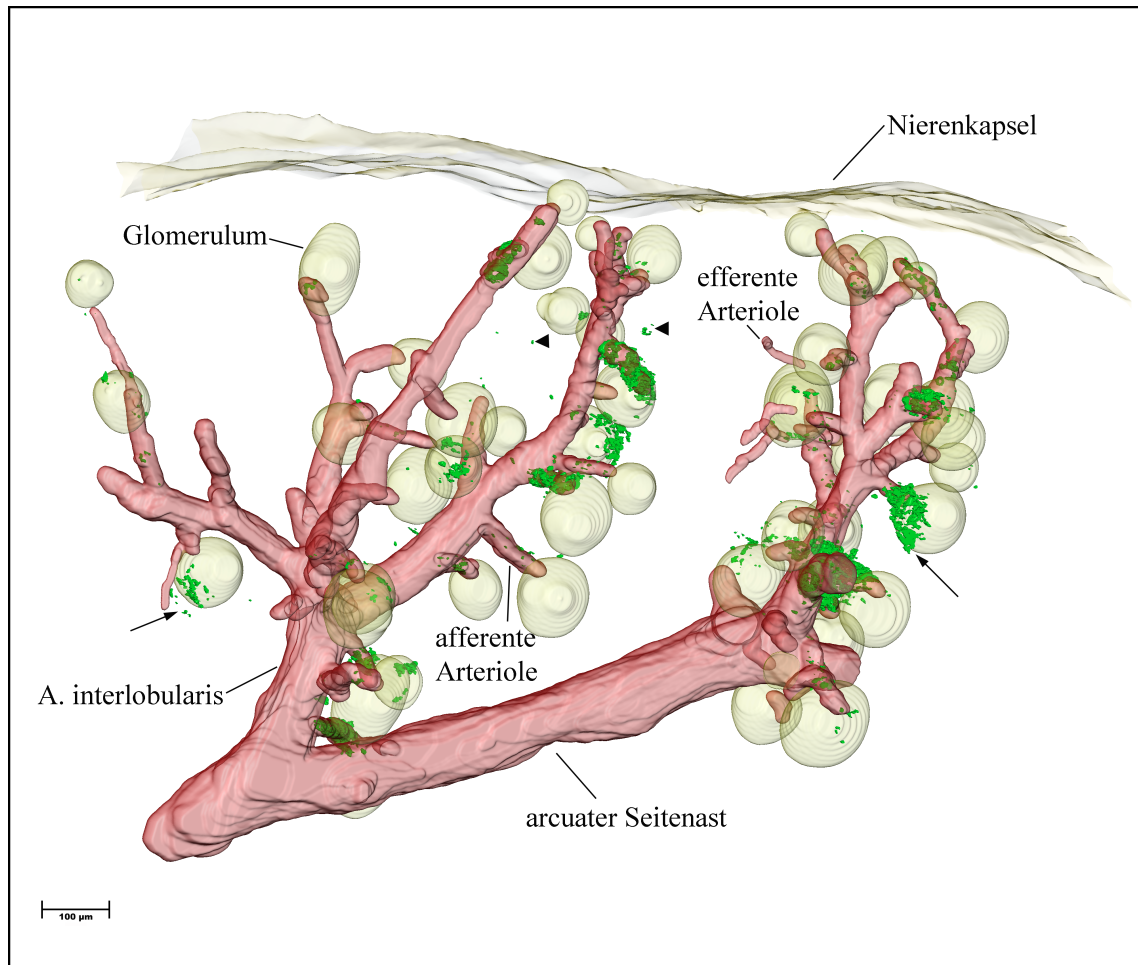
3.1.4.3 Die AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus nach 10d Hochsalzdiät [HS]

Abbildung 3.28: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [HS] mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Pfeile: größere Reninvorkommen an der Bowman'schen Kapsel. Pfeilspitzen: Reninsignale im tubulären Interstitium.

Eine Hochsalzdiät hat beim Wildtyp, vermittelt durch die Macula Densa-Zellen des distalen Tubulus, eine Hemmung der Reninproduktion zur Folge.

Bezüglich des Reninexpressionsmusters der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [HS] lassen sich in der 3D-Rekonstruktion (Abb. 3.28) gravierende Unterschiede zum Wildtyp-Modell feststellen.

Das Expressionsmuster stellt sich äußerst inhomogen dar. Neben afferenten Arteriole, die nur spärlich Renin enthalten, existieren afferente Arteriole, die eine stark erhöhte Reninmenge über nahezu ihren gesamten Verlauf aufweisen.

Auffällig wird bereits im 3D-Modell das Vorhandensein von großen Reninanhäufungen im Bereich der Bowman'schen Kapsel einzelner Glomeruli (Abb. 3.28, Abb.

3.29). Auch im Interstitium ohne jegliche Beziehung zu einem Gefäßast treten Reninsignale auf.

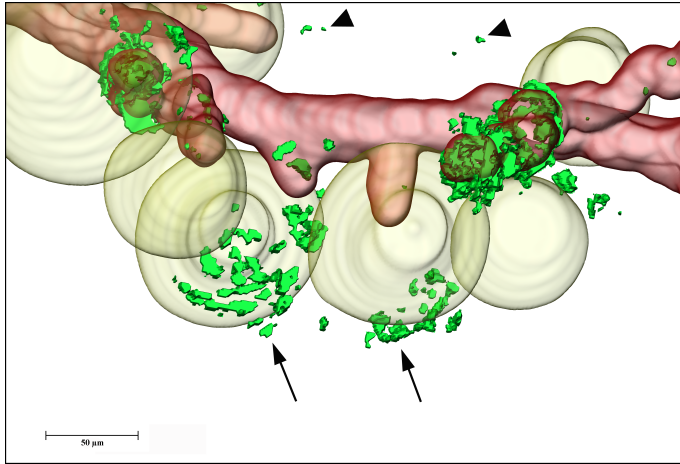


Abbildung 3.29:
[Detailansicht]
3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität afferenter Arteriolen einer AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [HS] mit Glomeruli (gelb). Pfeilspitze: Reninsignale im Interstitium. Pfeile: der Bowman'schen Kapsel angelagerte Reninzellen.

In der Detailaufnahme Abb. 3.31 (linke Bilderserie) ist eine große Reninansammlung zu sehen, die sich von der Bowman'schen Kapsel aus ins umgebende Interstitium erstreckt (siehe Pfeil). Auch entlang der afferenten Arteriole kommt es zur Reninsynthese.

Anstatt der reninegefüllten, kubischen Zellen ergeben sich punktuelle, diffus verteilte Reninsignale. In der rechten Bilderserie ist eine Rekrutierung von Reninzellen entlang der afferenten Arteriole zu erkennen. Ebenfalls auf den Bildern zu sehen sind ektopische Reninvorkommen an efferenten Arteriolen (siehe Pfeil).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus nach zehntägiger Hochsalzbehandlung atypisch lokalisierte Reninzellen zu sehen sind. Die reninbildenden Zellen befinden sich neben ihrer eigentlichen juxtaglomerulären Position der Bowman'schen Kapsel angelagert, in efferenten Arteriolen und Interlobulararterien und disseminiert im Interstitium.

Die Reninmenge ist inhomogen verteilt. Teilweise ist der Renin Gehalt der Reninzellen im Bereich der distalen afferenten Arteriole wie erwartet unter Hochsalzdiät reduziert, jedoch gibt es ebenso afferente Arteriolen, bei denen es zur retrograden Rekrutierung von Reninzellen kommt und die eine stark gesteigerte Reninexpression aufweisen. Auch im Bereich der Bowman'schen Kapsel einzelner Glomeruli befinden sich große Anhäufungen von Renin.

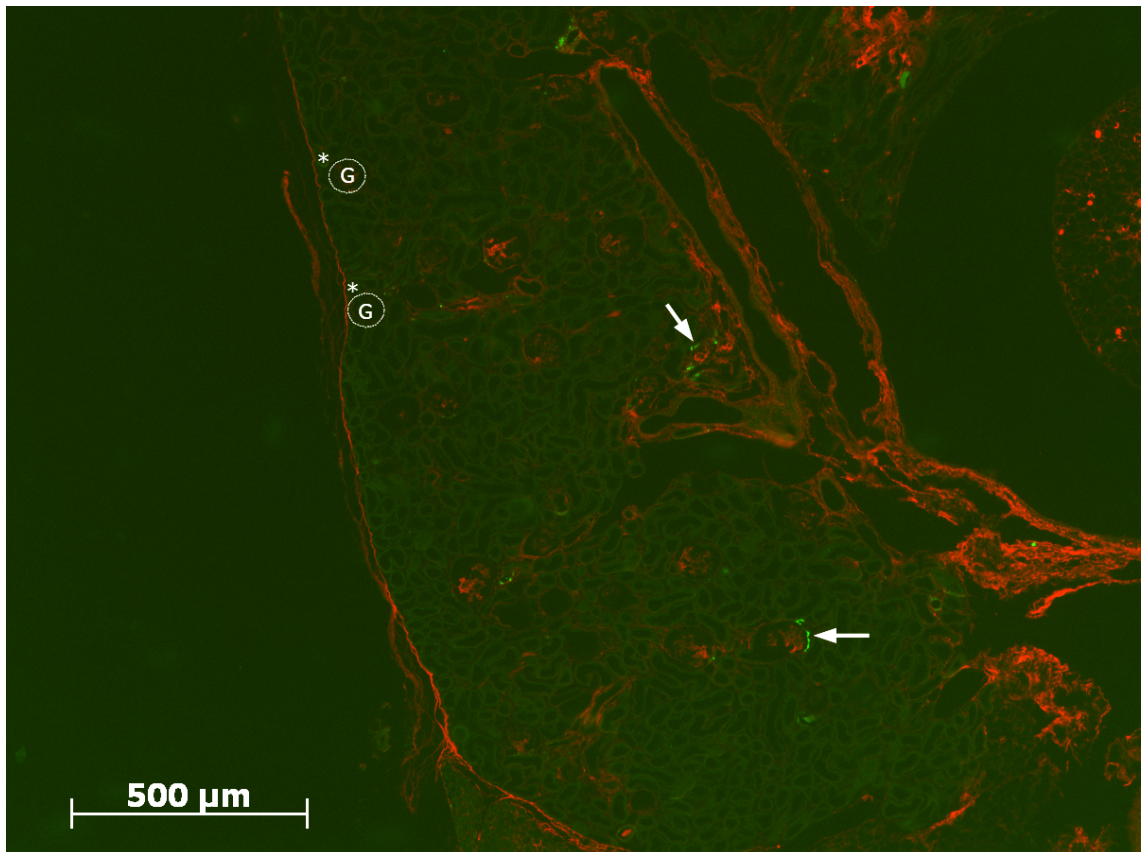


Abbildung 3.30: [Übersicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [HS]. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün). G = Glomerulus. Pfeile = Reninvorkommen im Bereich der Bowman'schen Kapsel. 50fache Vergrößerung.

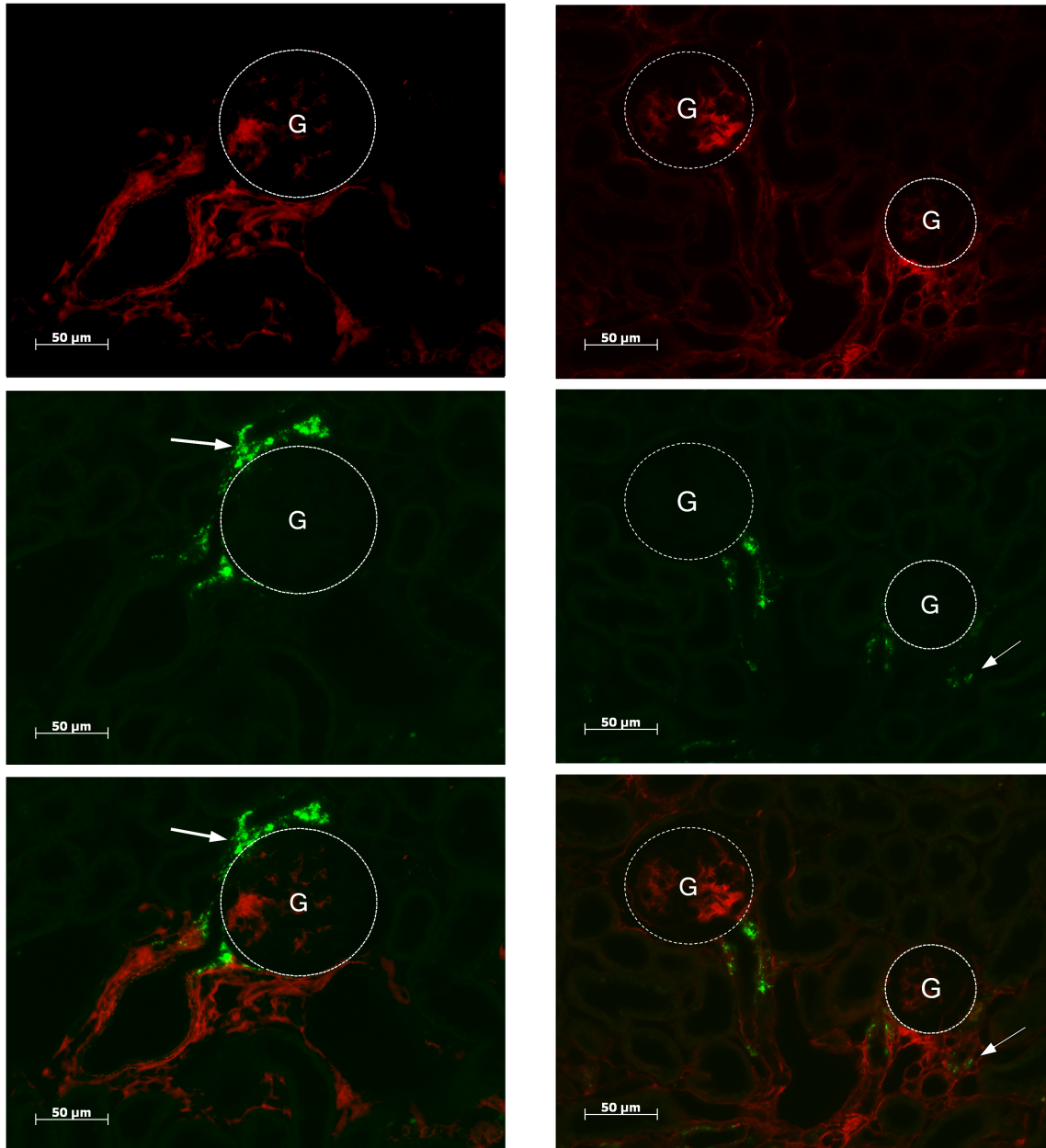


Abbildung 3.31: [Detailansicht] Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [HS]. Glattmuskelaktin Immunreaktionen (rot), Renin Immunreaktionen (grün). G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.
Linke Bilderserie: Pfeil: hohe ektopische Reninexpression im Bereich der Bowman'schen Kapsel.
Rechte Bilderserie: Pfeil: Renin-Fluoreszenzsignale in der efferente Arteriole.

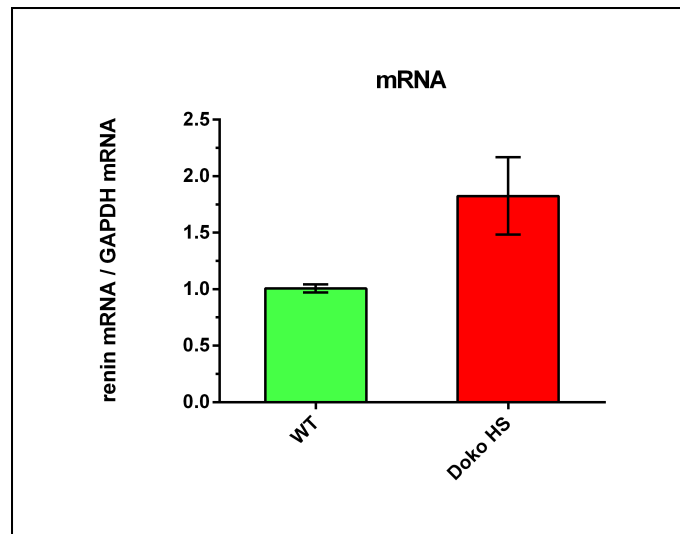


Abbildung 3.32: Graphische Darstellung der Renin-mRNA-Levels des Wildtyps und des AT_{1a} -Cx-40-Knockouts [LS]; Normierung des Wildtyp-Werts auf 1.

Abb. 3.32 zeigt die gesteigerte Reninexpression in der Niere der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus nach zehntägiger Hochsalzdiät. Die Reninexpression ist im Vergleich zum Wildtyp, dessen Wert als 1 definiert wurde, um den Faktor 2 gesteigert.

3.1.5 Quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters

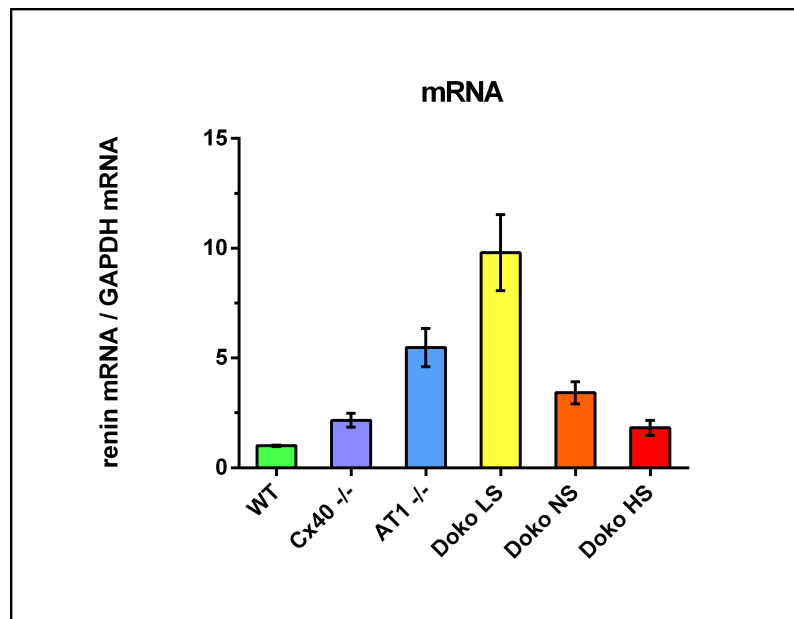


Abbildung 3.33: Graphische Darstellung der Renin-mRNA-Levels in den Nieren aller Versuchstiere; Normierung des Wildtyp-Werts auf den Faktor 1.

In Abb. 3.33 ist die Gegenüberstellung der mittleren Renin-mRNA-Werte der einzelnen Tierstämme zu sehen. Hierbei fällt auf, dass der Cx40-Knockout unter Normalsalzbedingungen zu einer moderaten Erhöhung der Reninexpression führt, wohingegen die AT_{1a} -KO-Maus eine enorm gesteigerte Reninexpression um den Faktor 5 aufzeigt. Die AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus unter Normalsalzbehandlung weist ebenfalls eine erhöhte Reninexpression auf, die zwischen den Werten der Cx40-KO-Maus und der AT_{1a} -KO-Maus liegt, jedoch deutlich geringer als die Reninexpression der AT_{1a} -KO-Maus ausfällt. Die AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus unter Niedrigsalzbehandlung zeigt stark gesteigerte Renin-mRNA-Level. Die AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus unter Hochsalzbehandlung zeigt im Vergleich zur AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus unter Normalsalzbehandlung eine verminderte Reninexpression. Im Vergleich zum Wildtyp ist sie dennoch gesteigert. Die mRNA-Werte zeigen, dass eine Niedrigsalzbehandlung bei der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus zur Stimulation der Reninexpression führt, sowie eine Hochsalzbehandlung bei der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus eine Suppression der Reninexpression zur Folge hat.

3.2 3D-Analyse des renalen arteriellen Gefäßsystems

3.2.1 Die adulte Wildtyp-Maus

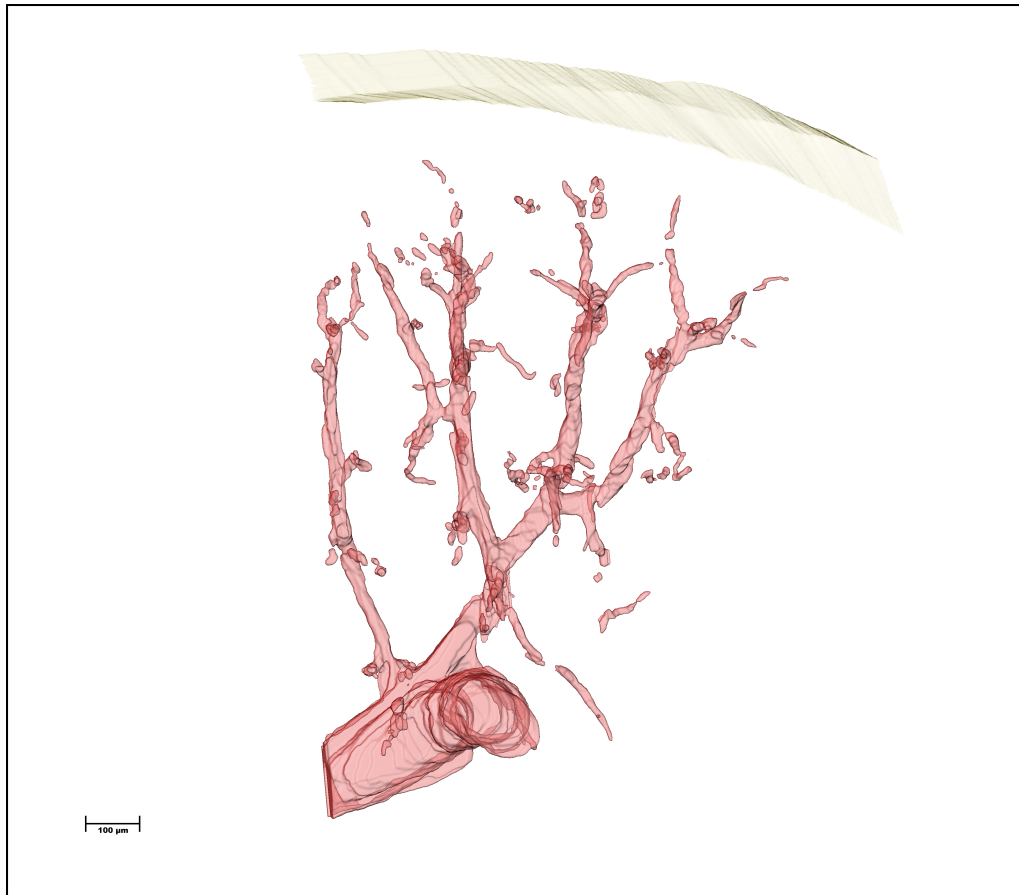


Abbildung 3.34: 3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten, unbehandelten Wildtyp-Maus.

In Abb. 3.34 ist ein arcuater Seitenast mit Interlobulararterien und daraus hervorgehenden afferenten Arteriolen dargestellt. Einige efferente Arteriolen wurden ebenfalls rekonstruiert.

Der rekonstruierte arterielle Gefäßbaum der unstimulierten Wildtyp-Maus dient als Referenz für die nachfolgenden Modelle. Er stellt den physiologischen Normalzustand dar und ist in Form und Verlauf unauffällig. Die Gefäße sind schlank und gleichmäßig geformt. Die äußersten kortikalen afferenten Arteriolen haben einen deutlichen Abstand zur Nierenkapsel.

Um den optischen Eindruck der teilweise abnormen Gefäßmorphologie der folgenden Modelle zu verifizieren, wurden mittels des 3D-Rekonstruktionsprogramms Amira die Modelle des renalen Gefäßsystems der untersuchten Versuchstiere vermessen.

Hierfür wurden die kortikalen afferenten Arteriolen herangezogen, die in ihrer Entwicklungsgeschichte jünger sind als die marknah gelegenen Gefäßabschnitte und deren Länge und Durchmesser erfasst.

Hierbei ergibt sich für die afferenten Arteriolen des Wildtyps eine mittlere Länge von 163 μm und ein mittlerer Durchmesser von 16 μm .

3.2.2 Die adulte AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus

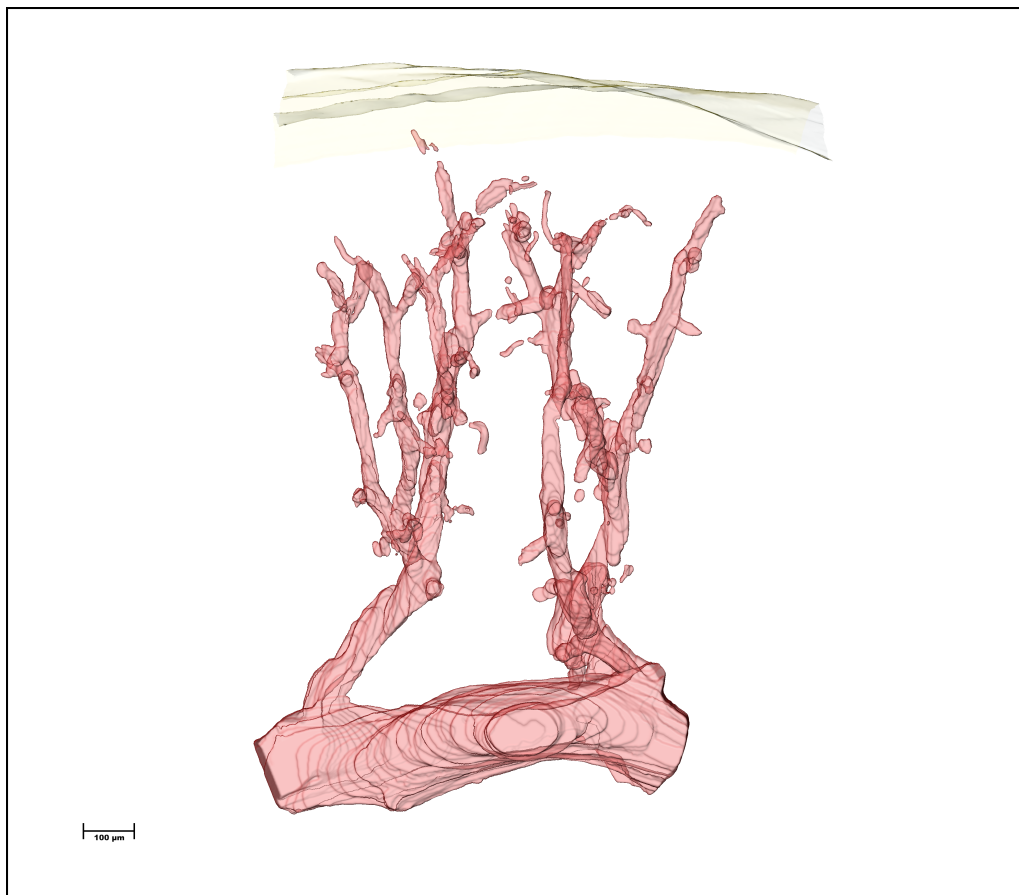


Abbildung 3.35: 3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten, unbehandelten AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus.

Der Gefäßbaum der AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus unter Normalsalzzufuhr hat eine deutlich veränderte Gefäßstruktur im Vergleich zur Wildtyp-Maus.

Die Gefäße der AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus sind verdickt und verkürzt und wirken in ihrem gesamten Verlauf plump und gedrungen. Besonders deutlich wird diese Beobachtung anhand der kurzen, dicken afferenten Arteriolen, die direkt nach dem Abgang aus der A. interlobularis im glomerulären Gefäßpol münden. Hierbei stellen sich die marknahen afferenten Arteriolen deutlich kürzer dar als die kortikalen affe-

renten Arteriolen. Der Abstand zwischen Nierenkapsel und den äußersten afferenten Arteriolen ist im Vergleich zur Wildtyp-Maus reduziert.

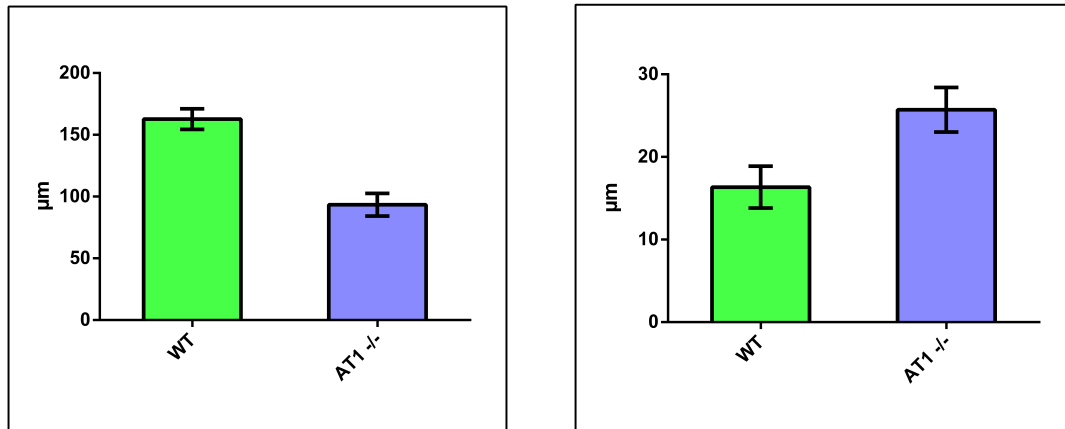


Abbildung 3.36: Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AT_{1a}-Rezeptor-Knockout-Maus.

In der Gegenüberstellung der erfassten Daten der Wildtyp- und AT_{1a}-Rezeptor-Knockout-Maus wird deutlich, dass die afferenten Arteriolen eine reduzierte Gefäßlänge sowie eine Zunahme des Gefäßdurchmessers aufweisen (Abb. 3.36). Die AT_{1a}-Rezeptor-Knockout-Maus besitzt bei einer mittleren Länge von 94 µm um 60 % kürzere afferente Arteriolen und bei einem mittleren Gefäßdurchmesser von 26 µm um 60 % dickere afferente Arteriolen als die Wildtyp-Maus.

3.2.3 Die adulte Cx40-Knockout-Maus

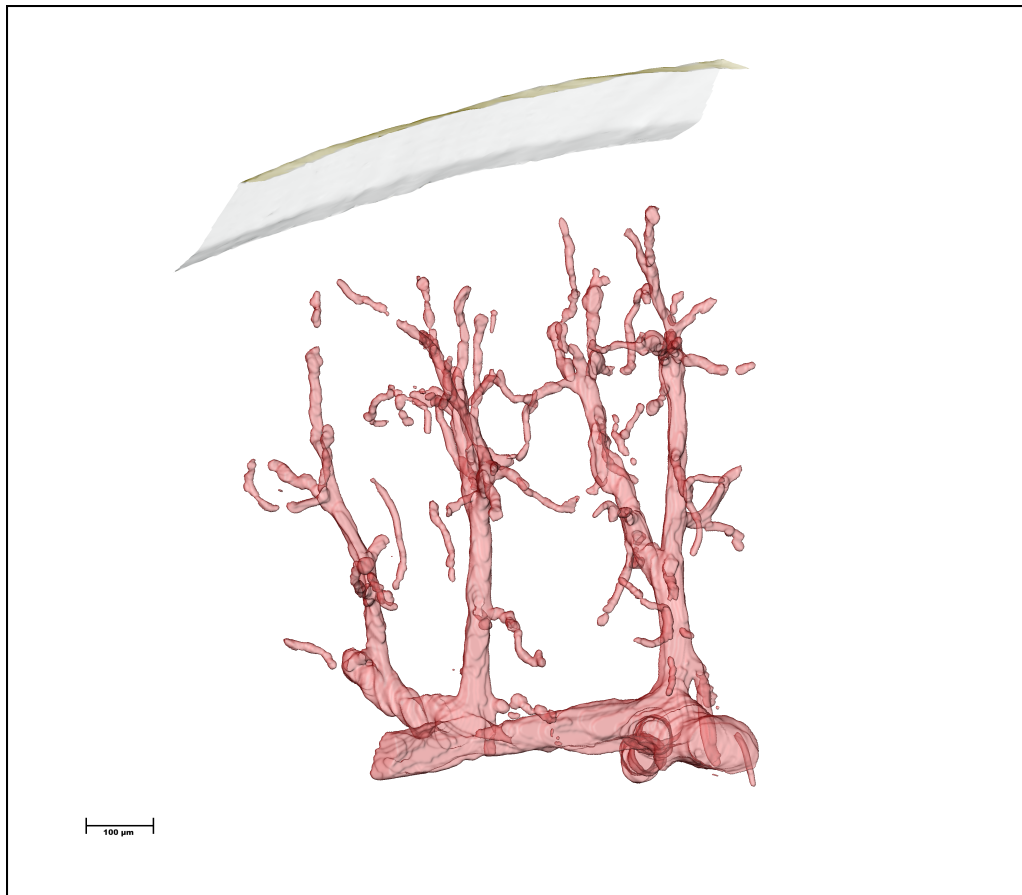


Abbildung 3.37: 3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten, unbehandelten Cx40-Knockout-Maus.

Das Gefäßsystem der Connexin 40-defizienten Maus gleicht dem der Wildtyp-Maus (Abb. 3.37, Abb. 3.34).

Die Gefäße scheinen weder verdickt noch auffällig verkürzt zu sein. Die afferenten Arteriolen haben eine schlanke Form. Der subkapsuläre Bereich zwischen Nierenkapsel und den kortikalen afferenten Arteriolen erscheint nicht verkleinert.

Bei der Vermessung ergeben sich im direkten Vergleich zur Wildtyp-Maus nur geringfügige gefäßmorphologische Veränderungen (Abb. 3.38). Die afferenten Arteriolen der Cx40-Knockout-Maus sind mit einer durchschnittlichen Länge von 125 µm und einem durchschnittlichen Durchmesser von 13 µm etwas kürzer und schmaler als die des Wildtyps. Dies entspricht der 0,8fachen Länge und dem 0,8fachen Durchmesser der Wildtyp-Maus.

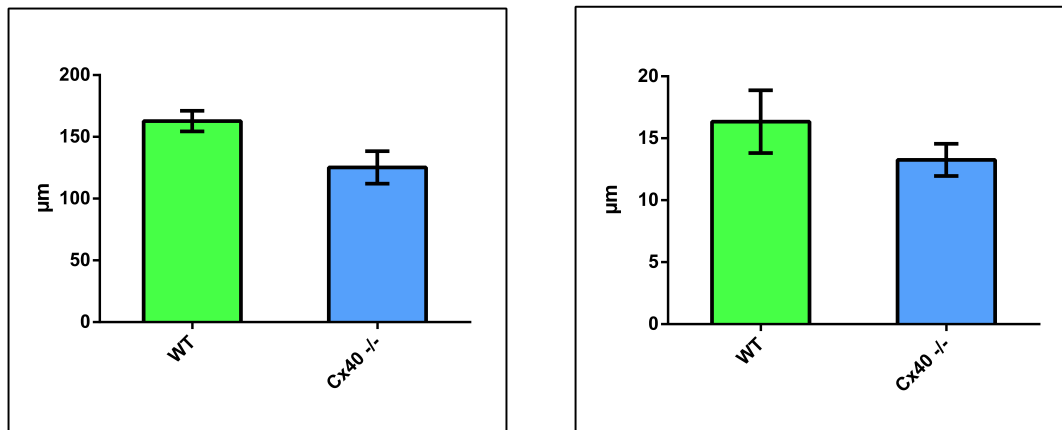


Abbildung 3.38: Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der Cx40-Knockout-Maus.

3.2.4 Die adulte AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus

Die Gefäßbäume der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Wildtyp-Maus (Abb. 3.39, Abb. 3.41, Abb. 3.43, Abb. 3.34). Die Gefäße sind deutlich kräftiger und kürzer ausgebildet. Die afferenten Arteriolen haben einen stark verkürzten Verlauf und ebenfalls an Umfang zugenommen. Der gesamte Gefäßbaum erscheint plump und gedungen.

Der Abstand zwischen Nierenkapsel und den kortikalen afferenten Arteriolen ist merklich reduziert. Hierbei reicht der Gefäßbaum mit seinen Vasa afferentia bis knapp unter die Nierenkapsel.

Sämtliche Beobachtungen sind unabhängig von der Diät in unterschiedlicher Ausprägung sowohl bei der repräsentativ gewählten AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus unter Normsalzbehandlung (Abb. 3.39), unter Niedrigsalzbehandlung (Abb. 3.41), wie auch unter Hochsalzbehandlung (Abb. 3.43) zu erkennen.

Die afferenten Arteriolen der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [NS] weisen im Durchschnitt eine Länge von 100 µm und eine Breite von 23 µm auf und sind somit um 60 % kürzer und um 40 % dicker als der Wildtyp mit 162 µm Länge und 16 µm Durchmesser.

Ähnlich verhält es sich mit den afferenten Arteriolen der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [LS] bei einer mittleren Länge von 90 µm und einer mittleren Breite von 25 µm.

Die Gefäße der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [HS] besitzen eine durchschnittliche Länge von 86 µm und Breite von 31 µm.

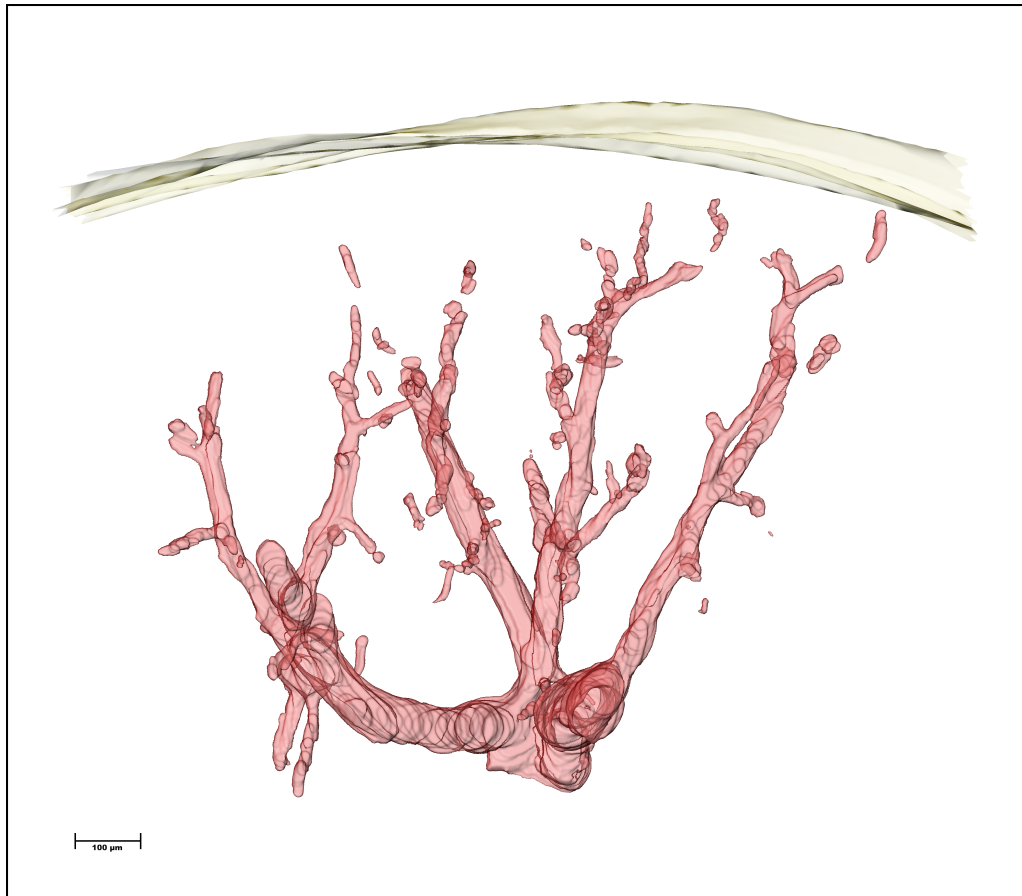


Abbildung 3.39: 3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten, unbehandelten AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus.

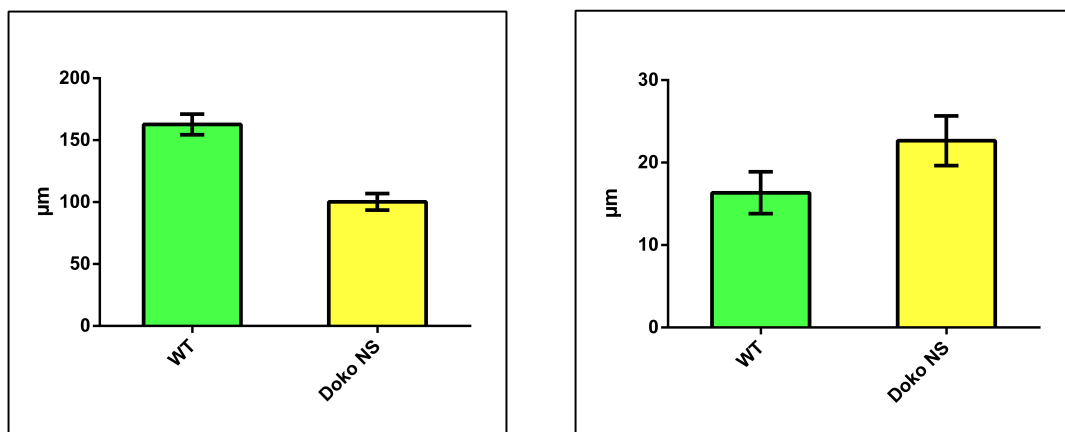


Abbildung 3.40: Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus [NS].

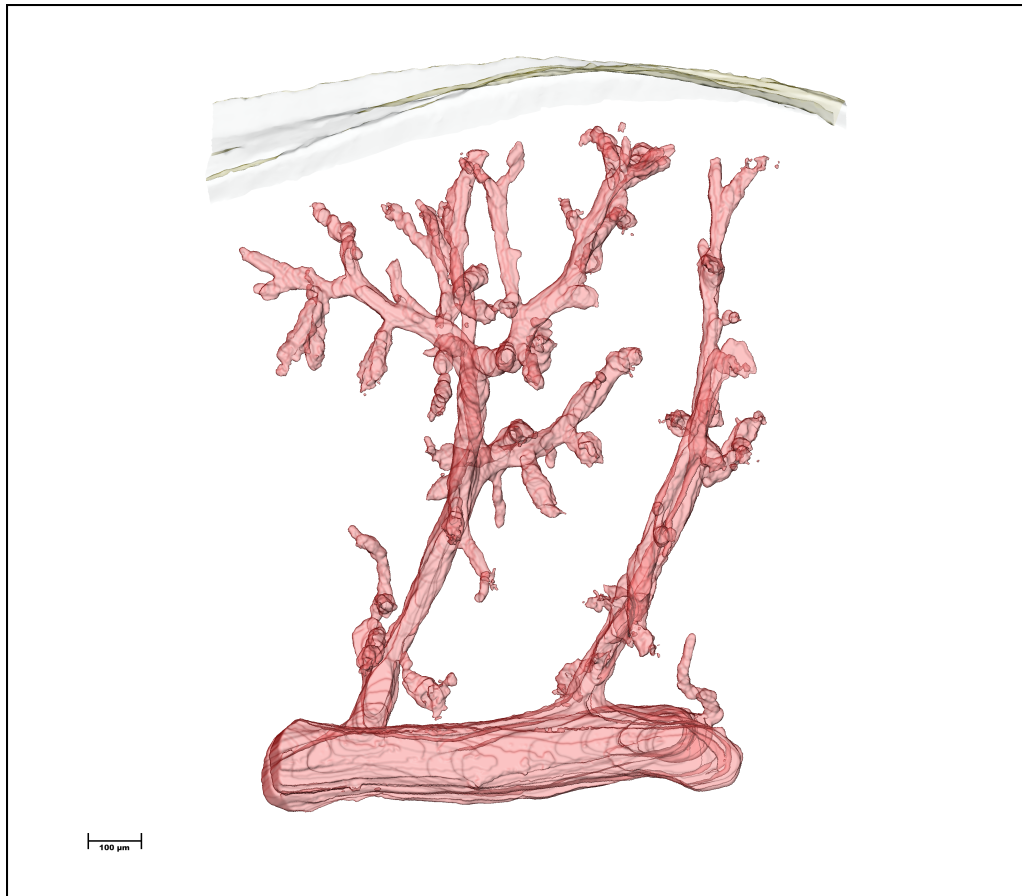


Abbildung 3.41: 3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus nach 10d Niedrigsalzdiät.

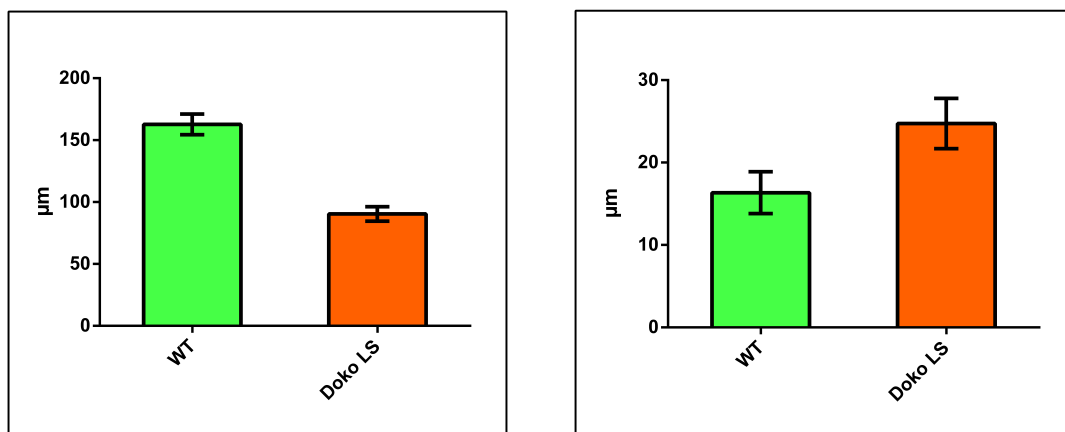


Abbildung 3.42: Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [LS].

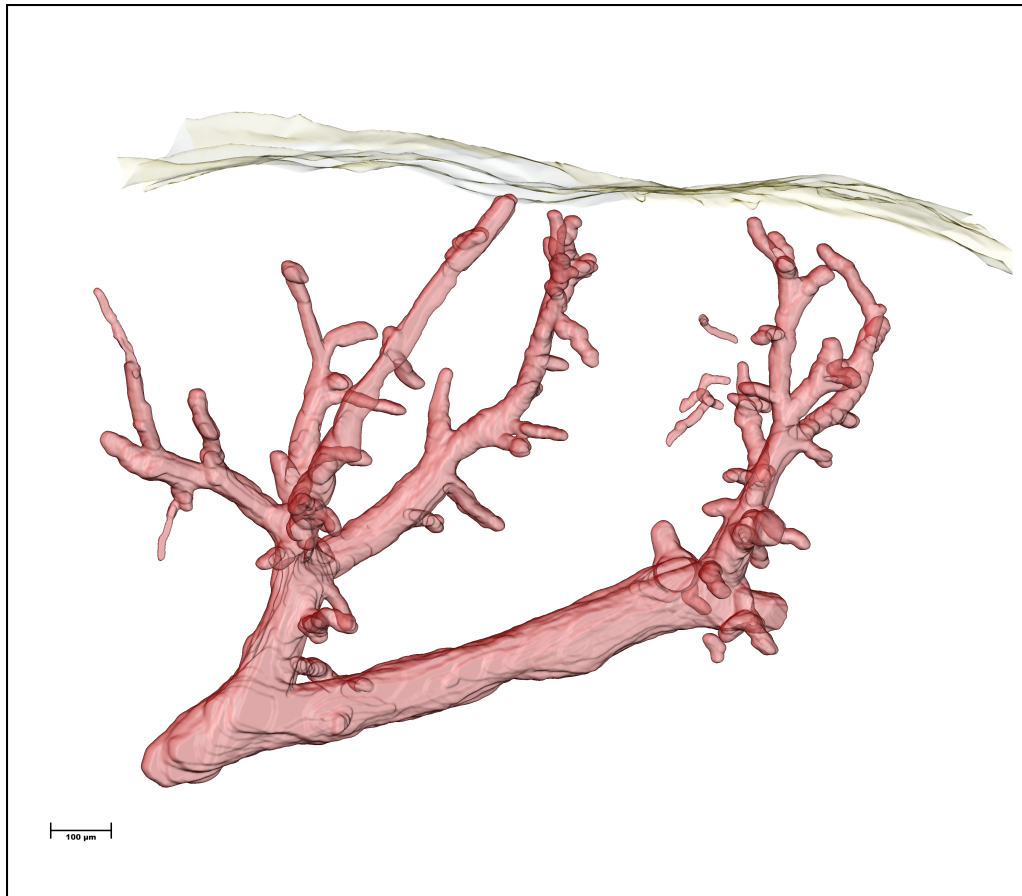


Abbildung 3.43: 3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus nach 10d Hochsalzdiät.

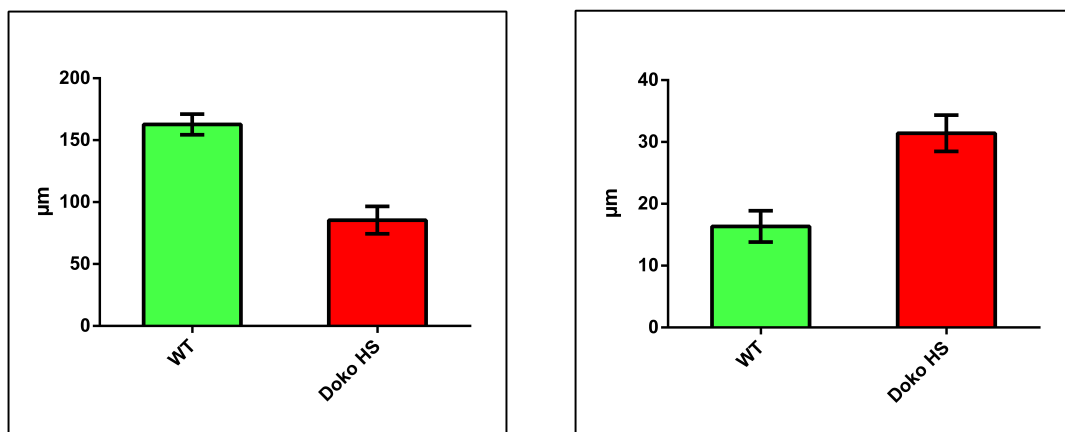


Abbildung 3.44: Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [HS].

3.2.5 Vergleichende Analyse des renalen arteriellen Gefäßsystems

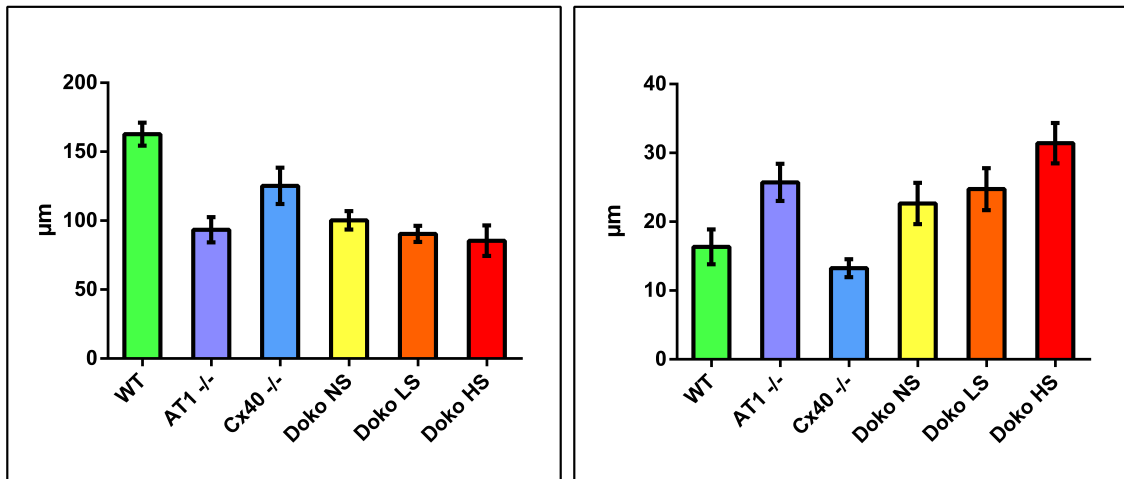


Abbildung 3.45: Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen aller untersuchter Versuchstiere.

In Abb. 3.45 ist die zusammenfassende Gegenüberstellung der Ausmessungen der afferenten Arteriolen aller untersuchten Versuchstiere zu sehen. Hierbei fällt auf, dass die afferenten Arteriolen des Cx40-Knockouts die geringsten Unterschiede zur Wildtyp-Maus aufweisen. Dies unterstützt den optisch unauffälligen Eindruck des Gefäßbaumausschnitts Abb. 3.37 im Vergleich zur Wildtyp-Maus Abb. 3.34.

Eine große Diskrepanz besteht jedoch zwischen den Werten der AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus und der Wildtyp-Maus. Die afferenten Arteriolen sind deutlich dicker und kürzer.

Die Ausmessungen der afferenten Arteriolen der AT_{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus kongruieren mit den Werten der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus. Es zeigt sich ebenfalls eine auffällige Abnahme der Gefäßlänge und eine deutliche Zunahme des Gefäßdurchmessers.

Kapitel 4

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Maus mit deletierten AT_{1a} -Rezeptoren mit einer Maus mit deletierten Cx40-Gap Junctions verpaart. Beide Knockouts haben charakteristische Veränderungen im Reninexpressionsmuster der Niere zur Folge. Untersucht wurden sowohl die Wildtyp-Maus, wie auch die einzelnen Knockout-Mäuse und die Doppel-Knockout-Mäuse. Die AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus steht im Zentrum dieser Arbeit. Hierbei sollen die genotypischen Veränderungen der AT_{1a} -KO-Maus und der Cx40-KO-Maus reproduziert und um die Erkenntnisse des AT_{1a} -Cx40-DOKOs erweitert werden. In diesem Zusammenhang wurden die AT_{1a} -Cx40-DOKO-Tiere unter Normalsalzdiät, nach zehntägiger Stimulation des RAAS unter Niedrigsalzdiät und nach zehntägiger Hemmung des RAAS unter Hochsalzdiät, untersucht. Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere besitzen das gleiche Alter, sodass vorhandene Unterschiede nicht den altersphysiologischen Veränderungen zuzuschreiben sind. Nach den Vergleichsstudien zu den Reninexpressionsmustern soll des Weiteren auf die Gefäßbaumstruktur der rekonstruierten 3D-Modelle eingegangen werden.

4.1 Vergleichende Analyse des Reninexpressionsmusters der rekonstruierten Modelle

4.1.1 Die adulte Wildtyp-Maus

Bei dem rekonstruierten 3D-Modell der Reninexpression der Wildtyp-Maus handelt es sich um die normale, physiologische Reninexpression, wie sie in einer gesunden Niere stattfindet. Hierbei sind die Reninzellen an der typischen juxtaglomerulären Position am glomerulären Gefäßpol lokalisiert. Weder in den arcuaten Seitenästen und den Interlobulararterien noch in den efferenten Arteriolen sind Reninzellen vorzufinden. Dies entspricht den bisherigen Erfahrungen bezüglich der normalen Reninzellverteilung (Barajas, 1979; Taugner et al., 1984).

4.1.2 Die adulte AT_{1a} -KO-Maus

Angiotensin II (ANG II) bindet an den AT_{1a} -Rezeptor und übt über einen negativen Feedback-Mechanismus eine hemmende Wirkung auf das RAAS aus (Hackenthal et al., 1990). Ein Knockout des AT_{1a} -Rezeptors hat somit den Wegfall eines hemmenden Mediators des RAAS und eine gesteigerte Reninexpression und -synthese zur Folge. Die genauen Regulationswege, in denen der AT_{1a} -Rezeptor offensichtlich eine Rolle spielt, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Durch den Verlust des AT_{1a} -Rezeptors werden des Weiteren die vasokonstriktorische Effekte, die durch ANG II moduliert werden, unterbunden.

Bei der AT_{1a} -KO-Maus zeigt sich daher eine stark gesteigerte Reninexpression und eine für diesen Genotyp charakteristische retrograde Rekrutierung von reninbildenden Zellen entlang der Gefäße. Hierbei erstreckt sich das Reninzellvorkommen vom glomerulären Gefäßpol aus über die afferenten Arteriolen bis hin zu verteilten, geringeren Reninzellvorkommen in den Interlobulararterien. Die efferenten Arteriolen hingegen sind reninfrei. Eine Besonderheit stellt die mehrschichtige Reninzellanordnung dar mit rekrutierten reninbildenden Zellen, die der Gefäßwand aufsitzen. Diese Beobachtungen entsprechen den bisherigen Forschungsergebnissen zur Reninexpression der AT_{1a} -KO-Maus (Machura et al., 2009; Oliviero et al., 1998; Sugaya et al., 1995) und konnten in dieser Arbeit erneut reproduziert und bestätigt werden. Weitere Untersuchungen an AT_{1a} -KO-Mäusen, die zur Stimulation des RAAS über 10 Tage auf Nidrigsalszbehandlung gesetzt wurden, ergaben eine enorm gesteigerte Reninsynthese mit einem um den Faktor 20 erhöhten mRNA-Level, die sich über die gesamte Länge der afferenten Arteriolen und Interlobulararterien bis hin zu den arcuaten Seitenästen erstreckte (Machura et al., 2009).

4.1.3 Die adulte Cx40-KO-Maus

Cx40 ist ein essentielles Strukturprotein der Gap Junctions, die die interzelluläre Kommunikation der Reninzellen ermöglichen. Ein Verlust des Cx40-Proteins hat Störungen des RAAS und eine Fehlpositionierung von Reninzellen zur Folge.

Die Frage, ob das Fehlen von Cx40 generell eine Lokalisation von Reninzellen in der inneren Mediaschicht verhindert, muss verneint werden (siehe Abb.3.13). Neben der normalen juxtaglomerulären Reninexpression kommt es bei der Cx40-defizienten Maus zu ektopischen Reninzellvorkommen im extraglomerulären Mesangium, im Bereich der Bowman'schen Kapsel, im Glomerulus und im Bereich der efferenten Arteriolen (Kurtz et al., 2007, 2009; Hwan et al., 2000, Wagner et al., 2010). Das Phänomen der Dislokation der Reninzellen nimmt mit dem Alter des Individuums zu, ebenso erhöht sich die Reninexpression und Reninsynthese. Die ektopischen Reninzellen sind unterschiedlicher Form und Gestalt, so findet man neben der typisch kubischen Reninzelle atypische, fibroblastenähnliche Reninzellen wie auch diffuse Reninzellsignale, die keiner genaueren Zellstruktur zuzuordnen sind. Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungsergebnissen von Kurtz et al. (2009) überein. Ebenso wurden vereinzelt Reninzellen gefunden, die mehrschichtig der Gefäßwand aufsitzen. In den Interlobulararterien und arcuaten Seitenästen wurden keine Reninsignale registriert. Eine weitere Auffälligkeit, die bereits von Kurtz et al. (2009) beschrieben wurde, ist das heterogene Reninexpressionsmuster. So existieren neben afferenten Arteriolen, die eine hohe Reninexpression aufweisen, auch afferente Arteriolen ohne Reninexpression.

Cx40-Knockout-Mäuse können nicht in adäquater Art und Weise über physiologische Feedbackmechanismen auf Änderungen des Blutdrucks und ANG II-Spiegels reagieren. Untersuchungen an Cx40-defizienten Mäusen ergaben, dass die Signalwege zur Rekrutierung von Reninzellen bei der Cx40-Knockout-Maus gestört sind. So kommt es trotz intensiver Stimulation des RAAS bei der Cx40-KO-Maus zu keiner retrograden Rekrutierung von Reninzellen entlang der Gefäße (Kurtz et al., 2007, 2009).

Die bisherigen Forschungsergebnisse lassen den Schluss zu, dass die korrekte Zell-Zell-Kommunikation mittels Gap Junctions unabdingbar für die korrekte Positionierung und die Rekrutierung von Reninzellen ist (Kurtz et al. 2007). Cx40 spielt hierbei eine entscheidende Rolle für die Funktionalität der Gap Junctions und die interzelluläre Kommunikation von Reninzellen. Untersuchungen an Knockout-Knockin-Modellen ergaben, dass Cx40 nicht ohne Funktionsminderung durch andere Connexine wie Cx45 ersetzt werden kann (Schweda et al., 2009; Wölflé et al., 2007).

4.1.4 Die adulte AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus

Die AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus vereint zwei Knockouts, die beide Auswirkungen auf das Reninexpressionsmuster in der Niere haben. Die Untersuchungen erfolgten unter der Frage, welche knockoutspezifischen Charakteristika weitervererbt werden und welchen Einfluss die Kombination beider Knockouts auf die Reninexpression hat. Hierbei zeigt sich, dass sämtliche Charakteristika des AT_{1a}-Knockouts wie auch des Cx40-Knockouts weitervererbt werden. Der Tierstamm des AT_{1a}-Cx40-DOKOs stellt jedoch eine äußerst heterogene Gruppe dar. So wurden die beschriebenen Veränderungen bei sämtlichen untersuchten Tieren vorgefunden, jedoch in sehr unterschiedlicher Ausprägung.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Reninexpression der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 3 erhöht ist. Sowohl bei der Cx40-KO-Maus mit dem 2fachen mRNA-Level, wie auch bei der AT_{1a}-KO-Maus mit dem 5fachen mRNA-Level ist zu sehen, dass die Reninexpression im Vergleich zum Wildtyp gesteigert ist. Die mRNA-Werte der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus liegen somit zwischen den mRNA-Werten der Einzelknockouts.

Die reninbildenden Zellen in der Niere der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus befinden sich neben ihrer juxtaglomerulären Position ektopisch lokalisiert im extraglomerulären Mesangium, im Bereich von efferenten Arteriolen und der Bowman'schen Kapsel, im Glomerulus und im Interstitium. Die ektopischen Reninvorkommen sind ein typisches Charakteristikum für die Cx40-KO-Maus und sind somit dem Cx40-Knockout zuzuordnen (Hwan et al., 2000; Kurtz et al., 2007, 2009; Wagner and Kurtz, 2012). Auch hier ist festzuhalten, dass ein Fehlen von Cx40 eine korrekte Positionierung von Reninzellen in der inneren Mediaschicht afferenter Arteriolen nicht ausschließt. Viel eher existiert eine Kombination von typisch und atypisch lokalisierten Reninzellen, die besonders deutlich bei mehrschichtigen Gefäßen wird (siehe Abb. 3.25). Hierbei ist zu sehen, dass neben den korrekt positionierten Reninzellen, die die innere Gefäßwand bilden, zusätzlich ektopische Reninzellen vorhanden sind, die sich außerhalb der Gefäßwand befinden.

Überdies wurden atypisch lokalisierte, atypisch geformte Reninzellen gefunden, die bereits im Zusammenhang mit dem Cx40-Knockout beschrieben wurden (Kurtz et al., 2009). Diese reninbildenden Zellen unterscheiden sich in ihrer Form von der typisch kubischen Gestalt der Reninzelle und stellen sich schmal und länglich dar. Diese speziellen, fibroblastenähnlichen Reninzellen wurden bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus auf efferenten Arteriolen und der Bowman'schen Kapsel aufsitzend vorgefunden.

Auffällig bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus ist die inhomogene Reninexpression, wie sie auch bereits bei dem Cx40-Knockout beschrieben wurde (Kurtz et al., 2009). Neben afferenten Arteriolen, die eine deutlich gesteigerte Reninexpression aufweisen, existieren afferente Arteriolen, in deren Verlauf keine Reninexpression nachzuweisen ist.

Eine weitere Besonderheit der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus ist die mehrschichtige Reninzellanordnung, wie sie auch bei der AT_{1a}-KO-Maus zu finden ist. Insgesamt zeigt sich bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus eine gesteigerte Reninexpression, die jedoch nicht an das Niveau der AT_{1a}-Knockout-Maus heranreicht.

Des Weiteren lassen sich unabhängig von der Behandlung rekrutierte Reninzellen in afferenten Arteriolen und Interlobulararterien finden. Die ausgeprägte Rekrutierung von Reninzellen ist ein Charakteristikum des AT_{1a}-Knockouts (Machura et al., 2009). Beachtenswert ist, dass trotz des Cx40-Knockouts bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus eine Rekrutierung von Reninzellen erfolgt. Kurtz et al. bezeichneten das Cx40-Protein als essentiell für die retrograde Rekrutierung in der Niere der adulten Maus, jedoch nicht in der fetalen Niere. Eine mögliche Erklärung für die Rekrutierung im Falle der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus kann sein, dass es während es sich bei den Versuchen mit Cx40-Knockout-Mäusen um adulte Tiere handelte, de-

ren RAAS mittels Nidrigsalzdiät stimuliert wurde, der AT_{1a} -Rezeptor-Knockout bereits im entstehenden Organismus manifest wird und die Stimulation des RAAS bereits in der fetalen Niere erfolgt. Dies kann möglicherweise zur Folge haben, dass ein Switch von der reninbildenden Zelle hin zur Glattmuskelzelle durch die stete Stimulation des RAAS ausbleibt und die Fähigkeit zur Reninsynthese erhalten bleibt.

Wie man anhand der 3D-Modelle und der quantitativen Analyse des Reninexpressionsmusters sieht, ist bei der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus im Gegensatz zur Cx40-Knockout-Maus eine Anpassung der Reninsynthese auf äußere Stimuli möglich. Die AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus reagiert auf äußere Einflüsse, die in dieser Arbeit durch eine Hochsalz-, bzw. Nidrigsalzdiät nachempfunden wurden, mit einer Anpassung der Reninexpression. Die Salzabhängigkeit des RAAS ist im AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus somit prinzipiell erhalten. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass in der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus weitere Cx40-unabhängige Signalwege vorhanden sind, die eine adäquate Anpassung des Organismus ermöglichen.

Die AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus zeigt nach zehntägiger Nidrigsalzbehandlung eine 10-fach gesteigerte Reninexpression. Im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen an AT_{1a} -KO-Mäusen unter Nidrigsalzdiät, die eine 20fach gesteigerte Reninexpression aufweisen, fällt die Rekrutierung jedoch deutlich geringer aus. Die Abschwächung der Salzabhängigkeit der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus im Vergleich zur AT_{1a} -KO-Maus kann durch das Fehlen von Cx40 begründet sein. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass weitere Einflussfaktoren existieren, die die geringer ausfallende Rekrutierung bewirken. Denkbar wäre eine Einflussnahme auf die Reninsynthese durch den Blutdruck, der bereits als ein wichtiger Regulator der Rekrutierung von Reninzellen beschrieben ist (Hackenthal et al., 1990; Schweda et al., 2005). Diese Frage und die Einflussnahme weiterer denkbarer indirekter Modulatoren des Reninsystems in der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus gilt es in weiteren Untersuchungen zu ergründen.

Eine Hochsalzdiät hat, vermittelt durch die Macula Densa-Zellen des juxtaglomerulären Apparates, eine Hemmung des RAAS zur Folge und resultiert in einer verminderten Reninexpression. Dies zeigt sich bei der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus durch einen Abfall der mRNA-Werte vom 3fachen mRNA-Level bei Normalsalzbehandlung auf den 2fachen mRNA-Level bei Hochsalzbehandlung. Diese Werte zeigen, dass durch die Hochsalzbehandlung ausgelöste regulatorische Prozesse die Reninsynthese downregulieren, die Reninexpression der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus trotz Hochsalzbehandlung jedoch doppelt so hoch ist wie bei der Wildtyp-Maus.

Auffallend häufig treten bei der AT_{1a} -Cx40-DOKO-Maus unter Hochsalzbehandlung pathologischen Nierenveränderungen auf. Es kommt zu Sklerosierungen im Gefäß- und Tubulussystem und zu Zystenbildung. Als Folge dieser degenerativen Veränderungen kommt es schließlich zum Untergang des Glomerulus und des dem Nephron nachgeschalteten Tubulussystems. Dies führt zur Atrophie des Nierenparenchyms. Zu sehen sind diese Veränderungen in der histologischen Übersichtsaufnahme Abb. 3.30, die einen pathologisch veränderten Nierenausschnitt zeigt. Durch Sklerosierung kommt es zu zahlreichen Immunfluoreszenzsignalen in den Glomeruli. Einzelne Glomeruli sind bereits degenerativ verändert. Die Durchmesser der Glomeruli sind

bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus unter Hochsalzdiät auffällig variabel. Neben äußerst kleinen Glomeruli existieren Glomeruli, die eine überdurchschnittliche Größe aufweisen. Eine weitere Auffälligkeit ist der deutlich reduzierte Abstand zur Nierenkapsel (siehe * Abb. 3.30).

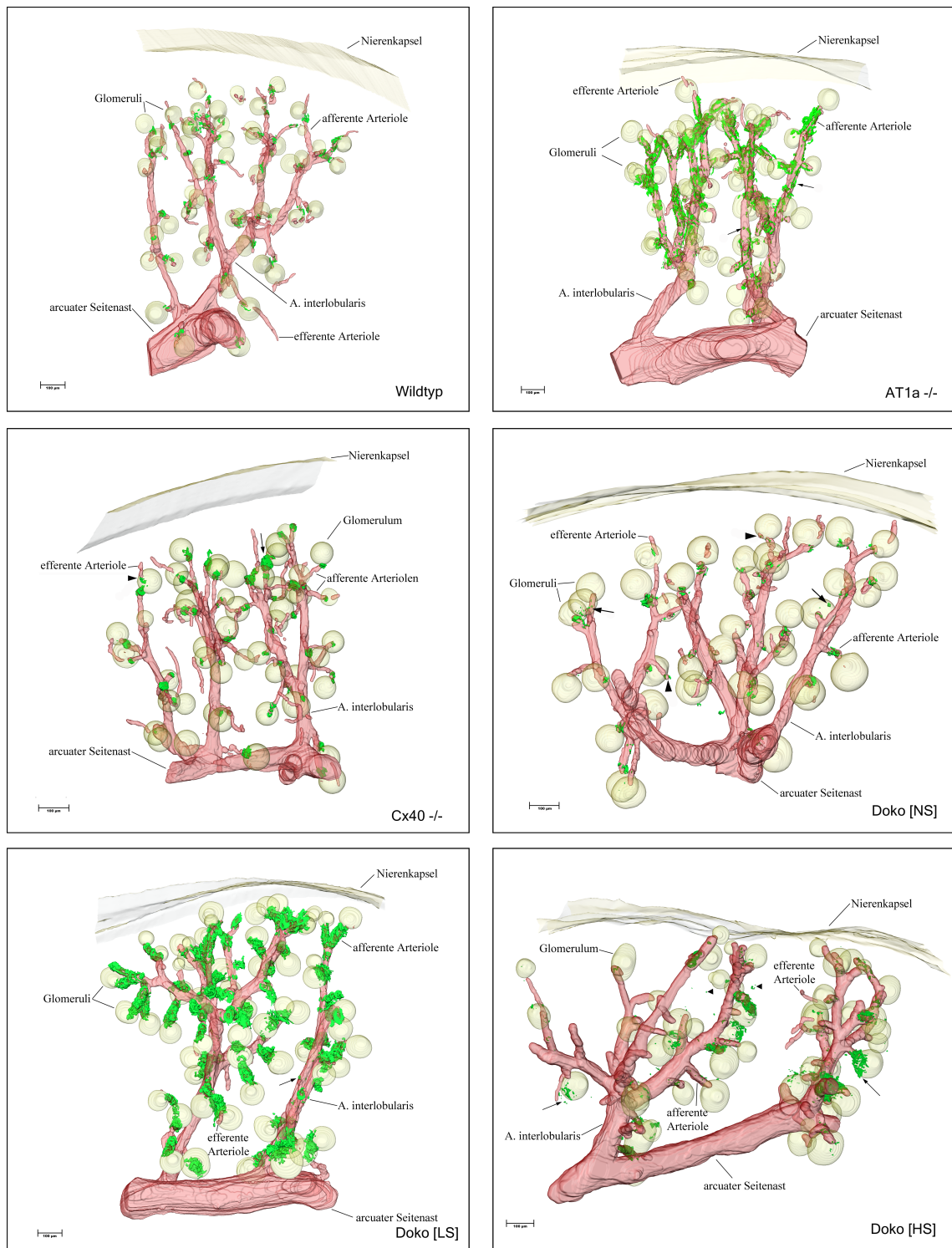


Abbildung 4.1: Gegenüberstellung der 3D-Rekonstruktionen der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität mit Glomeruli und Nierenkapsel (gelb) aller untersuchten Tierstämme. Angaben zum jeweiligen Tierstamm und erfolgter Behandlung im rechten unteren Bereich der Abbildung.

4.2 Vergleichende Analyse der rekonstruierten Gefäßbäume

Die anatomischen Gegebenheiten sind bei sämtlichen untersuchten Gefäßbäumen identisch (siehe Abb. 4.2). So entspringt aus der A. renalis die A. arcuata, hieraus gehen die arcuaten Seitenäste hervor, die wiederum die Arteriae interlobulares abgeben. Aus den Interlobulararterien gehen schließlich in unregelmäßigen Abständen die afferenten Arteriolen hervor (Sauter et al., 2008).

4.2.1 Die adulte Wildtyp-Maus

Der rekonstruierte Gefäßbaum der Wildtyp-Maus stellt den anatomisch-physiologischen Normalzustand dar und dient als Referenz für die weiteren Modelle. Die Gefäße sind schlank und homogen geformt in ihrem Verlauf. Der Gefäßbaum ist übereinstimmend mit vorangegangenen Untersuchungen und Abbildungen aus der Literatur und entspricht somit den anatomischen Normalverhältnissen (Machura et al., 2009; Sauter et al., 2008; Kurtz et al., 2007).

4.2.2 Die adulte Cx40-KO-Maus

Der Gefäßbaum der Cx40-KO-Maus zeigt hinsichtlich seiner Morphologie keine relevanten Veränderungen. Die Gefäße sind schlank und gleichmäßig. Die statistische Ausmessung der afferenten Arteriolen ergibt geringfügige Abweichungen zur Wildtyp-Maus, die auch den individuellen Gegebenheiten zuzuschreiben sein können. So sind die Gefäße mit der 0,8fachen Länge und 0,8fachen Breite unwesentlich kürzer und dünner. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den Ergebnissen von Kurtz et al. (2009), die der Cx40-KO-Maus keine signifikanten Abweichungen in der Gefäßarchitektur nachweisen.

4.2.3 Die adulte AT_{1a}-KO-Maus

Die AT_{1a}-KO-Maus hingegen weist bezüglich ihrer Gefäßmorphologie deutliche Unterschiede zur Wildtyp-Maus auf. In der 3D-Rekonstruktion stellt sich der Gefäßbaum in seinem gesamten Verlauf plump und gedrunken dar. Die Ausmessung der afferenten Arteriolen bestätigen den optischen Eindruck und ergeben die 0,6fache Länge und den 1,6fachen Durchmesser der afferenten Arteriolen im Vergleich zur Wildtyp-Maus. Diese typischen Gefäßveränderungen wurden bereits von mehreren Forschungsgruppen beschrieben (Machura et al., 2009; Tufro-McReddie et al., 1995). Die juxtaglomerulären afferenten Arteriolen, die in der Nephrogenese eher entstehen als die superficiellen afferenten Arteriolen, stellen sich deutlich kürzer dar als die kortikalen afferenten Arteriolen. Eine weitere Beobachtung ist der verschmälerte subkapsuläre Bereich. Der Gefäßbaum reicht mit seinen afferenten Arteriolen und

den dazugehörigen Glomeruli näher an die Nierenkapsel als es bei dem Wildtyp der Fall ist. Diese Beobachtung findet sich in anderen Forschungsergebnissen wider, wurde jedoch noch nicht genauer beschrieben.

Die gefäßmorphologischen Veränderungen können durch einen niedrigen Blutdruck begründet sein, wie er für die AT_{1a}-KO-Maus beschrieben ist (Ito et al., 1995; Sugaya et al., 1995).

4.2.4 Die adulte AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus

Die rekonstruierten Gefäßbäume der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Mäuse ähneln stark dem der AT_{1a}-KO-Maus. Die Gefäße sind deutlich verdickt und verkürzt. Der Gefäßbaum wirkt gedrungen und behäbig. Die Ausmessungen der afferenten Arteriolen ergeben für die AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus im Mittel die 0,6fache Länge zur Wildtyp-Maus. Der Durchmesser der afferenten Arteriolen variiert mit der Art der Behandlung. Die Varianz ist durch die unterschiedlichen Blutdrücke und im Falle der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus [HS] durch die stattgefundene Gefäßsklerosierung zu erklären. Insgesamt bestätigt sich jedoch eindeutig der Eindruck, dass die Gefäße verdickt sind. Wie auch bei der AT_{1a}-KO-Maus ist der Abstand der kortikalen afferenten Arteriolen und derer Glomeruli zur Kapsel merklich reduziert. Diese Beobachtung zeigt sich am deutlichsten unter Hochsalzbehandlung, beispielhaft wurden im histologischen Nierenausschnitt zwei Glomeruli markiert, die sich direkt unterhalb der Kapsel befinden (siehe * Abb. 3.30). Diese Veränderung mag in Zusammenhang mit der bei diesem Tier unter Hochsalzdiät verstärkt stattgefunden Tubulusnekrose und des resultierenden Substanzverlustes stehen.

Zusammenfassend ergibt sich die Erkenntnis, dass es bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus zur Zunahme der Gefäßdicke und zur Abnahme der Gefäßlänge kommt. Der Abstand zur Nierenkapsel ist reduziert. Sämtliche Beobachtungen treten auch bei der AT_{1a}-KO-Maus auf, was die Aussage erlaubt, dass die gefäßmorphologischen Veränderungen dem AT_{1a}-Knockout zuzuschreiben sind. Ob auch bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus ein niedriger Blutdruck als Erklärung für die Veränderungen des arteriellen Gefäßsystems in Frage kommt, muss durch weitere Studien untersucht werden. Der Cx40-Knockout hat keine Konsequenz für die korrekte Gefäßentwicklung.

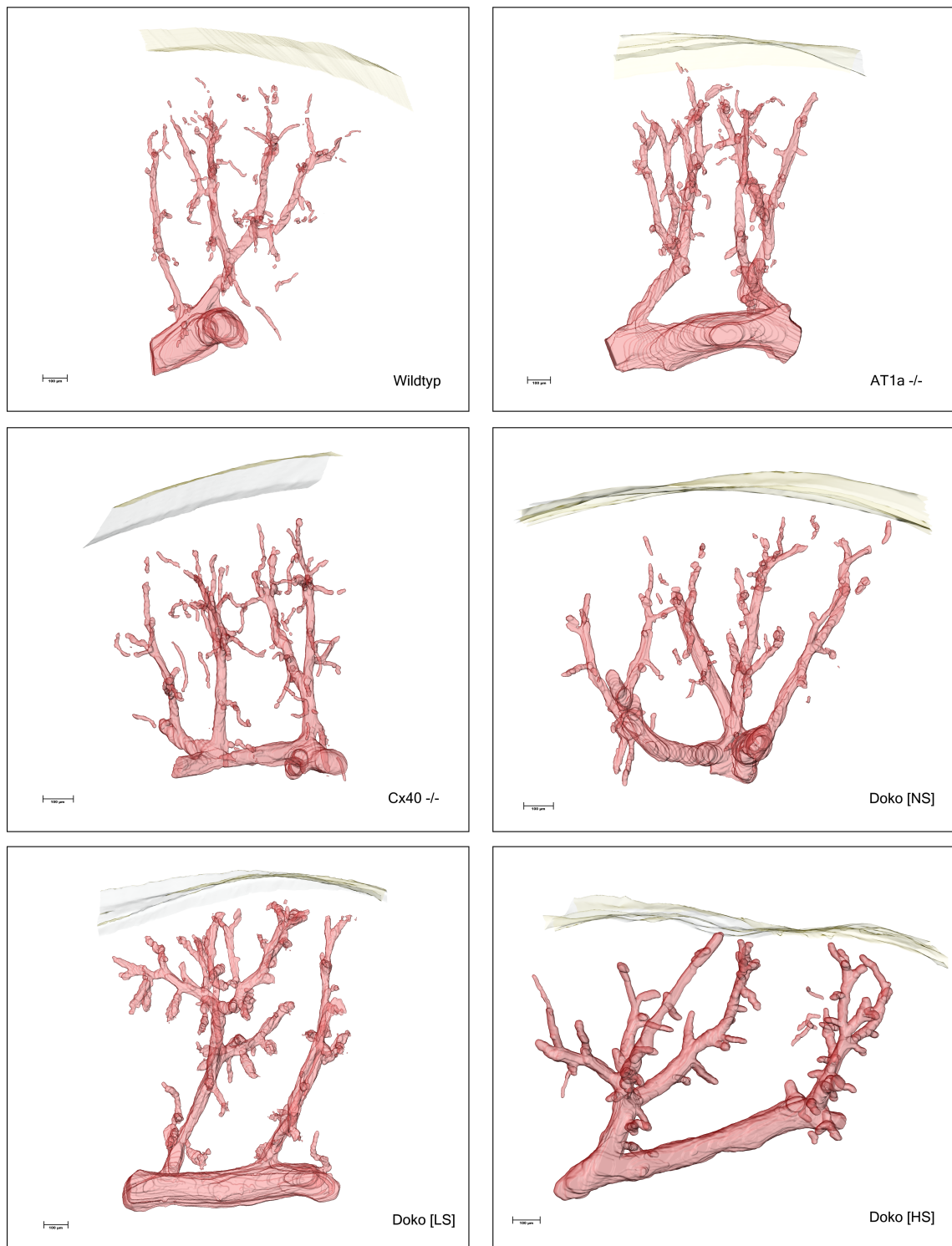


Abbildung 4.2: Gegenüberstellung der 3D-Rekonstruktionen der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) mit Nierenkapsel (gelb) aller untersuchten Tierstämme. Angaben zum jeweiligen Tierstamm und erfolgter Behandlung im rechten unteren Bereich der Abbildung.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Reninexpression in der Niere ist verschiedenen Einflussfaktoren und Regulationswegen unterworfen. Der Organismus kann sich durch eine Zu- und Abnahme der reninbildenden Zellen den jeweiligen Gegebenheiten anpassen. So führen eine salzarme Diät oder eine Hypotension zur Stimulation des RAAS und infolge dessen zu einem Vorgang, der als retrograde Rekrutierung bezeichnet wird. Hierbei werden Reninzellen, die sich normalerweise an der juxtaglomerulären Position am Gefäßpol des Glomerulus befinden, entlang des Gefäßastes rekrutiert. Glatte Muskelzellen wie auch extraglomeruläre Mesangiumszellen fungieren als Vorläuferzellen für die rekrutierten Reninzellen. Im Gegenzug haben eine Hochsalzdiät oder ein Hypertonus eine Downregulation von reninbildenden Zellen zur Folge.

Unter diesen Aspekten sollten die Auswirkungen des kombinierten Knockouts von Cx40 und dem AT_{1a}-Rezeptor auf die Reninexpression, auf die physiologischen Regulationsmechanismen der Reninexpression und auf die Architektur des renal arteriellen Gefäßsystems beleuchtet werden. Hierzu wurden Nierenserienschnitte von Wildtyp-, AT_{1a}-KO-, Cx40-KO- und AT_{1a}-Cx40-DOKO-Mäusen angefertigt und gegen Renin und Glattmuskelaktin gefärbt. Anschließend erfolgte die dreidimensionale Rekonstruktion eines Gefäßastes der verschiedenen Tiere. Die AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus wurde hierbei unter Normalsalzbehandlung, nach zehntägiger Niedrigsalzbehandlung zur Stimulation des RAAS, sowie nach zehntägiger Hochsalzbehandlung zur Hemmung des RAAS untersucht.

Es ist bekannt, dass es beim AT_{1a}-KO zur retrograden Rekrutierung von Reninzellen und zur mehrschichtigen Reninzellanordnung kommt, wobei die Reninexpression deutlich gesteigert ist. Des Weiteren kommt es zu gefäßmorphologischen Veränderungen des renal arteriellen Gefäßsystems mit verdickten und verkürzten Gefäßen. Zu den typischen Veränderungen des Cx40-KOs zählen ektopische Reninvorkommen, sowie das Vorhandensein von atypischen, fibroblastenähnlichen Reninzellen. Die Reninexpression ist leicht gesteigert. Eine Rekrutierung von Reninzellen findet jedoch nicht statt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus sowohl die Einflüsse des AT_{1a}-KOs wie auch die des Cx40-KOs niederschlagen. Die Reninexpression ist ebenfalls gesteigert. Die Reninzellen sind neben ihrer juxtaglomerulären Position ektopisch lokalisiert. Neben den typisch

kubisch geformten Reninzellen wurden, wie auch bei der Cx40-KO-Maus, atypische, fibroblastenähnliche Reninzellen gefunden. Eine Rekrutierung von Reninzellen findet trotz des Cx40-KOs statt. Die Salzabhängigkeit der Reninexpression ist in der DOKO-Maus prinzipiell erhalten, jedoch quantitativ abgeschwächt im Vergleich zum reinen AT_{1a}-KO. Es zeigen sich die AT_{1a}-KO-typischen gefäßmorphologischen Veränderungen mit verdickten, verkürzten Gefäßen.

Die Untersuchungen zeigen, dass ein Verlust von Cx40 eine korrekte Positionierung von Reninzellen nicht verhindert, jedoch zu ektopisch lokalisierten Reninzellen führt. Der Verlust des AT_{1a}-Rezeptors führt zur Reinduktion der Reninexpression. Außerdem spielt der AT_{1a}-Rezeptor eine entscheidende Rolle für die korrekte Ausbildung des Gefäßsystems. Sämtliche Charakteristika beider Knockouts werden weitervererbt und manifestieren sich bei der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Maus. Die Analyse der Reninexpressionsmuster der AT_{1a}-Cx40-DOKO-Mäuse und die daraus resultierende Erkenntnis, dass Regulationsmechanismen greifen, die eine Reinduktion, bzw. eine Suppression der Reninexpression bewirken, wirft die Frage auf, ob weitere von Cx40 unabhängige Signalwege zur Rekrutierung von Reninzellen bestehen und ob ein angeborener Defekt des AT_{1a}-Rezeptors den Switch der reninbildenden Zelle zur Glattmuskelzelle verhindert und somit die Fähigkeit dieser Zellen zur Reninsynthese erhalten bleibt.

Kapitel 6

Literaturverzeichnis

Abrahamson DR, Robert B, Hyink DP, St John PL, Daniel TO. 1998. Origins and formation of microvasculature in the developing kidney. *Kidney Int Suppl* 67: S.7-11.

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

Antonipillai I, Horton R. 1985. Role of extra- and intracellular calcium and calmodulin in renin release from isolated rat kidney. *Endocrinology* 117: 601-606.

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. *Am J Physiol.* 237(5):F333-43. Review.

Barajas L, Liu L, Powers K. 1992. Anatomy of the renal innervations: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Can J Physiol Pharmacol* 70:735-749.

Beavo JA. 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 75(4):725-48.

Beierwaltes WH. 2006. cGMP stimulates renin secretion in vivo by inhibiting phosphodiesterase-3. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(6):F1376-81.

Bock HA, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. 1992. Pressure dependent modulation of renin release in isolated perfused glomeruli. *Kidney Int* 41:275-280.

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

Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. 2010. Phy-

siology of kidney renin. *Physiol Rev* 90: 607-673.

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

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

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

Churchill, P. C. and Churchill, M. C. 1984. 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) inhibits renin secretion of rat renal cortical slices. *J. Hypertens.* 2, S25-S28.

Churchill PC. 1985. Second messengers in renin secretion. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 249: F175-F184.

Cohen Y, Rahamimov R, Naveh-Many T, Silver J, Rahamimoff R. 1997. Where is the 'inverting factor' in hormone secretion from parathyroid cells? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273:E631-E637.

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

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

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev* 2000; 52(3): 415-472.

DellaBrana R., Kurtz A., Corvol P., Pinet F. 1993. Renin mRNA quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells: Short term effects of cAMP on renin mRNA and secretion. *Circ Res* 73: 639-648.

DellaBrana R., Pinet F., Corvol P., Kurtz A. 1995. Opposite regulation of renin gene expression by cyclic AMP and calcium in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 47: 1266-1273.

- DiBona GF. 1994. Neural control of renal function in health and disease. *Clin Auton Res.* 4(1-2):69-74.
- DiBona GF. 2000. Neuronal control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1517-R1524.
- Dickinson DP, Gross KW, Piccini N, Wilson CM. 1984. Evolution and variation of renin genes in mice. *Genetics* 108:651-667.
- Dzau V.J., Burt D.W., Pratt R.E. 1988. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 255: F563-F573.
- Faust PL, Chirgwin JM, Kornfeld S. 1987. Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *J Cell Biol.* Nov;105(5):1947-55.
- Fray JCS. 1976. Stretch receptor model fo renin release with evidence from perfused rat kidney. *Am J. Physiol* 231:936-944.
- Fray JCS, Park CS, Valentine AND. 1987. Calcium and the control of renin secretion. *Endocr Rev* 8: 53-93.
- Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreassen D, Hansen PB, Skott O. 2002. Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circulation Research* 90:996-1003.
- Fuchs S, Germain S, Philippe J, Corvol P, Pinet F. 2002. Expression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promotor/LacZ transgenic mouse. *Am J Pathol* 161(2):717-725.
- Fuchs S, Philippe J, Corvol P, Pinet F. 2003. Implication of Ref-1 in the repression of renin gene transcription by intracellular calcium. *J Hypertens* 21: 327-335.
- Gambaryan, S., C. Hausler, T. Markert, D. Pöhler, T. Jarchau, U. Walter, W. Haase, A. Kurtz, and S.M. Lohmann. 1996. Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest.* 1996 Aug 1;98(3):662-70.
- Gambaryan S, Wagner C, Smolenski A, Walter U, Poller W, Haase W, Kurtz A, Lohmann SM. 1998. Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9003-9008.

- Gomez RA, Chevalier RL, Sturgill BC, et al. 1986. Mutation of the intrarenal renin distribution in Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens* 4 [Suppl 5]:S31-S33.
- Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ. 1989. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *AM J Physiol* 257:F850-F858.
- Gomez RA, Chavalier RL, Everett AD, Elwood JP, Peach MJ, Lynch KR, Carey RM. 1990. Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 259: F660-F665.
- Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F. 2006. The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res* 99:1197-1206.
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. 1990. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70:1067-1116.
- Haefliger JA, Krattinger N, Martin D, Pedrazzini T, Capponi A, Doring B, Plum A, Charollais A, Willecke K, Meda P. 2006. Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension. *J Clin Invest* 2006;116: 405-413.
- Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J. Connexins and the kidney. 2010. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298:R1143-55.
- Hano, T., Shiotani, M., Baba, A., Ura, M., Nakamura, Y., Tomobuchi, Y., Nishio, I. and Masuyama, Y. 1990. Contribution of calmodulin and protein kinase C to renin release in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 3, S206-S209.
- Hees H, Sinowatz F. 2000. *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopische Anatomie.* Deutscher Ärzte-Verlag Köln. 3. Auflage, S. 68, S.285-298.
- Holm I, Ollo R, Panthier JJ, Rougeon F. 1984. Evolution of aspartyl proteases by gene duplication: the mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exons. *EMBO J* 3: 557-562.
- Holmer S, Eckard KU, Lohr M, Schrickler K, Riegger G, Kurtz A. 1993. Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Eur.J.Physiol.* 425:62-67.
- Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, Pfeifer M, Kramer BK, Riegger GA, Kurtz A. 1997. Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 15:1471-1479.

- Hwan Seul K, Beyer EC. 2000. Heterogeneous localization of connexin40 in the renal vasculature. *Microvasc Res* 59:140-148.
- Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. 1995. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3521-5.
- Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A. 1997. Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29(5): 1148-55.
- Jones CA, Sigmund CD, McGowan RA, Kane-Haas CM, Gross KW. 1990. Expression of murine renin genes during fetal development. *Mol Endocrinol* 4:375-383.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. 2002. *Histologie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 5. Auflage, S.329-335.
- Kageyama S, Brown J. 1990. Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in rat isolated Glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 168:37-42.
- Karp G. 2005. *Molekulare Zellbiologie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 4. Auflage, S.342-343.
- Keeton TK, Campbell WB. 1980. The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.*32:81-227.
- Kirchhoff S., Nelles E., Hagendorff A., Kruger O., Traub O., Willecke K. 1998. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol* 8: 299-302.
- Klar J, Sandner P, Müller MW, Kurtz A. 2002. Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflügers Arch* 444:335-344.
- Klinke R, Silbernagel S. 1996. *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 2. Auflage, S.283-329.
- Kon Y. 1999. Comparative study of renin containing cells. Histological approaches. *J Vet Med Sci* 61:1075-1086.
- Kono, T., I. Fumitake, O. Fumimass, I. Hiroo, E. Jivo. 1981. Suppression of captopril-induced increase in plasma renin activity by des-Asp1-,Ileu8-angiotensin II in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 354-358.
- Krattinger N, Capponi A, Mazzolai L, Aubert JF, Caille D, Nicod P, Waeber G,

- Meda P, Haefliger JA. 2007. Connexin40 regulates renin production and blood pressure. *Kidney Int* 72: 814-822.
- Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Bauer C. 1986. Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4769-4773.
- Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Buhrle C, Nobiling R, Taugner R, Hackenthal R, Bauer C. 1986. Role of protein kinase C in the inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am J Physiol* 250:563-571.
- Kurtz A, Muff R, Born W, Lundberg JM, Milberg BI, Gnädiger MP, Uehlinger DE, Weidmann P, Hökfelt T, Fischer JA. 1988. Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *J. Clin. Invest.* 82:538-543.
- Kurtz A. 1989. Cellular control of renin secretion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.* 113:2-40.
- Kurtz A, Penner R. 1989. Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3423-3427.
- Kurtz A, Wagner C. 1998. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: F849-F862.
- Kurtz A, Wagner C. 1999. Cellular control of renin secretion. *The Journal of Experimental Biology* 202, 219-225.
- Kurtz L, Schweda F, De Wit C, Kriz W, Witzgall R, Warth R, Sauter A, Kurtz A, Wagner C. 2007. Lack of Connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *J Am Soc Nephrol* 18:1103-1111.
- Kurtz L, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. 2008. Connexin expression in renin-producing cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Mar;20(3):506-12.
- Lalli E, and Sassone-Corsi P (1994): Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 269:17359-17362.
- Leonhardt H, Tillman B, Töndury G, et al. 1987. Rauber/Kopsch Anatomie des Menschen, Lehrbuch und Atlas, Bd.II Innere Organe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. S.279.
- Levens NR, Peach MJ, and Carey RM. 1981. Role of the intrarenal renin-angiotensin

- system in the control of renal function. *Circ Res* 48: 157167.
- Lew R, Summers RJ. 1987. The distribution of beta-adrenoceptors in dog kidney: an autoradiographic analysis. *Eur J Pharmacol.* 1987 Aug 4;140(1):1-11.
- Liu A, Ballermann BJ. 1998. TGF-beta type II receptor in rat renal vascular development: localization to juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 53:716-725.
- Lüllmann-Rauch, R. 2006. *Histologie, Taschenlehrbuch.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 2. Auflage, S. 440-456.
- Machura K. 2008. Zeitlich-räumliche Entwicklung der Reninexpression. VDM Verlag Dr. Müller, Saarbrücken. S.13-14.
- Machura K, Steppan D, Neubauer B, Alenina N, Coffman TM, Facemire CS, Hilgers KF, Eckhardt KU, Wagner C, Kurtz A. 2009. Developmental renin expression in mice with a defective renin-angiotensin-system. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1371-F1380.
- Mercure C, Ramla D, Garcia R, Thibault G, Deschepper CF, Reudelhuber TL. 1998. Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS Lett.* Feb 6;422(3):395-9.
- Minuth M, Hackenthal E, Poulsen K, Rix E, Taugner R. 1981. Renin immunocytochemistry of the differentiating juxtaglomerular apparatus. *Anat Embryol* 162:173-181.
- Morris BJ. 1992. Molecular biology of renin I: gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* 10:209-214.
- Neubauer B, Machura K, Chen M, Weinstein LS, Oppermann M, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA, Schnermann J, Castrop H, Kurtz A, Wagner C. 2009. Development of vascular renin expression in the kidney critically depends on the cyclic AMP pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F1006-1012.
- OATES, H. F., G. S. STOKES, AND R. G. GLOVER. 1972. Plasma renin response to acute blockade of angiotensin II in the anaesthetized rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 1: 155-160.
- Oliverio MI, Madsen K, Best CF, Ito M, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. 1998. Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II. *Am J Physiol.* 1998 Jan;274(1 Pt 2):F43-50.
- Ortiz-Capisano MC, Ortiz PA, Harding P, Garvin JL, Beierwaltes WH. 2007. Decre-

- ased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase. *Hypertension* 49: 162-169.
- Pan L, Black TA, Shi Q, Jones CA, Petrovic N, Loudon J, Kane C, Sigmund CD, and Gross KW. 2001. Critical roles of a cyclic AMP responsive element and an E-box in regulation of mouse renin gene expression. *J Biol Chem* 276:45530-45538.
- Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol. Rev* 2006;86(3):747-803.
- Peters JS, Clausmeyer S. 2002. Intracellular sorting of renin: Cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol* 34:1561-1568.
- Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH. 2004. Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol*. Aug;287(2):F329-35.
- Petrovic N, Kane CM, Sigmund CD, Gross KW. 1997. Downregulation of renin gene expression by interleukin-1. *Hypertension*. Aug;30(2 Pt 1):230-5.
- Pfeilschifter J, Kurtz A, Bauer C. 1985. Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglyceryl ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127(3):903-10.
- Pietri L, Bloch-Faure M, Belair MF, Sanford LP, Doetschman T, Menard J, Bruneval P, Meneton P. 2002. Altered renin synthesis and secretion in the kidneys of heterozygous mice with a null mutation in the TGF-beta(2) gene. *Exp Nephrol*. 10(5-6):374-382.
- Reddi V, Zaglul A, Pentz ES, Gomez RA. 1998. Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *J Am Soc Nephrol* 9:63-71.
- Richoux JP, Amsaguine S, Grignon G, Bouhnik J, Menard J, Corvol P. 1987. Earliest renin-containing cell differentiation during ontogenesis in the rat. An immunocytochemical study. *Histochemistry* 88:41-46.
- Ritthaler, T., Della Bruna, R., Krämer, B. K. and Kurtz, A. 1996. Endothelins inhibit cyclic-AMP induced renin gene expression in cultured mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 50, 108-115.
- Romeis B. *Romeis mikroskopische Technik*. Urban & Schwarzenberg, München, 17. Auflage, S.256-259, 1989.
- Ryan MJ, Gross KW, Hajduczuk G. 2000. Calcium-dependent activation of phospholipase C by mechanical distension in renin-expressing As4.1 cells. *Am J Physiol*

- Endocrinol Metab. Oct;279(4):E823-9.
- Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C. 2008. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int* 73:43-51.
- Schnermann J. 1998. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol* 274:R263-R279.
- Scholz H, Hamann M, Götz KH, and Kurtz A. 1994. Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflugers Arch* 428:173-178.
- Scholz H, Kramer BK, Hamann M, Gotz KH, Kurtz A. 1995. Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta Physiol Scand.* Oct;155(2):173-82.
- Schunkert H., Ingelfinger J.R., Jacob H., Jackson B., Bouyounes H., Dzau V.J. 1992. Reciprocal feed back regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expression by angiotensin II. *Am J Physiol* 263: E863-E869.
- Schweda F, Segerer F, Castrop H, Schnermann J, Kurtz A. 2005. Blood pressure-dependent inhibition of Renin secretion requires A1 adenosine receptors. *Hypertension.* 2005 Oct;46(4):780-6.
- Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. 2007. Renin release. *Physiology (Bethesda).* 2007 Oct;22:310-319.
- Schweda F, Kurtz L, de Wit C, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. 2009. Substitution of connexin40 with connexin45 prevents hyperreninemia and attenuates hypertension. *Kidney Int.* 2009 Mar;75(5):482-9. Epub 2008 Dec 24.
- Schwertschlag U, Hackenthal E. 1982. Histamine stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 319:239-242.
- Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA. 2001. Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Renal Physiol* 281:F345-F356.
- Silbernagl S, Agamemnon D. 2007. *Taschenatlas Physiologie.* Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 7. Auflage, S. 186.
- Skinner SL, McCubbin JW, and Page IH. 1964. Renal baroreceptor control of acute renin release in normotensive, nephrogenic and neurogenic hypertensive dogs. *Circ Res* 15:522-531.
- Skott O. 1986. Episodic release of renin from single isolated superperfused rat affe-

rent arterioles. *Pflügers Arch* 407: 41-45.

Söhl G, Willecke K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 2004 May 1;62(2):228-32.

Steckelings U. *Der Angiotensin AT2-Rezeptor: Untersuchungen zu Expression, physiologischen Wirkungen und zum therapeutischen Potential einer pharmakologischen Stimulation.* (Habil. 2011), Berlin 2011.

Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Imaizumi K, Hisada Y, Otsuka A, et al. 1995. Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J Biol Chem.* 1995 Aug 11;270(32):18719-22.

Takenaka T, Inoue T, Kanno Y, Okada H, Meaney K R, Hilland C E, Suzuki H. 2008. Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. *Kidney International* 2008. 73, 415-422.

Taugner R, Schiller A, Kaissling B, Kriz W. 1978. Gap Junctional Coupling between the JGA and the Glomerular Tuft. *Cell Tiss. 1978; Res.* 186, 279-285.

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

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

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

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

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

Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, Gomez RA. 1995. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol.* 1995 Jul;269(1 Pt 2):F110-5.

- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. 1996. : Angiotensin receptors. *J Hypertens*. 14:S95-103.
- Vander AJ. 1967. Control of renin release. *Physiol Rev* 47:359-382.
- Vandongen R., Peart W.S., Boyd G.W. 1974. Effect of angiotensin II and its non-pressor derivatives on renin secretion. *Am J Physiol* Feb;226(2):277-82.
- Wagner C, Kurtz A. 1998. Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7:437-441.
- Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A. 1998. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102: 1576-1582.
- 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, de Wit C, Kurtz L, Grünberger C, Kurtz A, Schweda F. 2007. Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* 2007; 100: 556-563.
- Wagner C, Kurtz L, Schweda F, Simon AM, Kurtz A. 2009. Connexin 37 is dispensable for the control of the renin system and for positioning of renin-producing cells in the kidney. *Pflugers Arch*. 2009 Nov;459(1):151-8.
- Wagner C, Kurtz A. 2012. Distribution and functional relevance of connexins in renin-producing cells. *Pflugers Arch*. 2012 Jun 29.
- Wehner R, Gehring W. 2007. *Zoologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 24. Auflage, S.361-363.
- Weisert J. 1990. Zur mikroskopischen Anatomie der Niere von Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Hamster, eine vergleichende Literaturstudie. S.6-17, S.72-83.
- Wölflé SE, Schmidt VJ, Hoepfl B, Gebert A, Alcolea S, Gros D, de Wit C. 2007. Connexin45 cannot replace the function of connexin40 in conducting endothelium-dependent dilations along arterioles. *Circ Res* 101: 12921299.
- Yang J, Chen C, Ren H, Han Y, He D, Zhou L, Hopfer U, Jose PA, Zeng C. 2012. Angiotensin II AT2 receptor decreases AT1 receptor expression and function via nitric oxide/cGMP/Sp1 in renal proximal tubule cells from Wistar-Kyoto rats. *J*

Hypertens. 2012 Jun;30(6):1176-84.

Yokota T, Kawakami Y, Nagai Y, Ma JX, Tsai JY, Kincade PW et al. 2006. Bone marrow lacks a transplantable progenitor for smooth muscle type alpha-actin-expressing cells. *Stem Cells* 24, 13-22.

Zhao X, Gong P, Lin Y, Wang J, Yang X, Cai X. 2012. Characterization of α -smooth muscle actin positive cells during multilineage differentiation of dental pulp stem cells. *Cell Prolif.* 2012 Jun;45(3):259-65. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00818.x.

Kapitel 7

Anhang

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung eines Glomerulus (Abbildung nach Junqueira, 2002)	2
1.2	Schematische Darstellung des Blutgefäßsystems (Gray's Anatomy) . .	4
1.3	Schematische Darstellung der Signalkaskade des RAAS	6
1.4	Schematische Darstellung der Reninsynthese und –sekretion (Abbildung Schweda et al., 2007)	8
1.5	Links: Schematische Darstellung eines Glomerulus (Abbildung nach Francois und Coffman, 2004). Rechts: Immunhistochemische Aufnahme eines Glomerulus mit afferenter und efferenter Arteriole (grün) und den reninbildenden Zellen (rot).	14
1.6	Mögliche Anordnungen von Connexin-Kanälen (Kumar und Gilula, 1996)	16
2.1	Farbkanaltrennung zur Generierung eines Aktin- und eines Renin-Stapels (Abbildung modifiziert nach Machura, 2008)	33
3.1	Gesamtansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten unbehandelten Wildtyp-Maus.	43
3.2	Detailansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität einer afferenten Arteriole einer unbehandelten Wildtyp-Maus.	44
3.3	Übersicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus.	45
3.4	Detailansicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer unbehandelten Wildtyp-Maus.	46
3.5	Gesamtansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten unbehandelten AT _{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus.	47
3.6	Detailansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität eines Ausschnitts einer Interlobulararterie einer unbehandelten AT _{1a} -KO-Maus.	48
3.7	Übersicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus.	49

3.8	Detailansicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus.	50
3.9	Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Levels des Wildtyps und des AT _{1a} -Rezeptor-Knockouts.	51
3.10	Gesamtansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten unbehandelten Cx40-Knockout-Maus.	52
3.11	Detailansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität afferenter Arteriolen einer unbehandelten Cx40-KO-Maus.	53
3.12	Übersicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer Cx40-Knockout-Maus.	54
3.13	Detailansicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer Cx40-KO-Maus.	55
3.14	Detailansicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer Cx40-KO-Maus.	56
3.15	Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Werte des Wildtyps und des Cx40-Knockouts.	57
3.16	Gesamtansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten unbehandelten AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus.	58
3.17	Detailansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität afferenter Arteriolen einer unbehandelten AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus.	59
3.18	Übersicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (NS).	60
3.19	Detailansicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (NS).	61
3.20	Detailansicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (NS).	62
3.21	Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Levels des Wildtyps und des AT _{1a} -Cx-40-Knockouts (NS).	63
3.22	Gesamtansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (LS).	64
3.23	Detailansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität afferenter Arteriolen einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (LS).	65
3.24	Übersicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (LS).	66
3.25	Detailansicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (LS).	67
3.26	Detailansicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (LS).	68

3.27	Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Levels des Wildtyps und des AT _{1a} -Cx-40-Knockouts (LS).	69
3.28	Gesamtansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskellaktin- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (HS).	70
3.29	Detailansicht: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und der Glattmuskellaktin- (rot) Immunreaktivität afferenter Arteriolen einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (HS).	71
3.30	Übersicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (HS).	72
3.31	Detailansicht: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus (HS).	73
3.32	Graphische Darstellung der Renin-mRNA-Levels des Wildtyps und des AT _{1a} -Cx-40-Knockouts (LS).	74
3.33	Graphische Darstellung der Renin-mRNA-Levels in den Nieren aller Versuchstiere.	75
3.34	3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten, unbehandelten Wildtyp-Maus.	76
3.35	3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten, unbehandelten AT _{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus.	77
3.36	Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AT _{1a} -Rezeptor-Knockout-Maus.	78
3.37	3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten, unbehandelten Cx40-Knockout-Maus.	79
3.38	Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der Cx40-Knockout-Maus.	80
3.39	3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten, unbehandelten AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus.	81
3.40	Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus [NS].	81
3.41	3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus nach 10d Nidrigsalzdiät.	82
3.42	Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus [LS].	82

3.43	3D-Rekonstruktion der renalen, arteriellen Blutgefäße (rot) und der Nierenkapsel (gelb) im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus nach 10d Hochsalzdiät.	83
3.44	Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AT _{1a} -Cx40-DOKO-Maus [HS].	83
3.45	Graphische Gegenüberstellung der mittleren Länge (links) und des mittleren Durchmessers (rechts) afferenter Arteriolen aller untersuchter Versuchstiere.	84
4.1	Gegenüberstellung der 3D-Rekonstruktionen der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität mit Glomeruli und Nierenkapsel (gelb) aller untersuchten Tierstämme.	91
4.2	Gegenüberstellung der 3D-Rekonstruktionen der renalen arteriellen Blutgefäße (rot) mit Nierenkapsel (gelb) aller untersuchten Tierstämme.	94

Abkürzungsverzeichnis

Chemische und biologische Größen und Einheiten

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

Physikalische Größen und Einheiten

°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Erdbeschleunigung (gravity)
g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
min	Minute(n)
s	Stunde(n)
d	Tag(e)

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

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

Sonstige

3D	dreidimensional
%	Prozent
α SMA	α smooth muscle actin
A.	Arteria(e)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting Enzyme

ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
AT ₁	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT ₂	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cy2	Carbocyanin
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (et alii)
EtOH	Ethanol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase
H ₂ O bidest.	zweifach entionisiertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HS	Pferdeserum (horse serum)
HS	Highsalt
Ig	Immunglobulin
i.p.	intra peritoneal
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
JGE-Zelle	juxtaglomeruläre Epitheloidzelle
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ KPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
LS	Lowsalt
MD	Macula densa
mRNA	messenger ribonucleic acid
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO	di-Natriumhydrogenphosphat
NS	Normalsalt
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion

PIP2	Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron- System
RGB	Rot-Grün-Blau
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl)-amino- methan
TRITC	Tetramethylrhodamin
ün	über Nacht
V.	Vena(e)
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

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

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

Für die fachliche Anleitung, die kompetente Betreuung in Theorie und Praxis und für ihre allumfassende Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Katharina Machura bedanken.

Mein weiterer Dank gilt dem gesamten Team des Lehrstuhl Physiologie I der Universität Regensburg für die fortwährende, stets unkomplizierte und spontane Unterstützung bei Problemen und Nöten aller Art. Besonders Anna M´Bangui und Björn Neubauer möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihr Verständnis und jegliche Unterstützung während meiner bisherigen Studienzeit. Ohne euch wäre all das für mich nicht möglich gewesen. Ich danke euch.

Weiterer Dank geht an meine Freunde sowie insbesondere an meinen Freund Tobias.

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 13.10.2014

Hanna Müller