

*An meine Eltern und meine Schwester Marina,  
die mich immer unterstützt haben.*

---

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG VON  
CONNEXIN 40 FÜR DIE KONTROLLE DES  
RENINSYSTEMS UND DIE LOKALISATION  
RENINBILDENDER ZELLEN**

---

**Tamoxifen-induzierte Cx 40 Deletion in der  
ausdifferenzierten Mausniere**

**DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MEDIZIN (DR. MED.)

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND

VORKLINISCHE MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



Vorgelegt von

Josef Philipp Vöckl aus Passau

Im Jahr 2015

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2011 bis November 2015 unter der Anleitung von Frau Professor Doktor Charlotte Wagner am Institut für Physiologie der Universität Regensburg

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 22.11.2015

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

Prüfungskommission Vorsitzender: Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner

1. Prüfer: Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner

2. Prüfer: Herr PD Dr. rer. nat. Rudolf Fuchshofer

Unterschrift:



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>9</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>11</b>
1. Das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System ( RAAS ) der Niere.....	<b>11</b>
1.1 Funktionsweise und Bedeutung des RAAS- Systems für die Blutdruckhomöostase.....	<b>11</b>
1.2 Der juxtaglomeruläre Apparat, die Reninsynthese und die Reninsekretion.....	<b>13</b>
2. Kommunikationsmöglichkeiten zwischen einzelnen Zellen.....	<b>17</b>
2.1 Aufbau und funktionelle Bedeutung von Gap junctions und Hem-ichannels.....	<b>18</b>
2.2 Connexine des renalen Gefäßsystems.....	<b>21</b>
2.2.1 Intrarenale Verteilung und funktionelle Bedeutung von Connexin-37, Connexin-43 und Connexin-45.....	<b>21</b>
2.2.2 Intrarenale Verteilung und funktionelle Bedeutung von Connexin-40.....	<b>23</b>
2.2.3 Einfluss von Connexin-40 auf die Position von Reninzellen.....	<b>26</b>
2.2.4 Mutationen im humanen Connexin-40 Gen.....	<b>28</b>
3. Das Medikament Tamoxifen in Klinik und Forschung.....	<b>30</b>
3.1 Prinzip der Tamoxifen-induzierten Gendeletion.....	<b>30</b>
3.2 Klinische Relevanz von Tamoxifen.....	<b>32</b>
4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	<b>37</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>39</b>
1. Material.....	<b>39</b>
1.1 Geräte.....	<b>39</b>
1.2 Verbrauchsmaterial.....	<b>41</b>
1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits.....	<b>42</b>
1.4 Puffer und Lösungen.....	<b>44</b>
1.4.1 Puffer und Lösungen für Immunhistochemie.....	<b>44</b>
1.4.2 Puffer und Lösungen für Molekularbiologie..	<b>46</b>
1.5 Oligonukleotide.....	<b>48</b>
1.6 Antikörper.....	<b>49</b>
1.7 Software und Internetdienste.....	<b>49</b>
2. Methoden.....	<b>51</b>

2.1 Versuchstiere.....	51
2.2 Versuche an adulten Mäusen.....	51
2.3 Histologische Methoden.....	52
2.3.1 Erstellung von Paraffinschnitten.....	52
2.3.2 Immunhistochemische Färbung.....	54
2.3.3. Mikroskopie und Bilddigitalisierung.....	57
2.3.4. Anfertigung von 3D-Rekonstruktionen.....	57
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	58
2.4.1 Genotypisierung.....	58
2.4.2 Isolation der renalen Gesamt-mRNA.....	60
2.4.3 Synthese von cDNA.....	61
2.4.4 Realtime-PCR zur Semiquantifizierung der Renin mRNA.....	62
2.4.5 Statistische Analysen.....	63
<b>Ergebnisse.....</b>	<b>64</b>
1. Qualitative und quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters an verschiedenen Versuchstieren.....	64
2. Nachweis der Tamoxifen induzierten Connexin-40 Deletion.....	65
2.1 Vergleich der Cx-40 Immunfärbung im Wildtyp mit der Färbung in Cx-40flfl Tam Cre-Mäusen.....	65
2.2 Connexin-40 mRNA Daten im Wildtyp und in Cx-40flfl Tam Cre-Mäusen.....	66
3. Semiquantitative Analyse der Reninexpression.....	68
3.1 Semiquantitative Analyse unter basalen Bedingungen.....	68
3.2 Semiquantitative Analyse unter chronischer Stimulation des RAAS.....	68
4. Untersuchungen zur Positionierung von reninbildenden Zellen nach induzierter Cx-40 Deletion.....	70
4.1 Vergleich von Wildtypen und Cx-40flfl Tam Cre-Tieren unter basalen Bedingungen.....	70
4.2 Vergleich von Wildtypen und Cx-40flfl Tam Cre-Tieren unter stimulierten Bedingungen.....	72
5. Dreidimensionale Rekonstruktionen zur Beurteilung der Reninverteilung entlang des Gefäßbaumes.....	76
5.1 Das Reninexpressionsmuster in der unstimulierten adulten Wildtyp-Maus.....	76
5.2 Das Reninexpressionsmuster in der adulten Wildtyp-Maus nach Stimulation des RAAS durch zweiwöchige Nidrigsalz-Diät in Kombination mit	

dem ACE-Hemmer Enalapril (wt+ LS/E).....	78
5.3 Das Reninexpressionsmuster eines nicht stimulierten Wildtyps und eines unstimulierten Cx-40flfl Tam Cre-Tieres im Vergleich.....	80
5.4 Das Reninexpressionsmuster eines stimulierten Wildtyps und eines stimulierten Cx-40flfl Tam Cre-Tieres im Vergleich.....	82
<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
1. Effizienz der induzierten Cx-40 Gendeletion.....	84
2. Phänotypologische Effekte der Connexin-40 Deletion in der adulten Niere: Vergleich der ermittelten Ergebnisse mit Daten von Mäusen mit systemischer Connexin-40 Gendeletion, von Mäusen mit zellspezifischer Connexin-40 Deletion, von Mäusen mit A96S Mutation und von Mäusen mit Cx-40KI45 Mutation.....	88
2.1 Vergleich der Renin mRNA Daten.....	88
2.2 Vergleich von immunhistologischen Bildern.....	93
2.3 Das Reninexpressionsmuster im Vergleich.....	96
3. Ausblick.....	102
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>108</b>
Abbildungsverzeichnis.....	108
Abkürzungsverzeichnis.....	116
Erklärung.....	118
Danksagung.....	119

## Zusammenfassung

Liegt eine Deletion von Connexin-40(Cx-40) während der Nephrogenese vor, bewirkt dies unter anderem eine gesteigerte Reninsynthese und Reninsekretion. Dies führt letztlich zu einem erhöhten Blutdruck. Außerdem wird die druckabhängige Reninsekretion außer Kraft gesetzt und es kommt zu einer ektopen Lokalisation der Reninzellen außerhalb des juxtaglomerulären Apparats (JGA).

Im Zuge dieser Arbeit wurde versucht durch die Anfertigung von immunhistologischen Aufnahmen, dreidimensionalen Rekonstruktionen und durch Messung sowohl der Connexin-40 mRNA als auch der Renin mRNA zu klären, welche der oben genannten Effekte einer Cx-40 Deletion beobachtet werden können, wenn die Deletion des Cx-40 Gens in einer bereits vollständig ausdifferenzierten Niere erfolgt. Für die Herbeiführung der Deletion wurde den Versuchstieren tamoxifenhaltiges Futter über einen Zeitraum von 14 Tagen hinweg verabreicht. Die Ergebnisse wurden sowohl für unbehandelte Wildtypen und für Wildtypen, deren Renin-Angiotensin-Aldosteron-System stimuliert wurde als auch für unstimulierte induzierte KO- Mäuse (Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäuse) und stimulierte Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tiere erhoben.

Beim Vergleich der Renin m-RNA Daten unter basalen Bedingungen und unter Stimulation zeigten sich zwischen dem jeweiligen Wildtyp und dem induzierten KO keine signifikanten Unterschiede, obwohl die Bestimmung der Cx-40 mRNA eine Reduktion der Cx-40 Expression auf 25 % zeigte.

Der Vergleich der immunhistologischen Aufnahmen zeigte in unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen anders als im Wildtyp reninnegative Glomeruli. Es kam jedoch zu einer ektopen Lokalisation der Reninzellen außerhalb der Gefäßwand der afferenten Arteriole, wie dies auch bei Mäusen mit systemischem Cx-40 knock-out der Fall ist.

Unter Stimulation des RAAS durch eine low-salt Diät und durch den ACE-Hemmer Enalapril, kam es in den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren wie im stimulierten Wildtyp zu einer deutlichen retrograden Rekrutierung. Es traten jedoch auch deutliche Reninnester auf, wobei die Reninzellen wie bei einer totalen Cx-40 Deletion ektop lokalisiert waren.

Die 3D-Rekonstruktion der unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus bestätigte die hohe Anzahl an reninnegativen Glomeruli und die ektopen Lokalisation der Reninzellen, sofern reninpositive Glomeruli auftraten.

Die Rekonstruktion einer stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus zeigte ausschließlich reninpositive Glomeruli und eine stark ausgeprägte retrograde Rekrutierung, wobei die Reninzellen deutlich ausgeprägte ektope Lokalisationen aufwiesen.

Auf Grund der starken Ähnlichkeiten in Bezug auf die histologischen Aufnahmen, die 3D-Rekonstruktionen und die Positionierung der Reninzellen zwischen Mäusen mit totaler Cx-40 Deletion und Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren kann man zu dem Schluss kommen, dass die Effekte einer Cx-40 Deletion nicht nur auftreten wenn diese Deletion bereits während der Nephrogenese vorliegt, sondern dass das Phänomen der ektope Positionierung auch beobachtet werden kann, wenn die Deletion des Cx-40 Gens in einer vollständig ausdifferenzierten Niere erfolgt.

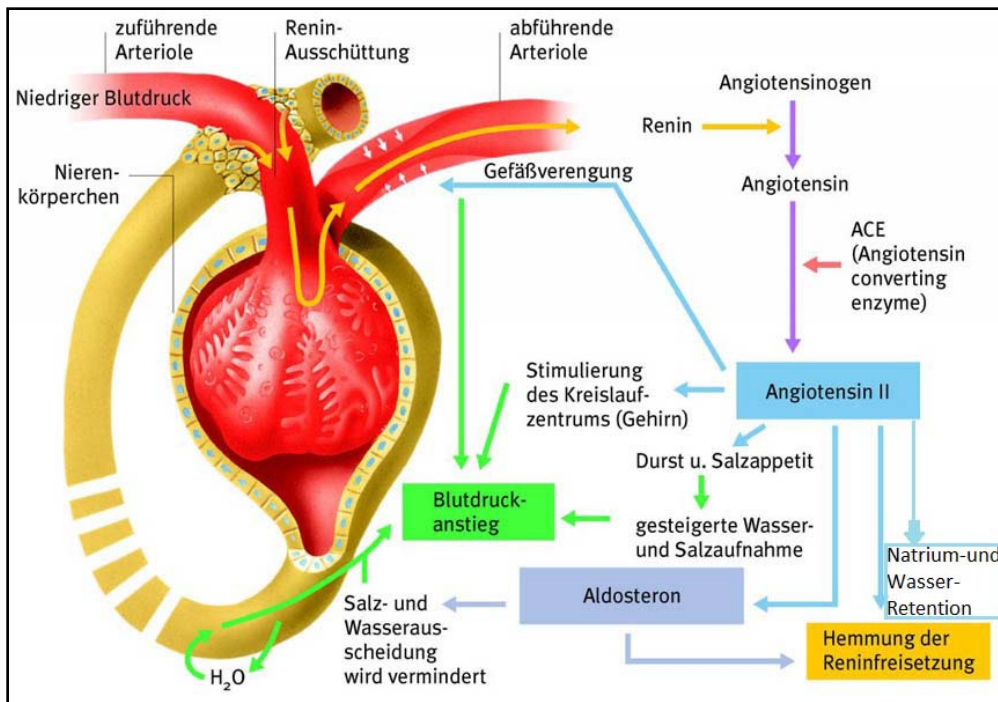
# Einleitung

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

### 1.1 Funktionsweise und Bedeutung des RAAS für die Blutdruckhomöostase

Die Nieren liegen als paarige Organe im Retroperitoneum des menschlichen Körpers. Die beiden Organe wiegen im Normalfall zusammen rund 300g, weisen jeweils eine Größe von ungefähr 11 x 5 x 4 cm (Länge x Breite x Dicke) auf und werden von der Arteria renalis dextra bzw. sinistra, die jeweils direkt aus der Aorta entspringen, versorgt.

Zu den Aufgaben der Niere zählt die Aufrechterhaltung des Volumen- und Elektrolythaushalts, die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die Regulation des Säure-Basen-Haushalts und die Synthese von zahlreichen Hormonen (*Ackermann H., 2012*). Eine weitere wichtige und für die vorliegende Arbeit entscheidende Funktion kommt der Niere in Bezug auf die Blutdruckregulation zu, wofür das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) von überragender Bedeutung ist (**Abb. 1**) (*Peters J. et al., 2002 und Mercure C. et al., 1998*).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des RAAS-Systems der Niere (frei modifiziert von <http://www.jameda.de/gesundheitslexikon/bilder/big/506849.jpg>).

Zentraler Mediator dieser Enzymkaskade ist die Protease Renin, die am Anfang einer Reihe von katalytischen Prozessen steht. Dieses Enzym wird zum großen Teil in der Niere gebildet. Renin katalysiert die Hydrolyse von Angiotensinogen, einem Glykoprotein, das von der Leber ins Blut abgegeben wird zu Angiotensin I (ANG I). In einem nächsten Schritt wird von ANG I durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), das im Lungenepithel gebildet wird, ein Dipeptid abgespalten, wodurch ANG I zu Angiotensin II (ANGII) umgewandelt wird. Das so entstandene Oktapeptid vermittelt über ANG II-Rezeptoren (AT-Rezeptoren) zahlreiche Effekte. Diese Rezeptoren werden auf Zellen des kardiovaskulären, des endokrinen und dem Endothelsystem gebildet (Ungerer et al., 1996 und Ardaillou, 1999). So bewirkt ANGI über AT-1-Rezeptoren eine Vasokonstriktion und somit eine Blutdruckerhöhung. Des Weiteren verstärkt es das Durstgefühl im Hypothalamus und den Salzunger, was durch die erhöhte Volumenzufuhr ebenfalls zu einem Blutdruckanstieg führt. Auch bewirkt das Peptid eine gesteigerte Freisetzung von Vasopressin, welches im Nucleus supraopticus und im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus gebildet wird. Nach dessen Transport in den Hypophysenhinterlappen wird es, stimuliert durch Angiotensin II, von dort freigesetzt. Das Hormon fördert über V2-Rezeptoren den Einbau von Aquaporinen in die Membran des Sammelrohrs und damit die Wasser- und Natriumretention im Bereich des distalen Tubulus und des Sammelrohres der Niere. Dadurch vermindert es die Diurese, weswegen Vasopressin auch als Antidiuretisches Hormon (ADH) bezeichnet wird. Zudem führt es über V1-Rezeptoren zur Vasokonstriktion und wirkt somit blutdrucksteigernd. Schließlich stimuliert Renin auch die Zona glomerulosa der Nebennierenrinde,

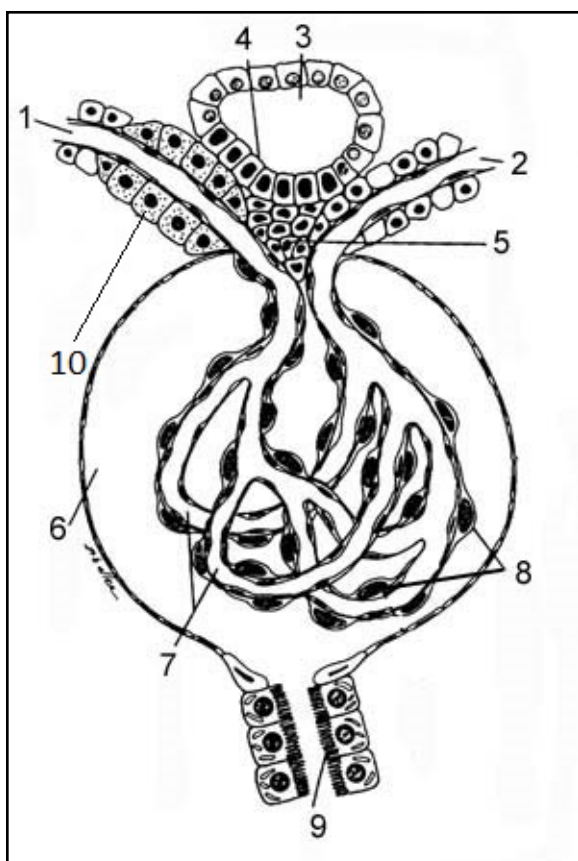
was zur Freisetzung des Mineralokortikoids Aldosteron führt. Dieses zu den Kortikosteroiden gehörige Hormon fördert, ebenso wie Renin selbst, die Rückresorption von Wasser und Natrium im distalen Tubulus der Niere.

Letztlich resultiert aus der Aktivierung des RAAS eine Blutdruckerhöhung und ein signifikanter Anstieg des Extrazellulärvolumens.

Im Unterschied zum Menschen, bei dem unter physiologischen Bedingungen vor allem die Plasmareninkonzentration als limitierender Faktor des RAAS angesehen wird, gilt dies bei der Maus für Angiotensinogen (Hackenthal E. et al., 1990; Persson PB., 2003).

## 1.2. Der juxtaglomeruläre Apparat, die Reninsynthese und die Reninsekretion

Eine entscheidende Rolle bei der Reninsekretion nehmen epithelartige Zellen in der afferenten Arteriole ein, die auf Grund ihres Aussehens und ihrer Position, als juxtaglomeruläre Epitheloidzellen (JGE-Zellen) bezeichnet werden. Diese Zellen befinden sich in der Tunica media der afferenten Arteriole unmittelbar am Eingang des Vas afferens in das Kapillarnetzwerk. Sie sind Teil des juxtaglomerulären Apparats der Niere (**Abb. 2**) und hauptverantwortlich für die Reninproduktion.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Bestandteile des juxtaglomerulären Apparats (Darstellung frei modifiziert von: [http://www.histonet2000.de/images/zeichnungen/de/p029/z029\\_003.jpg](http://www.histonet2000.de/images/zeichnungen/de/p029/z029_003.jpg)).

- |                       |                            |
|-----------------------|----------------------------|
| 1. Arteriola afferens | 6. Bowman-Kapselraum       |
| 2. Arteriola efferens | 7. Glomeruluskapillaren    |
| 3. Distaler Tubulus   | 8. Podocyten               |
| 4. Macula densa       | 9. Harnpol                 |
| 5. Mesangiumzellen    | 10. Granulierte JGE-Zellen |

Der juxtaglomeruläre Apparat besteht aus den JGE-Zellen (=Polkissen) im Vas afferens, der Macula densa und den extraglomerulären Mesangiumzellen.

Die Reninsekretion kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Die JGE-Zellen sind in der Lage die Hormonvorstufe Prorenin über einen konstitutiven Weg sofort freizusetzen (Schweda F. et al., 2007). Wieviel Prorenin freigesetzt wird ist unter anderem von der Genaktivität und von der absoluten Zahl an reninproduzierenden Zellen abhängig (Schweda F. et al., 2007). Darüber hinaus existiert ein zweiter Freisetzungsmechanismus, über den aktives, in Vesikeln gespeichertes Renin über kontrollierte Exozytose freigesetzt werden kann. Bisherige Untersuchungen konnten Hinweise darauf liefern, dass ein ganzer Pool an Vesikeln für eine Freisetzung von Renin via Exozytose zur Verfügung steht. Eine akute Stimulierung der Reninsekretion führt zu einem Anstieg der Exozytose von reifen Renin granula, die nur aktives Renin enthalten, wohingegen die chronische Stimulierung des Reninsystems sowohl den Level von zirkulierendem Renin als auch von Prorenin erhöht, da es zu einer Aktivierung des konstitutiven Weges kommt (Schweda F. et al., 2007). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Dichte an Vesikeln pro Zelle unter Normalbedingungen und unter chronischem Salzentzug, was zu einer erheblichen Stimulation der Reninfreisetzung führt, annähernd identisch ist, wohingegen die Anzahl an reninproduzierenden Zellen unter Salzentzug ansteigt (Rasch R. et al., 1998). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Langzeitregulation der Reninsynthese eher über eine Veränderung der Anzahl an reninproduzierenden Zellen erfolgt, als durch eine Modifizierung des Prozesses der Reninsynthese und der Reninsekretion in den einzelnen Zellen (Castrop H. et al., 2010). Unter physiologischen Bedingungen wird die Reninsynthese und -sekretion sowohl durch systemische als auch durch intrarenale Faktoren reguliert. Von entscheidender Bedeutung sind dabei einige sekundäre Botenstoffe, die auf zellulärer Ebene wirken (Tab.1).

Tab. 1: Intrazelluläre Wirkung der sekundären Botenstoffe auf die Reninsekretion

Botenstoff	Wirkung
cAMP	zentraler Stimulus der Reninsekretion (Kurtz A., 1989)
freies Ca <sup>2+</sup> im Zytosol	zentraler Inhibitor der Reninsekretion (Kurtz A., 1989)
cGMP	Stimulus und Inhibitor der Reninsekretion (Wagner C. et al., 1998 b und Kurtz A. et al., 1999)

Das durch die Adenylatzyklase 5 und 6 aus ATP gebildete cAMP aktiviert (*Grünberger C. et al, 2009*)- wie in vielen anderen Zellen auch- die Proteinkinase A, welche wiederum für eine Fusion von reninhaltigen Vesikeln mit der Zellmembran der JG-Zellen sorgt. Somit gilt cAMP als klassischer Stimulus für die Reninsekretion (**Abb. 3**).

In Bezug auf  $\text{Ca}^{2+}$  weisen die Reninzellen jedoch eine Besonderheit auf. Anders als bei den meisten Zellen im Körper, bei denen ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zu einer verstärkten Exozytose führt, bewirkt intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  in den JG-Zellen eine Hemmung der Reninfreisetzung. Diese kommt dadurch zustande, dass  $\text{Ca}^{2+}$ , das entweder über Kanäle in die JG-Zellen einströmt, oder aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum stammt, die Adenylatzyklasen 5 und 6 hemmt, was nachfolgend zu einer verminderten cAMP Konzentration führt. Diese außergewöhnliche Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  wird im Zusammenhang mit der Niere auch als "Calciumparadoxon" der Reninsekretion bezeichnet (*Grünberger C. et al, 2009*) (**Abb. 3**).

Eine vergleichbare Wirkung zeigt  $\text{Ca}^{2+}$  auch in Bezug auf die Freisetzung von Parathormon (PTH) aus der Nebenschilddrüse. Auch hier besteht zwischen PTH und  $\text{Ca}^{2+}$  ein negativer Feedback-Mechanismus, da ein hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel im Blut die Hormonfreisetzung hemmt. Ein niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel hingegen fördert die Freisetzung von PTH (*Brown E, 2013*).

Des Weiteren beeinflusst u.a. das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin die Reninsekretion. Ein erhöhter Hormonspiegel, wie er bei einer Hyperthyreose vorliegt, erhöht die Reninsekretion, während es bei einer Hypothyreose zu einer verminderten Sekretion kommt (*Marchant C. et al., 1993*).

In Bezug auf die duale Wirkung von cGMP scheint es möglich zu sein, dass der Effekt von cGMP von dessen intrazellulärer Konzentration abhängt. Niedrige Konzentrationen von cGMP hemmen die Phosphodiesterase 3 (PDE3), was zu einer Stimulierung der Reninfreisetzung führt, weil die Spaltung von cAMP zu AMP unterbleibt. Im Gegensatz dazu, können hohe Konzentrationen von cGMP auch die cGMP abhängige Kinase II (cGKII) aktivieren. Da eine solche Aktivierung prinzipiell die Stimulation der Reninfreisetzung als Antwort auf cAMP abschwächen kann, würde eine höhere Konzentration an cGMP die Reninfreisetzung unterdrücken (*Kurtz A. et al., 1998*) (**Abb. 3**).

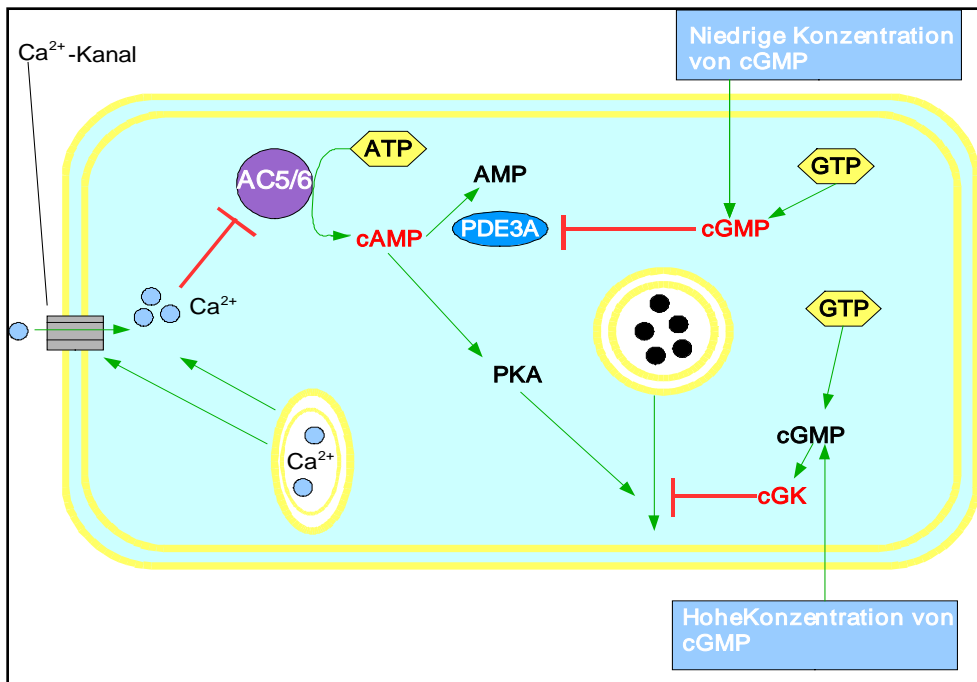
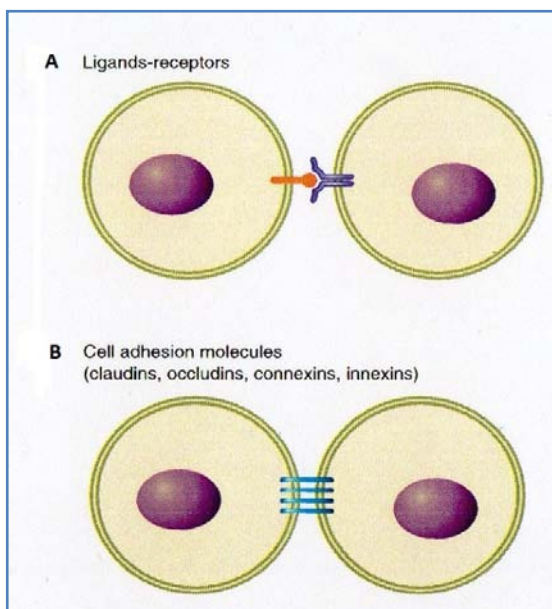


Abb. 3: Intrazelluläre Wirkungsweisen von den sekundären Botenstoffen in reninbildenden Zellen (frei modifiziert nach Schweda F. et al., 2007).

## 2. Kommunikationsmöglichkeiten zwischen einzelnen Zellen

Während der letzten Jahre wurden immer mehr Details darüber bekannt, wie einzelne Zellen untereinander kommunizieren können. Dieser Kontakt zwischen den Zellen ist im Hinblick auf die Funktion verschiedener Gewebe von überragender Bedeutung, da die Zellen dadurch in der Lage sind, ihre Funktionen zu koordinieren und zu synchronisieren. Grundsätzlich kann man bei der Kommunikation zwischen Zellen einen "direkten Weg" und einen "indirekten Weg" unterscheiden. Letztere Bezeichnung rührt daher, dass bei dieser Art des Kontakts stets Signale in den Interzellularraum gelangen müssen, um für einen Informationsaustausch zwischen den Zellen zu sorgen. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist jedoch ausschließlich eine Art der direkten Kommunikation zwischen Zellen von Interesse, weshalb im Folgenden nur auf den "direkten Weg" der Kommunikation eingegangen werden soll.

Eine Möglichkeit der direkten Kommunikation zwischen Zellen ist die Kontaktaufnahme von benachbarten Zellen über das "Liganden- Rezeptor- Prinzip", wobei sich in der Zellmembran der einen Zelle der Rezeptor und in der benachbarten Zelle der passende Ligand befindet (Abb. 4:Abbildung A).



**Abb. 4: Möglichkeiten der direkten Kommunikation zwischen Zellen. Neben der direkten Verbindung zwischen Liganden und Rezeptoren (A) können sich Zellen durch verschiedene Adhäsionsmoleküle miteinander verbinden, u.a. durch Connexine (B)** (Abbildung aus: Bosco D. et al.: *Connexins: Key mediators of endocrine funktion*).

Eine zweite wichtige Form des direkten Kontakts zwischen benachbarten Zellen ist die Verbindung von Zellen durch eine Vielzahl verschiedener Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion glycoprotein=CAM).

CAMs stellen membrandurchspannende integrale Proteine der Zellmembran dar. Diese Art von Verbindungen ist für den Informationsaustausch sehr geeignet, da sie die Membranen von benachbarten Zellen einander annähern. Dies geschieht durch eine Interaktion mit CAM Isoformen, die sich im Extrazellularraum befinden. Gleichzeitig bildet sich eine Verbindung zwischen den CAMs

in der Membran der Zelle und Adapterproteinen im Zytosol, wodurch die Adhäsionsmoleküle mit spezifischen Bestandteilen des Zytoskeletts der Zelle verbunden werden. Durch diese Art des Zellkontakts lassen sich dauerhafte, aber auch transiente Verbindungen zwischen Zellen bilden (**Abb.4: Abbildung B**). Im Bereich der Humanmedizin wurden bereits viele Vorgänge gefunden bei denen diese Art der Kommunikation eine wichtige Rolle spielt. So bilden z.B. Leukozyten transiente Zelladhäsionsmoleküle aus, um in infiziertes Gewebe eindringen zu können. Des Weiteren spielen CAMs u.a. auch eine Rolle bei der Aggregation von Thrombozyten im Rahmen der Blutstillung bei Verletzungen (*Bosco D. et al., 2011 und Silverthorn D., 2009*).

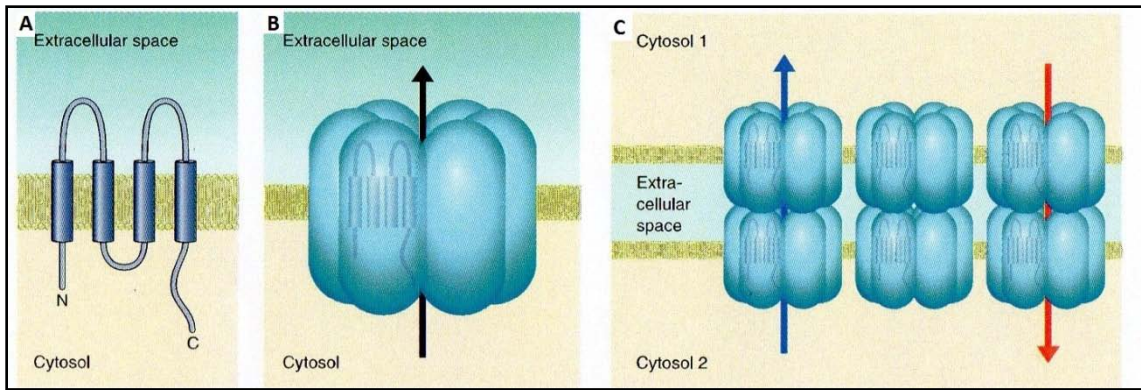
Eine wichtige CAM-Untergruppe sind verschiedene Connexine (Cx) in den Membranen der einzelnen Zellen. Da diese Kommunikation bei der Niere eine dominierende Rolle einnimmt, soll darauf im Folgenden noch genauer eingegangen werden (**Abb. 4:Abbildung B**).

### 2.1 Aufbau und funktionelle Bedeutung von Gap junctions und Hemi-channels

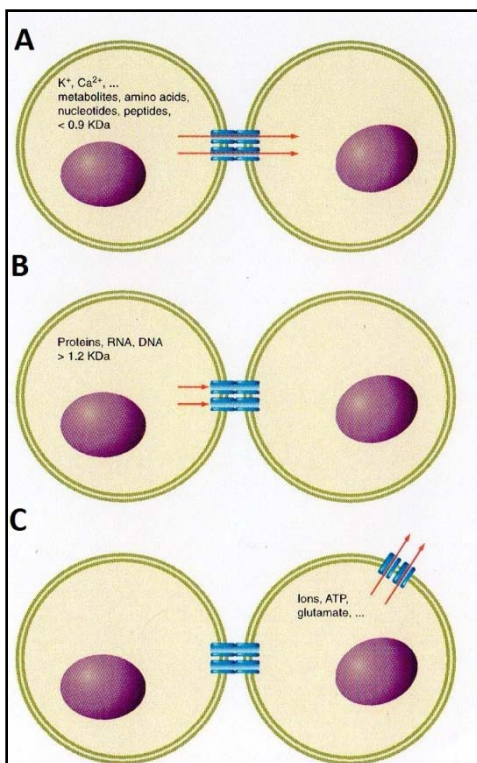
In Bezug auf interzelluläre Kommunikation in der Niere spielen gap junctions eine entscheidende Rolle. Gap junctions werden aus Proteinen, den sog. Connexinen aufgebaut. Bisher sind beim Menschen 21 und bei der Maus 20 verschiedene Gene bekannt, die jeweils für unterschiedliche Connexine kodieren (*Sohl G. et al., 2004*). Die am häufigsten gebrauchte Nomenklatur bzgl. der Connexine setzt sich aus der Abkürzung Cx für Connexin und der jeweiligen molekularen Masse zusammen. Folglich wird das Connexin mit einer molekularen Masse von 40-kDa als Cx-40 bezeichnet. Der Aufbau der verschiedenen Connexine folgt immer dem selben Muster (**Abb. 5 A**): Connexinproteine bestehen aus vier membrandurchspannenden Domänen, die durch zwei extrazelluläre Schleifen und einer intrazellulären Schleife verbunden sind. Die Carboxy- (COOH-Gruppe), und auch die Aminogruppe (NH<sub>2</sub>-Gruppe) sind jeweils intrazellulär lokalisiert. Die membrandurchspannenden Anteile bilden in allen Connexinen  $\alpha$ -helikale Strukturen, die beiden extrazellulären Schleifen unterscheiden sich kaum zwischen den einzelnen Connexinen, während die intrazelluläre Schleife hochgradig variabel ist. In Bezug auf die Enden des Proteins hat sich herausgestellt, dass das NH<sub>2</sub>- Ende in allen Connexinen die gleiche Länge besitzt, während das carboxyterminale Ende in Bezug auf Länge und Sequenz zwischen den einzelnen Isoformen sehr variabel ist. Dies ermöglicht die Bildung von Isoform-spezifischen Antikörpern. Während des Transports zur Zellmembran lagern sich jeweils sechs Connexine zusammen, sodass ein hydrophiler Raum im Zentrum entsteht. Die dabei entstehende Struktur wird als Connexon bezeichnet (**Abb. 5 B**). Schließlich gelangen die Connexons, in den meisten Fällen über einen vesikulären Transport aus dem Golgi-Apparat, in die Plasmamembran der Zelle. Liegt ein Connexon derart in der Membran einer

Zelle, dass es sich in enger Nachbarschaft zu einem Connexon einer anderen Zelle befindet, so können diese beiden Connexons eine "tubuläre" Struktur zwischen sich aufbauen (**Abb. 5C**). Diese interzelluläre Brücke wird als gap junction bezeichnet. Sie erstreckt sich von dem Zytoplasma der einen Zelle über die erste Zellmembran, den Interzellularspalt und die zweite Zellmembran, bis ins Zytoplasma der zweiten Zelle. Das Innere dieses Kanals ist hydrophil und hat einen Durchmesser von 2,5-3 nm. Durch diesen Kanal wird der Austausch u.a. von Ionen, Metaboliten, Nukleotiden, Vitaminen, Kofaktoren und kleinen Peptiden bis zu einer Größe von ca. 900Da ermöglicht (**Abb. 6 A**). Meist können diese Austauschvorgänge in beide Richtungen erfolgen, wobei sie meist nach dem Prinzip der Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten stattfinden. Gap junctions sind hochdynamische Regionen der Zellmembran, da Connexons eine hohe turn-over Rate, also eine kurze Halbwertszeit (ca. 1-5 h) besitzen. In Bezug auf den Zustand von gap junctions unterscheidet man geöffnete, geschlossen aktivierbare und geschlossen inaktivierbare Kanäle. Experimentell lässt sich eine Öffnung durch einen elektrischen Spannungsunterschied entlang des Kanals, durch Erniedrigung des zytosolischen pH-Werts oder durch eine Erhöhung des freien  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol erzeugen (*Bosco D. et al., 2011*). Ob diese Faktoren jedoch auch in vivo eine Rolle spielen, muss noch geklärt werden. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von Medikamenten, die einen Verschluss von gap junctions dadurch bewirken, dass sie sich in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran einlagern. Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch solche Stoffe, die die Öffnungswahrscheinlichkeit bzw. die Durchlässigkeit oder auch die Anzahl der Kanäle erhöhen.

Neben der Bildung von gap junctions ist es generell jedoch auch möglich, dass Connexons in solchen Membranabschnitten eingebaut werden, in denen sie sich nicht in direkter Nachbarschaft zu anderen Zellen befinden. Ist dies der Fall, endet das Connexon in der EZM und wird als sog. Hemi-channel bezeichnet. Die Bedeutung dieser Strukturen für die Niere ist jedoch bisher weitgehend ungeklärt. Generell ist durch diese Strukturen das Ausströmen von zytosolischen Molekülen, v.a. von Glutamat und ATP, möglich, was in Bezug auf den parakrinen Weg der Zellkommunikation von Bedeutung ist (**Abb. 6 C**) (*Sorensen CM et al., 2012*).



**Abb. 5:** Schematischer Aufbau eines Connexins mit vier membrandurchspannenden Elementen, drei Schleifen und dem aminoterminalen- und dem carboxyterminalen- Ende jeweils im Zytosol (A). Sechs Connexine oligomerisieren während des Transports zur Zellmembran zu einem Hemi-channel (B). Lagern sich zwei Hemi-channels von benachbarten Zellen zusammen entstehen gap-junctions (C) (Abbildung frei modifiziert aus Bosco D. et al.: *Connexines: Key mediators of endocrine function*).



**Abb.6:** Funktionelle Bedeutung von gap junctions und Hemi-channels: Gap junctions erlauben den Übertritt vieler verschiedener Moleküle bis zu einer Größe von 0,9 kDa von einer Zelle in eine benachbarte Zelle (A). Der Austausch von Makromolekülen (> 1.2k Da), wie von Proteinen, ist nicht möglich (B). Hemi-channels ermöglichen die Freisetzung zytosolischer Moleküle und Ionen in die EZM (C) (Abbildung aus Bosco D. et al.: *Connexines: Key mediators of endocrine Function*).

## **2.2 Connexine des renalen Gefäßsystems**

In Bezug auf die Niere spielen Connexine eine herausragende Rolle, da die Zellen, die den juxtaglomerulären Apparat (JGA) bilden durch eine Vielzahl von Connexinen verbunden sind. Durch die intensive Kopplung bildet der JGA ein funktionelles Synzytium, das den präglomerulären Gefäßtonus der Arteriolen, die GFR und die Aktivität des Reninsystems beeinflusst. Innerhalb des JGA bilden die juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen) gap junctions zu benachbarten Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Zellen des extraglomerulären Mesangiums und untereinander aus. Dabei ist es typisch für die JG-Zellen, dass ihre gap junctions vor allem aus Cx-40 aufgebaut sind. In geringerem Maße wird auch Cx-37 (Wagner C. et al., 2009) und Cx-43 (Kurtz L. et al., 2009) im JGA exprimiert, der dominanten Expression von Cx-40 kommt jedoch vermutlich eine sehr wichtige funktionelle Bedeutung zu. Die Expression von diesen drei verschiedenen Connexinen ist charakteristisch für Zellen, die Renin bilden und sich in der typischen juxtaglomerulären Position befinden. Im Gegensatz dazu findet sich bei fötalen oder durch Stimulation rekrutierten reninbildenden Zellen, nur eine Cx-40 Expression (Kurtz L. et al., 2009). Connexine findet man nicht nur im JGA, sondern z.B. in Form von Cx-45 auch in Nierengefäßen.

### **2.2.1 Intrarenale Verteilung und funktionelle Bedeutung von Connexin-37, Connexin-43 und Connexin-45**

Durch die Entwicklung von spezifischen Antikörpern, die sich selektiv jeweils nur gegen eine Connexinisoform richten, konnte man die Verteilung der verschiedenen Connexine in der Niere genau erfassen.

#### **Connexin-37**

Cx-37 wird im juxtaglomerulären Bereich der Niere exprimiert, und ist hier im präglomerulären Endothel, und in geringem Maße in reninbildenden Zellen zu finden (Arensbak B. et al., 2001). Mäuse mit einem globalen Cx-37 knock-out zeigen im Unterschied zu Mäusen mit einem globalen Cx-40 knock-out eine normale Reninsekretion ohne Erhöhung des Plasmoreninspiegels (Wagner C. et al., 2009). Die Reninzellen befinden sich nicht in ektoper Position (Wagner C. et al., 2009) und die Versuchstiere zeigen einen normalen Blutdruck (Figueroa XF. et al., 2008). Diese Befunde deuten

darauf hin, dass Cx-37 keine essentielle Bedeutung bei der Kontrolle der Reninsekretion hat. Man beobachtete jedoch, dass die pharmakologische Blockade von Cx-37 durch die Peptide GAP27 und CPX zu einer leicht erhöhten Reninfreisetzung führte (Takenaka T. et al., 2008). In diesem Zusammenhang kam es jedoch auch zu einer Vasokonstriktion der Nierengefäße durch dieses Peptid, sodass man die erhöhte Reninsekretion eher als Folge einer verminderten Nierendurchblutung ansieht (Takenaka T. et al., 2008).

### Connexin-43

Connexin-43 findet sich v.a. in Endothelzellen und nicht oder nur in geringem Maße in reninproduzierenden Zellen. Die Relevanz von Cx-43 in Bezug auf die korrekte Funktion der JG-Zellen ist noch nicht klar. Mäuse, bei denen Cx-43 global durch Cx-32 (Cx43KI32) ersetzt wurde (Haefliger JA. et al., 2006), das normalerweise nicht im juxtaglomerulären Bereich gebildet wird (Barajas L. et al., 1994), wiesen einen deutlich geringeren Reninspiegel auf als Wildtypen. Im Normalfall führt eine unilaterale Nierenarterienstenose auf Grund des verminderten Perfusionsdrucks sowohl zu einer erhöhten Reninsynthese und Reninsekretion in der betroffenen Niere als auch zu einer verminderten Freisetzung in der kontralateralen Niere. In Cx-43KI32 Mäusen hatte eine Nierenarterienstenose jedoch keinen Einfluss auf die Reninsynthese und Reninsekretion der betroffenen Niere (Haefliger JA. et al., 2006). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch Cx-43 eine Rolle bei der druckabhängigen Regulation des Reninsystems spielt (Castrop H. et al., 2010). Aus Mäusen mit reninzellspezifischer Deletion des Cx-43 Gens- eine globale Deletion ist letal- entwickeln sich jedoch Tiere mit einer normalen Regulation der Reninsekretion, des Blutdrucks und mit normal positionierten Reninzellen. Folglich könnte ein Ersatz von Cx-43 durch Cx-32 einen eher indirekten Einfluss auf die Reninsekretion haben. Dieser könnte durch Endothelzellen vermittelt werden, welche ebenfalls Cx-43 ausbilden (Haefliger JA. et al., 2004), da sich die Veränderungen in Bezug auf die Reninsynthese und Reninsekretion nur in den Mäusen ergaben, in denen auch in den Endothelzellen Cx-43 fehlte. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass Prostacyclin über den cAMP Weg die Reninsekretion fördert (Krämer B. et al., 1994). So könnte es möglich sein, dass endothelial exprimiertes Cx-43 für die Regulation der Prostacyclinbildung wichtig sein könnte, wobei durch den globalen Ersatz von Cx-43 durch Cx-32 die Bildung dieses Stimulus gestört sein könnte, was eine verminderte Reninsekretion zur Folge hätte. Da die reninzellspezifische Deletion von Cx-43 keinen Einfluss auf die Endothelzellen hat, blieben die Prostacyclinbildung und somit auch die Reninsynthese unbeeinflusst (Wagner C. et al., 2012).

## Connexin-45

Connexin-45 wird in glatten Muskelzellen der präglomerulären Gefäße exprimiert. Es gibt jedoch unterschiedliche Daten bezüglich der Expression von Cx-45 in Reninzellen. Auch existieren kontroverse Daten darüber, ob, und wenn ja welche Rolle Cx-45 in Bezug auf die Kontrolle der Reninsekretion spielt. Die spezifische Deletion von Cx-45 in Reninzellen zeigte keinerlei Veränderungen in der Kontrolle der Reninsekretion und verursachte keine Hypertension in diesem Versuchsmodell. In einer weiteren Studie wurde die Cre Rekombinase unter die Kontrolle des Nestin-Promotors gebracht, was zu einem leichten Anstieg des Blutdrucks und der Plasmareninkonzentration führte, weshalb man darauf schließen könnte, dass Cx-45 eine ähnliche Rolle für das Reninsystem spielen könnte wie Cx-40 (Wagner C. et al., 2012).

### 2.2.2 Intrarenale Verteilung und funktionelle Bedeutung von Connexin-40

Cx-40 wird im intra- und extraglomerulären Mesangium, in reninsezernierenden Zellen und im Endothel von präglomerulären Gefäßen, einschließlich afferenter Arteriolen exprimiert.

In Wildtypmäusen wird die Reninsekretion durch einen negativen Feedback-Mechanismus kontrolliert. Der Abfall des renalen Perfusionsdrucks steigert die Reninsekretion in der Niere und führt kompensatorisch zur Erhöhung des Blutdrucks. Ist hingegen der Blutdruck zu hoch, reagiert die Niere mit einer verminderten Reninsekretion, um den Blutdruck zu senken (Wagner C. et al., 1998 a). Diese Kontrolle der Reninsekretion basiert auf dem sog. "renalen Barorezeptor Mechanismus". Dieser Ausdruck beschreibt die inverse Beziehung zwischen der intrarenalen Durchblutung und der Reninfreisetzung. Bis heute ist die Funktionsweise von diesem Mechanismus jedoch noch nicht vollständig geklärt. In Bezug auf Cx-40 hat sich jedoch gezeigt, dass die inverse Beziehung zwischen Reninsekretion und Blutdruck zu einer positiv linearen Beziehung wird, wenn der Niere die intakte zelluläre Kopplung mittels Cx-40 fehlt (**Abb. 7**). Die Erklärung für diese außergewöhnliche Kombination aus hohem Blutdruck und hoher Plasmareninkonzentration könnte sein, dass über Cx-40 gap junctions inhibitorische Signale auf die JGE-Zellen übermittelt werden, was nach einer Deletion von Cx-40 nicht mehr möglich ist. Mäuse mit einem globalen Cx-40 knock-out haben demzufolge Bluthochdruck und weisen erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem Renin auf. Da sich die Hypertension durch Verabreichung von Medikamenten, die in das RAAS eingreifen (ACE-Hemmer oder AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker) verbessern lässt (de Wit C. et al., 2003), betrachtet man die erhöhte Reninkonzentration als ursächlich für den Bluthochdruck (Castrop H. et al., 2010). In einer

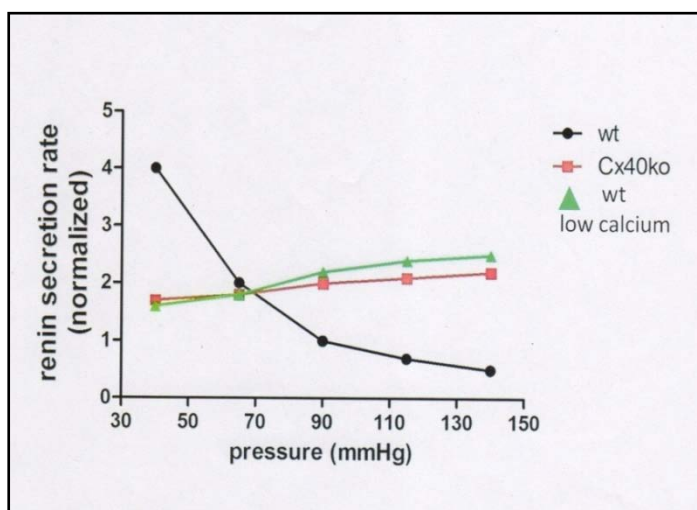
Reihe weiterführender Untersuchungen mit zellspezifischen Cx-40 knock-out Modellen wurde versucht, die Cx-40 gap junctions ausfindig zu machen, die für den Barorezeptormechanismus von Bedeutung sind. Dabei kam man zu den in **Tab. 2** dargestellten Ergebnissen:

**Tab.2: Auswirkungen eines zellspezifischen Cx 40 knock- outs auf den Blutdruck und die Reninsekretion ( frei erstellt nach: Wagner C. et al.: Cell to cell communication in renin producing cells )**

Zellspezifische Deletion von Cx-40 in	Effekt auf den Blutdruck und die Reninsekretion	Deutung
präglomerulären Endothelzellen	Keine Veränderung des Blutdrucks und der Reninsekretion	gap junctions zwischen Endothelzellen und reninproduzierenden Zellen sind von untergeordneter Bedeutung für den Barorezeptormechanismus
reninproduzierenden Zellen	Hypertension und erhöhte Konzentration an freigesetztem Renin (selber Phänotyp wie bei generellem Cx-40 knock-out)	gap junctions zwischen reninproduzierenden Zellen und wahrscheinlich auch zwischen reninproduzierenden Zellen und Mesangiumszellen sind von fundamentaler Bedeutung für den Barorezeptormechanismus

Des Weiteren vermutet man heute, dass auch durch Cx-40 gebildete Hemi-channels eine wichtige Rolle spielen könnten. Es wäre denkbar, dass durch diese Strukturen Signalmoleküle in die Umgebung freigesetzt werden könnten, welche parakrin wirken könnten. Das vielversprechendste unter diesen Molekülen scheint ATP zu sein, welches wiederum an Oberflächenrezeptoren von Zellen binden und dadurch eine Mobilisierung von Calcium bewirken könnte (Sipos A. et al., 2009). Das freigesetzte  $Ca^{2+}$  könnte wiederum die Reninfreisetzung hemmen. Noch nicht abschließend geklärt ist, welche Signale bzw. Moleküle beim Barorezeptormechanismus die durch Cx-40 gebildeten gap junctions bzw. Hemi-channels passieren. Zahlreiche Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass  $Ca^{2+}$  von entscheidender Bedeutung sein könnte. Im Normalfall inhibiert eine steigende intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration die

Reninfreisetzung (= "Calciumparadoxon"; vgl. Einleitung S. 15). Bei steigender Nierendurchblutung steigt gleichzeitig der transmembranöse Calciumeinstrom in die Reninzelle, was zu einer Hemmung der weiteren Reninfreisetzung führt. Bei einer Erniedrigung von  $\text{Ca}^{2+}$  in der extrazellulären Flüssigkeit lässt sich der gegenteilige Effekt beobachten, d.h. mit steigender Durchblutung steigt auch die Reninfreisetzung (**Abb. 7**) (Scholz H. et al., 1994). Dieses Phänomen gleicht also, in Bezug auf die Beziehung zwischen Durchblutung und Reninfreisetzung, dem einer Cx-40 Deletion (Wagner C. et al., 2007). Interessanterweise vermag eine erniedrigte extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration jedoch nur in Wildtypen eine erhöhte Reninfreisetzung, bei gleichzeitig steigendem Blutdruck, zu bewirken. Liegt ein Cx-40 knock-out vor, oder wird Cx-40 durch Cx-45 ersetzt, also immer wenn der Barorezeptormechanismus verändert wird, lässt sich dieses Phänomen nicht beobachten (Schweda F. et al., 2009 und Wagner C. et al., 2007). Um genaueres über die Moleküle herauszufinden, die beim Barorezeptormechanismus die gap junctions bzw. Hemi-channels passieren, untersuchte man, ob die Funktion von Cx-40 in reninproduzierenden Zellen auch durch andere Connexine ausgeführt werden kann. Aus diesem Grund ersetzte man experimentell Cx-40 durch Cx-45, das man normalerweise in glatten Muskelzellen im Bereich der präglomerulären Region findet. Funktionell unterscheiden sich gap junctions, die von Cx-45 aufgebaut werden, von solchen die durch Cx-40 aufgebaut werden, v.a. dadurch, dass sie eine geringere elektrische Leitfähigkeit aufweisen. Auch wird durch cAMP die Durchlässigkeit von Cx-40 gap junctions erhöht, während die von Cx-45 gap junctions erniedrigt wird. Hinsichtlich des Reninsystems stellte sich heraus, dass ein Ersatz von Cx-40 durch Cx-45 zu einem weniger ausgeprägten Bluthochdruck, als im Cx-40 knock-out führte. Jedoch besteht auch in diesem



**Abb. 7:** Die Reninsekretion in Abhängigkeit von der Nierendurchblutung. In Wildtypen (schwarz) liegt eine inverse Beziehung vor. Bei einem Cx-40 knock-out Tier (rot) entwickelt sich eine positive lineare Beziehung. Selbiges gilt bei einer Erniedrigung der Calciumkonzentration in der EZM bei Wildtypen (grün) (aus Wagner C. et al.: Cell to cell communication in renin producing cells).

Fall eine veränderte Beziehung zwischen der Nierendurchblutung und der Reninsekretion. Somit kann man letztlich sagen, dass die Substitution des Cx-40 Gens durch funktionelles Cx-45 den renalen Phänotyp im Vergleich zu einer Cx-40 Deletion deutlich milder beeinflusst (Schweda F. et al., 2009).

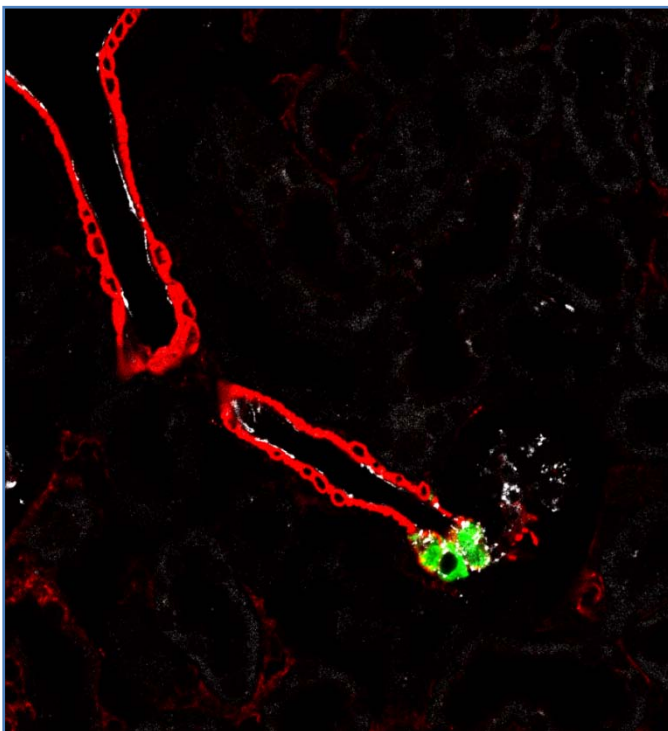
Eine mögliche Schlussfolgerung aus den oben gezeigten Veränderungen wäre, dass Cx-40, bzw. die daraus gebildeten gap junctions und/oder Hemi-channels, von essentieller Bedeutung für die

Ausbreitung von Calcium zwischen den Reninzellen und damit letztlich für den Barorezeptormechanismus sind.

Neben diesen Versuchen an genetisch veränderten Mäusen wurden auch zahlreiche pharmakologische Experimente durchgeführt, um die Bedeutung von Cx-40 in Bezug auf die Reninsekretion zu zeigen. Die Substanz 18- $\alpha$ -GA (glycyrrhetinic acid; (3 $\beta$ )-3-Hydroxy-11-oxoolean-12-en-30-säure) ist ein nicht selektiver Blocker von gap junctions. Wird es Mäusen verabreicht, so kommt es, wie bei einem Cx-40 knock-out Tier, zu einer Aufhebung der druckabhängigen Reninsekretion (Wagner C. et al., 2012).

### 2.2.3 Einfluss von Connexin-40 auf die Position von Reninzellen

Reninproduzierende Zellen und glatte Muskelzellen haben gemeinsame Vorläuferzellen, wobei die Reninzellen ab Embryonaltag 16(=E16) glatte Muskulatur aufweisen, sodass die Entstehung der glatten Muskelzellen als Ereignis im Rahmen der Transformation von JG-Zellen angesehen wird (Sequeira Lopez ML. et al., 2001). Während der Entwicklung des renalen Gefäßbaums zeigt das Reninsystem eine hohe Aktivität (Gomez RA. et al., 1995). Reninzellen treten in der Wand großer präglomerulärer Gefäße auf und verlagern sich mit fortschreitender Nierenentwicklung in immer



kleinere renale Arterien, sodass in der erwachsenen Niere eine Reninexpression nur noch in typischer juxtaglomerulärer Position am terminalen Ende der afferenten Arteriole, kurz vor dem Eintritt in das Kapillarnetzwerk zu beobachten ist (Abb. 8).

**Abb. 8:** Typische juxtaglomeruläre Position von Reninzellen im Bereich des terminalen Abschnitts der afferenten Arteriole in einer unstimulierten adulten Wildtypmaus. In der Abbildung sind die Reninzellen grün, das Glattmuskelaktin der afferenten Arteriole rot und Cx-40 weiß dargestellt.

Die zellulären Mechanismen, die in

diesem Zusammenhang für diese Veränderungen der Reninexpression während der Nierenentwicklung sorgen, sind bislang noch unzureichend untersucht. Auch in der ausgereiften Niere ist die Expression von Renin plastisch. Bei chronischer Stimulation, beispielsweise durch eine verstärkte Sympathikusaktivität oder durch eine Nidrigsalzdiät, werden retrograd im Vas afferens Zellen zur Reninsynthese herangezogen (Kurtz L. et al., 2007).

Die Arbeit von Kurtz L. et al., 2007 zeigte in Wildtypen die typische Beschränkung der Reninexpression auf den Gefäßpol des Glomerulus, wobei diese Zellen in die Media dieses Gefäßes integriert waren und auf Grund der Reninvesikel in ihrem Zytosol ein epitheloidartiges Aussehen zeigten. Im Unterschied dazu ist die Zahl an Reninzellen in adulten Cx-40<sup>-/-</sup> Nieren (= Nieren mit einem homozygoten knock-out von Cx-40) deutlich erhöht und das epitheloidartige Aussehen verloren. Äußerst bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Reninzellen in Cx-40<sup>-/-</sup> Nieren nicht in die Gefäßwand integriert sind, dafür aber Zellen des extraglomerulären Mesangiums und des periglomerulären Interstitiums Renin bilden. In größeren Gefäßen wurde keine Reninexpression gefunden. Wird das RAAS in Wildtypen stimuliert, z.B. durch eine Nidrigsalzdiät in Kombination mit dem ACE-Hemmer Ramipril, kommt es zu einer verstärkten Reninproduktion und zu einer retrograden Rekrutierung von Reninzellen entlang der afferenten Arteriole. Die Arbeit von Neubauer B. et al. aus dem Jahre 2013 zeigte, dass sich bei langer Stimulation des RAAS von Wildtypen zusätzlich eine periglomerulär-vaskuläre Reninexpression beobachten lässt. In Cx-40 knock-out Tieren dagegen findet keine retrograde Rekrutierung statt. Stattdessen steigt lediglich die Anzahl an Reninzellen im periglomerulären Bereich.

Um das Reninverteilungsmuster in Cx-40<sup>-/-</sup> Mäusen genauer bestimmen zu können, wurden 3D-Rekonstruktionen des periglomerulären Gefäßbaumes und der Reninexpression erstellt. In Bezug auf die Gefäße und Glomeruli finden sich keine Unterschiede zwischen Wildtypen und knock-out Tieren. Hingegen findet sich auch bei dieser Darstellungsweise eine prominente periglomeruläre Dislokation von Reninzellen in adulten Nieren, die sich vor allem unter Stimulation des RAAS zeigt. Bei der Betrachtung von 3D-Darstellungen von Gefäßbäumen während der Nierenentwicklung treten in Bezug auf die Gefäßmorphologie keine Unterschiede zwischen Wildtypen und knock-out Mäusen auf. Auch die Verteilung von Reninzellen ist während der fötalen Entwicklung zwischen den beiden Genotypen weitgehend unverändert, was bedeutet, dass Cx-40 für die Positionierung von Reninzellen nach dem fötal/ pernatalen Expressionsmuster entlang großer präglomerulärer Gefäße keine Bedeutung hat (Kurtz L. et al., 2007). Jedoch treten große Unterschiede in der Reninexpression auf, sobald diese während der Entwicklung die terminalen Abschnitte der afferenten Arteriole erreicht. Dann finden sich reninbildende Zellen in ektopen Positionen, d. h. außerhalb der Tunica media der afferenten Arteriole, im periglomerulären Interstitium, in Zellen des Glomerulus und in

den Zellen, die das parietale Blatt der Bowmanschen-Kapsel bilden (*Wagner C. et al., 2012* und *Castrop H. et al., 2010*). Immunfluoreszenzbilder von Cx-40 defizienten Nieren, einen Tag nach der Geburt (pp1) zeigen deutlich, dass die Dislokation von Reninzellen genau zu diesem Zeitpunkt beginnt (*Kurtz L. et al., 2007*). Auf Grund der anfangs normalen Entwicklung der Reninexpression und der sich schließlich im Bereich der terminalen Arteriolen entwickelnden ektopen Zellen, könnte man annehmen, dass Cx-40 für die Expression fötaler Reninzellen keine entscheidende Rolle spielt, für das "homing" der Reninzellen im JGA jedoch einen essentiellen Faktor darstellt. Je älter diese Mäuse werden, desto höher ist die Dichte an Reninzellen in ektopen Positionen, wobei die Konzentration an zirkulierendem Renin parallel immer weiter ansteigt. Wird unter experimentellen Bedingungen eine chronische Stimulation der Reninsekretion herbeigeführt, steigt die Zahl der ektopen Reninzellen jedoch bereits in jungen Mäusen an (*Wagner C. et al., 2012*).

#### **2.2.4 Mutationen im humanen Connexin-40 Gen**

In einigen Studien wurde bereits gezeigt, dass das Verteilungsmuster von Connexin-40 in Mäusen und Ratten dem Verteilungsmuster von Connexin-40 im Menschen sehr ähnlich ist (*Kurtz L. et al., 2010*). Aus diesem Grund soll hier auf Auswirkungen von Mutationen im menschlichen Connexin-40 Gen eingegangen werden.

Die Arbeit von *Gollob M.H. et al.* von 2006 hat gezeigt, dass Connexin-40 zuweilen eine wichtige Rolle in Bezug auf die Entstehung von Vorhofflimmern am Herzen spielen kann. In Bezug auf das idiopatische Vorhofflimmern nahmen *Gollob M.H. et al.* an, dass dieses durch somatische Mutationen ausgelöst werden kann, weswegen sie das GJA5 Gen untersuchten, das für Connexin-40 codiert (*Gollob M.H. et al., 2006*). Im Herzen spielen aus Cx-40 aufgebaute gap junctions bei der elektrischen Leitung im Vorhof eine entscheidende Rolle (*Gollob M.H. et al., 2006*). Bei 4 von 15 Patienten mit idiopatischem Vorhofflimmern fanden *Gollob M.H. et al.* vier neue heterozygote Mutationen somatischer Natur in der hochkonservierten membrandurchspannenden Domäne von Connexin-40. Eine dieser Mutationen führte dazu, dass die Zellen untereinander keine nachweisbaren gap junctions mehr ausbildeten, da es zu einer intrazellulären Retention von Connexin-40 kam. In Bezug auf die elektrophysiologische Funktion zeigte sich bei dieser Art von Mutation, dass keine Leitfähigkeit mehr vorhanden war. Bei anderen Mutationen kam es dazu, dass die elektrische Leitfähigkeit vermindert oder gar nicht vorhanden war. In Oozyten, die eine Koexpression von mutiertem und normalem Connexin-40 aufwiesen, waren die Zell-Zell-Kontakte deutlich gestört, was zeigt, dass mutiertes Connexin-40 hemmend in Bezug auf die Aktivität von

normalem Cx-40 wirkt (Gollob M.H. et al., 2006). Auch wurde gezeigt, dass mutiertes Connexin-40 die funktionelle Kopplung von wildtyp Connexin-43 verhindern kann (Gollob M.H. et al., 2006).

Eine Mutation von Connexin-40 spielt aber wahrscheinlich auch bei der Entstehung einer reninbedingten Hypertension eine Rolle. Liegt eine Deletion des DNA-Abschnitts, der für Connexin-40 kodiert, in Reninzellen vor, führt dies in Mäusen zu erhöhten Reninspiegeln im Plasma, weil der negative Feedback-Mechanismus, der zwischen renaler Perfusion und Reninausschüttung besteht, unterbrochen wird (vgl. 2.2.2), was letztlich eine Hypertension zur Folge hat. Man untersuchte deshalb Patienten, bei dem die Aminosäure Alanin an Position 96 im Connexin-40 durch Serin ersetzt war (A96S Mutation im Cx-40) (Lübke meier I. et al., 2011). Neben Vorhofflimmern zeigte sich beim Patienten auch eine behandlungsbedürftige Hypertonie. Auf Grund der Annahme, dass die Reninsekretion in Mäusen und im Menschen ähnlich geregelt ist, untersuchte man Mäuse, die dieselbe Mutation aufwiesen. Messungen ergaben einen erhöhten Blutdruck, der auf eine 6-fach erhöhte Plasmaninkonzentration zurückzuführen war (Lübke meier I. et al., 2011). Auch wiesen diese Mäuse einen defekten negativen Feedback-Mechanismus in Bezug auf renale Durchblutung und Reninsekretion auf, da die Reninsekretion fast unabhängig vom Blutdruck war. Des Weiteren war die Leitfähigkeit von Cx-40A96S gap junctions deutlich herabgesetzt (Lübke meier I. et al., 2011). Die Lokalisation der Reninzellen unterschied sich deutlich vom Wildtyp, da sich die Zellen außerhalb der Media der afferenten Arteriole im Interstitium befanden, die Anzahl an Reninzellen war jedoch im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Lübke meier I. et al., 2011). Auf Grund von diesen Ergebnissen könnte es gut möglich sein, dass die Hypertension des oben beschriebenen Patienten auf Grund der A96S Mutation im Connexin-40 entstand.

Außerdem zeigten Firouzi M. et al. 2006, dass bestimmte Polymorphismen, die sich im Promotorbereich des humanen Connexin-40 Gens befinden, bei Männern zu einem erhöhten Risiko führen, eine Hypertonie zu entwickeln (Firouzi M. et al., 2006). Beim Vergleich einer Population mit essentieller Hypertonie mit einer normotensiven Population war kein Zusammenhang zwischen dem Connexin-40 Genotyp und dem Risiko für Hypertension erkennbar. Wurden diese Populationen jedoch nach Geschlecht stratifiziert ergab sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen einem bestimmten Polymorphismus im Connexin-40 Gen und der Hypertonie bei Männern, da der Polymorphismus bei hypertensiven Männern deutlich häufiger auftrat als bei Normotensiven (Firouzi M. et al., 2006). In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, ob man anhand von Alter, Gewicht, BMI, Raucherstatus oder einem Polymorphismus im Connexin-40 Gen eine Vorhersage bezüglich des Hypertonierisikos machen kann. Dabei zeigte sich, dass dies bei Frauen nur anhand des BMI möglich war, während sich im Gegensatz dazu der Polymorphismus im Cx-40 Gen bei Männern dafür eignete (Firouzi M. et al., 2006).

### 3. Das Medikament Tamoxifen in Forschung und Klinik

#### 3.1 Prinzip der Tamoxifen-induzierten Gendeletion

Das Medikament Tamoxifen wird sowohl in der Humanmedizin zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt als auch in der experimentellen Forschung zur Generierung von knock-out Tieren.

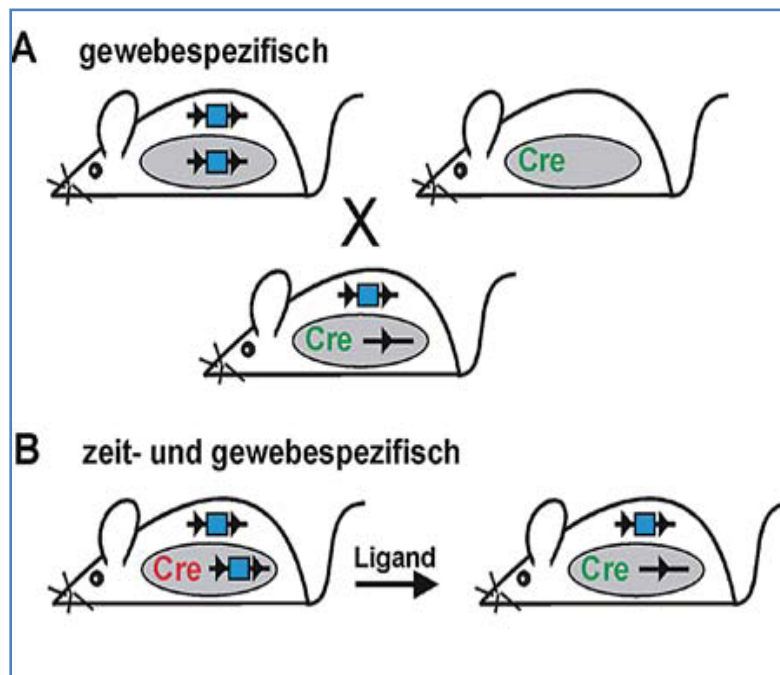
Eine wichtige Rolle in Bezug auf eine durch Tamoxifen induzierte Gendeletion spielt der Vorgang der Rekombination, der in allen Organismen vorkommt und bei dem es mit Hilfe der katalytischen Wirkung von Rekombinasen zu einer Spaltung und einer anschließenden Neuverknüpfung der DNA kommt, was unter anderem die Reparatur von Mutationen ermöglicht. Ein häufig verwendetes Rekombinationssystem leitet sich von der Cre-Rekombinase (cyclization recombinaton) ab, welche die Rekombination von zwei loxP- Erkennungssequenzen (**locus of X-over P1**) katalysiert (*Lukowski R. et al., 2005*). Diese Cre- Recombinase wurde aus dem Bakteriophagen P1 isoliert (*Hoess RH et al., 1983*). Liegt eine chromosomale DNA-Sequenz zwischen zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen, wird sie als "gefloxtes" DNA-Segment bezeichnet. Dieses kann aus dem Chromosom in vivo herausgeschnitten und intrazellulär abgebaut werden (*Hoess RH. et al., 1985*).

Um Mäuse mit einer Cre/loxP-vermittelten Gendeletion zu erzeugen, werden zwei genetisch veränderte Mauslinien benötigt (**Abb. 9 A**). Die Mäuse der einen Linie tragen den loxP-flankierten Genausschnitt, der deletiert werden soll ("gefloxte Zielmaus"). Bei diesem Ausschnitt handelt es sich meist um ein wichtiges Exon des Zielgens, das von Introns flankiert wird. Die loxP- Sequenzen werden so in die Introns eingebracht, dass das gefloxtes Gen funktionsfähig bleibt und sich die Zielmaus phänotypisch nicht vom Wildtyp unterscheidet. Die Mäuse der anderen Linie exprimieren die Cre-Rekombinase nur in bestimmten Zelltypen ("gewebespezifische Cre- Maus"). Die Auswahl des Promotors unter dessen Kontrolle die Rekombinase steht, entscheidet darüber in welchen Geweben die Rekombinase exprimiert wird (*Lukowski R. et al., 2005 und Metz D. et al., 1999*).

In einem nächsten Schritt werden diese beiden Linien untereinander gekreuzt (**Abb. 9 A**). Dies führt dazu, dass der gefloxtes Genausschnitt in allen Zellen ausgeschnitten wird, in denen die Cre-Rekombinase exprimiert wird (*Lukowski R. et al., 2005*).

Diese Methode wurde in letzter Zeit insofern weiterentwickelt, als dass es gelungen ist, neben der Gewebespezifität der Rekombinase deren Aktivität auch zeitlich zu kontrollieren (**Abb. 9 B**). Hierfür

kann sowohl die Transkription von Cre als auch die Rekombinaseaktivität posttranslational reguliert werden. Letzteres wurde durch die Entwicklung von liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinasen erreicht. Hierbei handelt es sich um Fusionsproteine, die aus Cre und mutierten Ligandenbindungsdomänen von Steroidrezeptoren (z.B. von Östrogenrezeptoren) aufgebaut sind (Lukowski R. et al., 2005). Diese Bindungsdomänen weisen keine Affinität zu endogenen Liganden



**Abb. 9:** Herstellung einer gewebespezifischen Gendeletion (A): Eine geflochte Zielmaus (links, Dreiecke stellen loxP-Sequenzen dar und blaue Vierecke ein Exon) wird mit einer gewebespezifischen Cre-Maus verkreuzt (rechts). Die Excision des Exons findet nur in den Zellen statt, in denen der Promotor aktiv ist (graue Ellipse).

Eine zeitliche Kontrolle der Gendeletion (B) kann durch die Verwendung von Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinasen erfolgen, die zunächst inaktiv sind (rot) und erst nach Gabe eines nicht-endogenen Liganden (z.B. Tamoxifen) aktiviert werden (frei modifiziert nach Lukowski R. et al.: Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus 2005).

auf (z.B. Östradiol) und können somit erst durch die Verabreichung von synthetischen Liganden aktiviert werden (Lukowski R. et al., 2005). An dieser Stelle macht man sich die spezifische Eigenschaft des Moleküls Tamoxifen zunutze, das an den zytoplasmatisch lokalisierten Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) (vgl. Abb. 10) bindet. Somit kann durch die Verabreichung von Tamoxifen genau festgelegt werden, zu welchem Zeitpunkt eine Gendeletion (z.B. des Connexin 40 Gen) erfolgen soll. Zusammenfassend ermöglicht damit die Methode der gewebespezifischen Expression einer liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase eine örtlich und zeitlich kontrollierte Induktion der Gendeletion.

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäusen war die Expression der Cre-Rekombinase ubiquitär, jedoch wurde ihre Aktivität durch die Verabreichung von Tamoxifen zeitlich festgelegt.

### 3.2 Klinische Relevanz von Tamoxifen

Tamoxifen (IUPAC: (Z)-2-[4-(1,2-Diphenylbut-1-enyl) phenoxy]-N,N-dimethylethylamin, C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO) wird im Bereich der Humanmedizin zur Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt. Beim Brustkrebs handelt es sich um die häufigste Krebserkrankung der Frau, da ca. jede neunte Frau an diesem oder an einer der Vorstufen erkrankt. Meist befindet sich das Karzinom im oberen äußeren Quadranten der weiblichen Brust, wobei man je nach Entstehungsort histologisch zwei verschiedene Arten unterscheiden kann. In den meisten Fällen (85 -90 %) findet sich ein duktales Mammakarzinom, das aus den Epithelien der Milchgänge entsteht und entweder invasiv wächst, oder als duktales Carcinoma in situ (DCIS) die Milchgänge der Mamma auskleidet und diese nach und nach erweitert. Demgegenüber sind lobuläre Karzinome mit 10-15 % eher selten. Diese Art des Karzinoms entsteht aus den Drüsenazini und kann sich entweder als lobuläres Carcinoma in situ (LCIS), oder als invasiv wachsender Tumor ausbreiten. Unabhängig von der genauen Tumorentität spielt der Rezeptorstatus der Krebszellen für die Einteilung und Prognose, aber auch für die Therapieoptionen eine entscheidende Rolle. Viele Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Progesteron und Her2/neu-Rezeptoren, zusätzlich ist die Anwesenheit von intrazellulären Östrogenrezeptoren möglich. In Bezug auf die Prognose beim Mammakarzinom hat sich gezeigt, dass ein positiver Her2/neu-Rezeptorstatus sowie ein ansonsten negativer Hormonrezeptorstatus einen prognostisch ungünstigen Krankheitsverlauf erwarten lassen. Bezüglich einer systemischen pharmakologischen Therapie stehen grundsätzlich Chemotherapien, endokrine Therapien, Immuntherapien oder Kombinationstherapien zur Verfügung. Bevor mit einer Therapie begonnen wird, wird eine Risikoeinstufung vorgenommen, die die individuelle Tumorbilologie bei jeder Patientin erfasst (**Tab. 3**), wobei auch hier der Hormonrezeptorstatus von großer Bedeutung ist (*Ackermann H., 2012*).

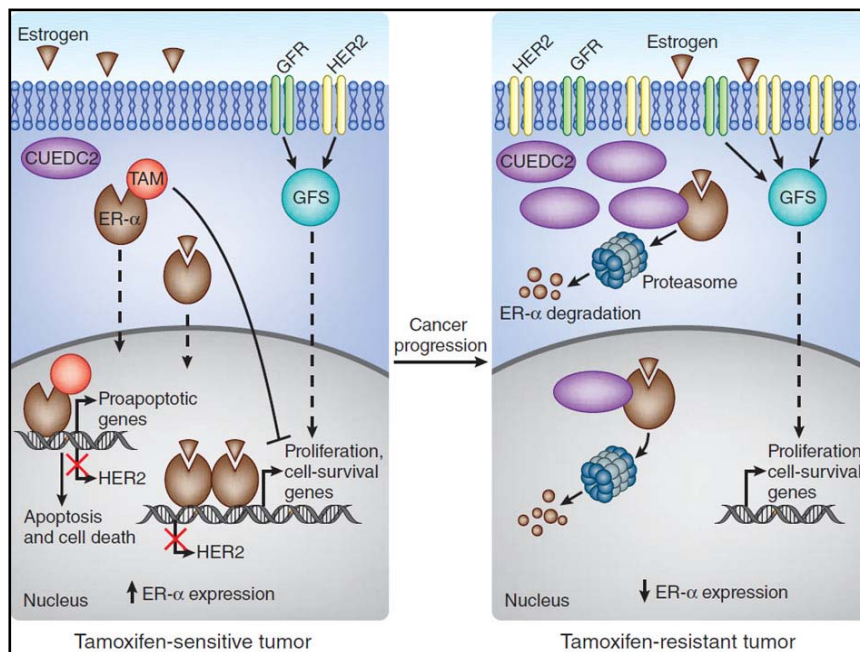
Tab. 3: Risikoeinstufung nach Konsensus St. Gallen 2007; 2009 bestätigt (frei erstellt nach Ackermann H. et al.)

niedriges Risiko	mittleres Risiko	hohes Risiko
<b>NO und Erfüllung folgender Parameter:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pT ≤ 2cm</li> <li>• G I</li> <li>• V0</li> <li>• ER positiv oder PR positiv</li> <li>• Her2/neu negativ</li> <li>• Alter: ≥ 35 Jahre</li> </ul>	<b>NO und Erfüllung eines Parameters:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pT &gt; 2cm</li> <li>• G II/ G III</li> <li>• V1</li> <li>• ER negativ und PR negativ</li> <li>• Her2/neu positiv</li> <li>• Alter: &lt; 35 Jahre</li> </ul>	<b>N+ (1-3 LK) und</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ER und PR negativ</li> <li>• Her2/neu positiv</li> </ul>
Oder N+ (1-3 LK) und <ul style="list-style-type: none"> <li>• ER positiv oder PR positiv</li> <li>• Her2/neu negativ</li> </ul>		Oder <ul style="list-style-type: none"> <li>• N+ (≥ 4LK)</li> </ul>

V: peritumorale vaskuläre Invasion; ER: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; LK: Lymphknoten; pT: Angabe der Tumorgöße durch histopathologische Untersuchung; G: Grading (=Differenzierungsgrad des Tumors); N+: regionale Lymphknoten sind befallen

In Bezug auf die molekulare Wirkungsweise von Tamoxifen, lässt sich festhalten, dass das Vorhandensein von Östrogenrezeptoren entscheidend ist, da Tamoxifen kompetitiv die Bindung von Östrogenen an den zytoplasmatischen Rezeptoren hemmt, was eine Reduktion der Teilungsrate östrogenabhängiger Zellen zur Folge hat (**Abb. 10**). Im Normalfall bindet Östrogen an seinen im Zytosol lokalisierten Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ). Dieser besitzt eine Kernlokalisationssequenz, was dazu führt, dass der mit Östrogen beladene Rezeptor in den Zellkern wandert und an der DNA als Transkriptionsfaktor wirkt. Dies führt zur Aktivierung von Genen, die für die Zellproliferation und das Zellüberleben verantwortlich sind. Bindet jedoch Tamoxifen im Zytosol kompetitiv an den Rezeptor, so führt dies zu einer Transkription von proapoptotischen Genen und die Zellproliferation wird gehemmt. Für die Wirksamkeit von Tamoxifen ist also eine hohe Konzentration an Östrogenrezeptoren förderlich. Entscheidenden Einfluss auf die Menge an Rezeptoren hat das zytoplasmatische Protein CUEDC2 (CUE domain-containing protein-2). Dieses Protein fördert den Abbau des Östrogenrezeptors durch Proteasomen, folglich besteht eine stark inverse Beziehung

zwischen CUEDC2 und der Konzentration an Östrogenrezeptoren. Daraus ergibt sich, dass eine hohe Konzentration an CUEDC2 mit einer verminderten Wirksamkeit von Tamoxifen einhergeht. Genau dieses Phänomen kann während der Tumorprogression auftreten, da es in einigen Zellen zu einer vermehrten Bildung von CUEDC2 kommen kann. Desweiteren kann es in Tumorzellen auch zur Bildung von hyperaktiven Wachstumssignalen kommen (GFS = Growth factor signaling), die ebenfalls die Tamoxifenwirkung abschwächen (Thomas C. et al., 2011).



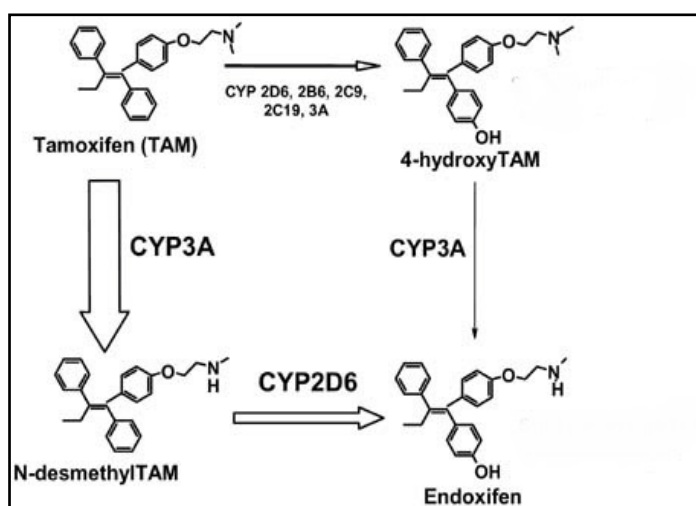
**Abb. 10: Wirkung von Tamoxifen auf zellulärer Ebene**

Tam: Tamoxifen; ER- $\alpha$ :  
Östrogenrezeptor  $\alpha$   
GFS: Growth factor  
signaling (Abbildung aus Thomas  
C. et al., 2011)

Durch Tamoxifen kann bei einem metastasierenden Mammakarzinom in 50-60 % der Fälle eine z.T. vollständige Remission von Metastasen erreicht werden, sofern im Tumorgewebe Östrogenrezeptoren vorliegen. Ist dies nicht der Fall, wird in nur 10 % der Fälle eine Remission erreicht. Neben der antiöstrogenen Wirkung besitzt Tamoxifen, wie auch sein aktiver Metabolit 4-Hydroxytamoxifen, der mit noch höherer Affinität an den Rezeptoren bindet, auch eine leicht östrogene Wirkung. Welche Wirkung schließlich überwiegt ist vom jeweiligen Gewebe abhängig. Bei der Therapie des Mammakarzinoms nutzt man die hemmende Wirkung des Medikaments, jedoch wird eine östrogene Wirkung z.B. im Bereich des Uterus beobachtet. Dieser Nebeneffekt bei der Behandlung des Mammakarzinoms wird für das Auftreten von Endometriumskarzinomen, als eine der möglichen Nebenwirkungen der Tamoxifentherapie, verantwortlich gemacht. Auf Grund des unterschiedlichen Ansprechens werden bei östrogenpositiven Tumoren der Mamma, bei adjuvanter Anwendung, signifikant weniger Rezidive beobachtet, als bei Karzinomen mit negativem Rezeptorstatus. Untersuchungen haben auch gezeigt, dass eine 5-jährige Behandlung mit Tamoxifen zu erheblich stärkeren Effekten führt als eine Behandlung über den Zeitraum von 1 oder 2 Jahren.

Auch zeichnet sich ab, dass die positiven Auswirkungen einer Behandlung unabhängig von Alter, Menopausenstatus, Dosis und zusätzlicher Chemotherapie zu sein scheinen (*Rote Liste, 2011*).

Mit Blick auf die pharmakokinetischen Eigenschaften von Tamoxifen lässt sich feststellen, dass es gut resorbiert wird. 4-7 Stunden nach oraler Aufnahme in Form von Tabletten werden die höchsten Konzentrationen im Serum gemessen, wobei fast das komplette Tamoxifen (98 %) in proteingebundener Form (die Bindung erfolgt v.a. an Albumin) im Serum zu finden ist. Die Plasmahalbwertszeit beträgt im Mittel 7 Tage. Der größte Teil des Medikaments wird in der Leber metabolisiert, wobei die entstehenden Verbindungen fast dieselbe antiöstrogene Wirkung haben (**Abb. 11**). Ein wichtigstes Enzym für die Verstoffwechslung ist das Cytochrom-P450-Enzym CYP3A4, das Tamoxifen v.a. zu N-Desmethyl-Tamoxifen umsetzt. Aus diesem entsteht unter der Einwirkung von CYP2D6 der aktive Metabolit 4-Hydroxy-N-Desmethyl-Tamoxifen (Endoxifen). Dieser Schritt der Metabolisierung kann von besonderer klinischer Bedeutung sein. Im Hinblick auf die Kombination von Tamoxifen mit anderen Medikamenten, ist zu beachten, dass Hemmstoffe von CYP2D6, insbesondere zahlreiche Antidepressiva aus der Gruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, wie Paroxetin und Fluoxetin, sowie Chinidin, Cinacalcet und Bupropion, die Bildung des aktiven Metaboliten und somit die Wirksamkeit von Tamoxifen verringern können. Auch ist ein natürlicher Polymorphismus im CYP2D6-Gen bekannt, der dazu führt, dass manche Patienten nur langsamer als gewöhnlich Endoxifen bilden können, was zu einem niedrigeren Endoxifen-Plasmaspiegel führt.



**Abb. 11: Metabolisierung von Tamoxifen durch die Cytochrom-P450-Enzyme in der Leber**

(Abbildung frei modifiziert von:

[http://www.nature.com/clpt/journal/v80/n1/fig\\_tab/clpt2006384f1.html](http://www.nature.com/clpt/journal/v80/n1/fig_tab/clpt2006384f1.html))

Sowohl Tamoxifen, als auch dessen Abkömmlinge akkumulieren in verschiedenen Organen, wie Leber,

Lunge, Gehirn, Bauchspeicheldrüse, Haut und Knochen. Das Medikament und seine Metabolite werden überwiegend biliär über den Stuhl als Glukuronide ausgeschieden. Nur ein kleiner Teil wird über den Urin abgegeben. Zu beachten ist, dass bei einer Dosierung von 20-40 mg/Tag frühestens nach 4 Wochen ein ausreichender steady-state erreicht werden kann (*Rote Liste, 2011*).

In Bezug auf die Behandlungsstrategien beim Mammakarzinom ist Tamoxifen in Deutschland für die adjuvante Therapie, nach erfolgter Primärbehandlung, und für die Behandlung beim metastasierenden Mamma-CA zugelassen. In den USA darf es darüber hinaus auch vorbeugend bei Hochrisikopatientinnen verwendet werden. In der Regel werden bei der adjuvanten Therapie einmal täglich 20-40 mg p.o. in Form von Tabletten verabreicht. Es wird eine Einnahmedauer von mindestens 5 Jahren empfohlen, wobei noch keine optimale Therapiedauer ermittelt werden konnte. Ebenso werden beim metastasierenden Karzinom 20-40 mg einmal täglich p.o. empfohlen. Meist ist jedoch bei beiden Therapieformen eine Dosis von 20 mg ausreichend. Im allgemeinen ist das Medikament gut verträglich, jedoch ist es bei Kindern, Jugendlichen, Schwangeren, bei bekannter Überempfindlichkeit und während der Stillzeit kontraindiziert (*Rote Liste, 2011*).

## 4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Reninproduzierende Zellen sind von entscheidender Bedeutung für die Regulation des Blutdrucks. Connexin-40 ist am Aufbau von gap junctions zwischen Reninzellen, aber auch zwischen Mesangiumzellen, Endothelzellen untereinander und zwischen Endothelzellen und reninfreisetzenden Zellen beteiligt und ist der dominierende Connexintyp in Reninzellen (Kurtz L. et al., 2009 b). Liegt eine systemische Cx-40 Deletion bereits während der Nephrogenese vor, führt dies zu einem erhöhten Blutdruck, zur Steigerung der Reninsynthese und der Reninsekretion und die druckabhängige Regulation des Reninsystems wird außer Kraft gesetzt. Zudem bewirkt die systemische Cx-40 Deletion eine ektope Lokalisation der Reninzellen. Folglich ist intaktes Connexin-40 ein wichtiger Faktor für die korrekte Positionierung der reninbildenden Zellen im Bereich des JGA (Kurtz L. et al., 2009 b).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche der oben genannten Effekte einer systemischen Cx-40 Deletion auch durch eine zeitlich festgelegte globale Deletion von Cx-40 ausgelöst werden können. Dazu wurde versucht mit Hilfe des Cre-Lox P-Systems und des Medikaments Tamoxifen eine konditionale Cx-40 Deletion in bereits vollständig ausdifferenzieren Mäusen zu erzeugen.

Um die Effektivität der Cx-40 Deletion zu messen, wurde die Cx-40 Expression in Wildtypmäusen, stimulierten Wildtypen, induzierten Cx-40 KO Mäusen (=Cx-40<sup>fl/fl</sup>-Tam Cre-Mäusen) und in stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup>-Tam Cre-Tieren bestimmt. Des Weiteren wurden Immunfärbungen von den jeweiligen Wildtypen und von den jeweiligen Cx-40<sup>fl/fl</sup>-Tam Cre-Mäusen angefertigt. Um den Einfluss der Deletion auf die Reninexpression feststellen zu können, wurde die Renin mRNA von diesen Tieren bestimmt. Die genaue Positionierung der reninbildenden Zellen nach induzierter Deletion wurde durch eine Gegenüberstellung von immunhistochemischen Färbungen untersucht. Hierbei wurden jeweils Wildtypen unter basalen Bedingungen mit Cx-40<sup>fl/fl</sup>-Tam Cre-Tieren unter denselben Bedingungen verglichen. Um den Einfluss einer Stimulation des RAAS durch eine Nidrigsalzdiät in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril bestimmen zu können wurden auch stimulierte Wildtypen mit stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup>-Tam Cre-Tieren verglichen. Um möglichst detaillierte Aussagen über die Reninverteilung entlang des renalen Gefäßbaums machen zu können, wurden nach der von Sauter und Machura (2008) etablierten Methode zur Erstellung von dreidimensionalen Modellen arterielle Nierengefäßbäume erarbeitet. Diese Methode erlaubt eine deutlich genauere Beurteilung des Reninexpressionsmusters im vaskulären Gefäßsystem, als eine

zweidimensionale Betrachtung. Auch hierbei wurden jeweils stimulierte und nicht stimulierte Tiere der unterschiedlichen Genotypen verglichen.

# Material und Methoden

## 1. Material

### 1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
<b>Computer</b>	Precision T5400, Dell, Frankfurt am Main
<b>Eismaschine</b>	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
<b>Filtersets</b>	
<b>TRITC-Filter:</b> Anregung: 533-558nm Emission: 570-640nm	Filter set 43, Zeiss, Jena
<b>Cy2-Filter</b> Anregung: 450-490nm Emission: 500-550nm	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
<b>Cy5-Filter</b> Anregung: 625-655nm Emission: 665-715nm	Filter set 50, Zeiss, Jena
<b>Fluoreszenzlampe</b>	X-Cite 120, EXFO Life Science & Industrial Division, Mississauga, Canada
<b>Grafikkarte</b>	NVIDIA Quadro FX 5600
<b>Inkubationsschrank</b>	Modell B6200, Heraeus, Hanau
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
<b>Kamera</b>	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
<b>Mikroskope</b>	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
<b>Mikrotom</b>	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
<b>PCR-Geräte</b>	Thermocycler, OmniGene, MWG, Ebersberg Primus 96, Peqlab, Erlangen Lightcycler LC480, Roche, Mannheim

---

<b>pH- Meter</b>	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
<b>Pipetten</b>	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
<b>Scantisch</b>	motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller), Ludl Electronic Products, München
<b>Schüttler</b>	SM25, Edmund Bühler, Hechtlingen
<b>Spannungsquellen</b>	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia Ratingen Multidrive XL, Pharmacia, Ratingen
<b>UV Leuchttisch</b>	Fluorescent Tables, Renner, Darmstadt
<b>UV- Spektrometer</b>	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
<b>Vakuumentrifuge</b>	Univapo 150 H UniEquip, Martinsried
<b>Vortexgeräte</b>	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
<b>Waagen</b>	Analysenwaage H- 20T, Mettler, Gießen Feinwaage P- 1210, Mettler, Gießen Feinwaage W 13, Mettler, Gießen
<b>Wärmeblöcke</b>	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamubrg
<b>Wärmeplatte</b>	HI 1220, Leica, Wetzlar
<b>Wärmeschrank</b>	Modell 300, Memmert, Schwabach
<b>Wärmetopf</b>	PSI, HOT POT 1.411.80/l
<b>Wasserbäder</b>	Modell 13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
<b>Zentrifugen</b>	Labofuge 400, Heraeus, Hanau Biofuge haemo, Heraues, Hanau Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

---

**1.2 Verbrauchsmaterial**

Produkt	Hersteller
<b>Auslaufpipetten 5ml, 10ml, 25ml</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Deckgläschen</b>	Labonord, Mönchengladbach
<b>Filter</b>	Schleicher & Schuell, Dassel
<b>Gewebe- Einbettkassetten</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Glaswaren</b>	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
<b>Hämatokritkapillaren</b>	Brandt, Wertheim
<b>Handschuhe</b>	Hartmann, Heidenheim
<b>Kanülen 0,4x 19mm</b>	BD Drogheda, Dublin, Irland
<b>Light Cycler 480 Multiwell Plattern 96</b>	Roche, Mannheim
<b>Liquid Blocker</b>	Labonord, Mönchenglattbach
<b>Niedrigsalzpuffer 0,02% NaCl</b>	Sniff, Soest
<b>Objektträger, Superfrost Plus</b>	Menzel-Gläser, Braunschweig
<b>Parafilm</b>	American National Can, Greenwich, USA
<b>Pipettenspitzen mit und ohne Filter</b>	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
<b>Präparatkästen</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Reagiergefäße Eppendorf 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Silikonkautschuk Gießformen</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Skalpellsklingen</b>	Feather, Köln

### 1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Choloroform	Merck, Darmstadt
DNA Längenstandard: 100bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Frankfurt am Main
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
First- Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/ $\mu$ l	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x bzw. Colorless, 5x	Promega, Mannheim
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% Liquimen® 25000 5ml Ampullen (500IE/ml)	Roche, Mannheim
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl <sub>2</sub> -Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transkriptase,200 U/ $\mu$ l	Invitrogen, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt

---

<b>NaOH 1N</b>	Merck, Darmstadt
<b>Natriumchlorid, NaCl</b>	Merck, Darmstadt
<b>Nuklease freies Wasser</b>	GibcoBRL, Eggenstein
<b>Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer, 0,5 µg/µl</b>	Promega, Mannheim
<b>Paraformaldehyd</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)</b>	Promega, Freiburg
<b>Paraplast-Plus Paraffin</b>	Sherwood, St. Louis, USA
<b>Pferdeserum (Horse Serum)</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>Rinderserumalbumin (BSA)</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>RNasin, Ribonuclease Inhibitor, 40U/µl</b>	Promega, Mannheim
<b>Sevofluran SEVOrane<sup>®</sup></b>	Abbot, Wiesbaden
<b>SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit</b>	Roche, Mannheim
<b>Tamoxifenfutter</b>	Harlan Laboratories BV, Horst, Niederlande
<b>Tissue-Tek<sup>®</sup></b>	Sakura, Niederlande
<b>Triton X</b>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<b>TRIzol-Reagenz</b>	GibcoBRL, Eggenstein
<b>Xylazin</b>	Ratiopharm, Ulm
<b>Xylol</b>	Merck, Darmstadt

---

## 1.4. Puffer und Lösungen

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

### 1. 4. 1 Puffer und Lösungen für Immunhistochemie

#### Fixierlösung für Perfusion

---

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Paraformaldehyd	3 %
-----------------	-----

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

---

$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	10 mM
--------------------------	-------

NaCl	140 mM
------	--------

$KH_2PO_4$	10 mM
------------	-------

#### TRIS EDTA Lösung, pH 9,0

---

TRIS	1, 21 g
------	---------

EDTA	0, 37 g
------	---------

	add 1l
--	--------

---

## Waschpuffer

Für die Färbung von einzelnen Objektträgern wurde der PBS-Otto-Puffer, pH 7,4 verwendet.

Für die Erstellung von Serienaufnahmen im Rahmen der 3D-Rekonstruktionen wurde folgender Waschpuffer verwendet:

---

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

BSA (Bovine Serum Albumin)	1 %
----------------------------	-----

## Blockierlösung für Connexinfärbung

---

PBS-Otto	
----------	--

Triton X	0,3 %
----------	-------

Horse Serum (HS)	5 %
------------------	-----

## Blockierlösung für Serienfärbung

---

PBS-Otto-Puffer	
-----------------	--

BSA (Bovine Serum Albumin)	1 %
----------------------------	-----

HS (Horse Serum)	10 %
------------------	------

### 1. 4. 2 Puffer und Lösungen für Molekularbiologie

#### Agarosegel

---

TBE

Agarose 2 %

---

#### DEPC-H<sub>2</sub>O

1/1000 Vol. DEPC in ddH<sub>2</sub>O, schütteln, über Nacht geöffnet unter dem Abzug stehen lassen, dann autoklavieren

#### Ethidiumbromidlösung

---

Ethidiumbromid 50 mg/ml

---

#### Maleatpuffer

---

TRIS 1, 22 %

Maleinsäure 1, 74 %

EDTA 0, 89 %

add 1 l

---

**6x Loading Dye**

---

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

---

**TBE**

---

TRIS	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	0,02M

---

## 1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net nach gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Eine Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l wurde durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser erreicht.

Name	Sequenz
mGAPDH s	5'-ATG CCA TCA CTG CCA CCC AGA-3'
mGAPDH as	5'-ACT TGG CAG GTT TCT CCA GGC-3'
mRenin s LC	5'-ATG AAG GGG GTG TCT GTG GGG-3'
mRenin as LC	5'-ATG CGG GGA GGG TGG GCA CCT-3'
m Cx40 <sup>fl/fl</sup> geno s	5'-GTT AGA ATC AAT CCG ACT CAC-3'
m Cx40 <sup>fl/fl</sup> geno as	5'-GCA GCT AGA GCC ATG AGT C-3'
m CAGG geno s	5'-CTC TAG AGC CTC TGC TAA CC-3'
m CAGG geno as	5'-CGC CGC ATA ACC AGT GAA AC-3'
Cx 40 Ryan 1	5'-CCT GCT GGA AAG AAG TAG A-3'
Cx 40 Ryan 2	5'-TCT CCG GAG CTG TTC TTT A-3'

## 1.6 Antikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung in Blockierlösung</b>
<b>Chicken anti-Renin-IgG</b>	Polyklonal	Davids Biotechnologie, Regensburg	1:400
<b>Mouse anit-Glattmusekelaktin-IgG</b>	Monoklonal	abcam, Cambridge	1:600
<b>Rabbit anit-mouse Cx-37-IgG</b>	Polyclonal	Alpha Diagnostic, Texas	1:100
<b>Goat anti-human Cx-40-IgG</b>	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz	1:100
<b>Rabbit anti-human Cx-43-IgG</b>	Polyklonal	Cell Signaling Technology, Boston	1:100

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung in Blockierlösung</b>
<b>Donkey anti-chicken-IgY</b>	Rhodamin (TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400
<b>Donkey anti-chicken-IgY</b>	Cy 5	Dianova, Hamburg	1:400
<b>Donkey anti-goat-IgG</b>	Rhodamin (TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400
<b>Donkey anit-mouse-IgG</b>	Cy 2	Dianova, Hamburg	1:400
<b>Donkey anti-rabbit-IgG</b>	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400

## 1.7 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mittels *Microsoft Office 2007* verfasst. Die Bearbeitung der Bilder, welche in der Arbeit enthalten sind, erfolgte mit *Adobe Photoshop CS4* und *Image J* (Wayne Rasband. NIH. USA). Die gezeigten Graphen wurden mit *Prism 5* und *Mikrosoft Office XP* erstellt. Bei der Literatursuche wurde PubMed von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zu Hilfe genommen.

Zur Mikroskopie wurde *AxioVision Rel. 4.5.* von Zeiss verwendet und für die 3D-Rekonstruktionen *Amira 5.4.3 visualization software* (VSG, Berlin).

## 2. Methoden

### 2.1. Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurden 8-12 Wochen alte männliche Mäuse verwendet. Alle Tiere wurden unter Einhaltung folgender Parameter gehalten: Raumtemperatur 23 °C +/- 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55 % +/- 5 %, 12-stündiger Hell-Dunkelwechsel, Wasser und Futter ad libitum.

Folgende Genotypen wurden als Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit eingesetzt:

Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäuse: Hierzu wurden Mäuse mit ubiquitär exprimierter, durch Tamoxifen induzierbarer Cre-Rekombinase mit Mäusen mit loxP site flankierten Cx-40 Gensequenzen verpaart.

Cx-40<sup>fl/fl</sup> Mäuse: Mäuse mit loxP site flankierten Cx-40 Gensequenzen wurden als Kontrollen verwendet.

### 2.2 Versuche an adulten Mäusen

Zur Induktion der Deletion des Cx-40 Gens in der ausdifferenzierten Niere wurden männliche adulte Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre- und Cx-40<sup>fl/fl</sup> Mäuse über 10 Tage auf Tamoxifen-haltiges Futter (Harlan Laboratories BV, Horst, Niederlande) gesetzt und anschließend in zwei Versuchsgruppen eingeteilt:

Gruppe 1 wurde für weitere 10 Tage nach Tamoxifenverabreichung wieder auf Normalfutter (Ssniff, 0,6 % NaCl) gesetzt.

Gruppe 2 erhielt nach Tamoxifenbehandlung über 10 Tage eine Nidrigsalzdiät (Ssniff, 0,02 % NaCl) in Kombination mit dem ACE-Inhibitor Enalapril (Sigma, 10 mg/kg/d). Die Gabe von Enalapril erfolgte über drei Tage im Trinkwasser.

Anschließend wurden die Versuchstiere zu histologischen und molekularbiologischen Versuchen herangezogen.

### **Probeentnahme für molekularbiologische Untersuchungen**

Um die renale mRNA analysieren zu können, wurden die Nieren der Mäuse unmittelbar entnommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Isolation der Total-mRNA wurde das Nierengewebe bei -80°C gelagert.

### **Gewebefixierung für histologische Untersuchungen**

Die Nieren wurden mittels retrograder arterieller Perfusion mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Hierzu erfolgte die Anästhesie der Mäuse durch eine Kombination aus Ketamin und Xylazin (80 mg/kg KG i.p.). Nach Eröffnung des Abdomens und Freilegung der Aorta abdominalis, wurde diese unterhalb des Abgangs der Arteriae renales abgeklemmt, damit die Durchblutung der Nieren nicht unterbrochen wurde. Distal der Klemme wurde ein Perfusionskatheter eingeführt und festgeklemmt. Um einen Druckausgleich herzustellen, wurde die Vena cava inferior eröffnet. Nachdem die obere Klemme entfernt wurde, wurde die Aorta über den Katheter mit 10ml isotoner NaCl- Lösung und 10 I.E. Heparin retrograd perfundiert. Danach erfolgte eine Fixierung mit frisch hergestelltem Paraformaldehyd (3%) in PBS, wobei der Fluss bei 40ml/3min konstant aufrechterhalten wurde. Die perfundierten Nieren wurden entnommen und bis zur Einbettung in Paraffin in 70% Methanol im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

## **2.3 Histologische Methoden**

### **2.3.1 Erstellung von Paraffinschnitten**

Das durch Perfusionsfixierung vor Autokatalyse geschützte Gewebe musste zur Herstellung von Serienschnitten in Paraffin eingebettet werden. Hierzu musste das Gewebe zunächst dehydriert werden, wozu das Gewebe in folgender Reihenfolge in eine Methanolreihe aufsteigender Konzentration gegeben wurde.

<b>Alkohol</b>	<b>Dauer</b>
<b>Methanol 70%</b>	30 Minuten
<b>Methanol 70%</b>	30 Minuten
<b>Methanol 80%</b>	30 Minuten
<b>Methanol 80%</b>	30 Minuten
<b>Methanol 90%</b>	30 Minuten
<b>Methanol 90%</b>	30 Minuten
<b>Methanol absolut</b>	30 Minuten
<b>Methanol absolut</b>	30 Minuten

Nach Abschluss der Alkoholreihe wurde mit absolutem Isopropanol zweimal für je 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) gespült, und anschließend für 30 Minuten bei 45°C.

Dem folgend wurden die Nieren weitere 30 Minuten in einem Isopropanol/Paraffin- Gemisch (1:1, 55°C) belassen und anschließend zweimal je 24 h bei 60 °C in Paraffin inkubiert. Letztlich wurden die Nieren zur Aushärtung über Nacht in Einbettförmchen, welche mit 60 °C warmem Paraffin gefüllt waren, überführt.

Mittels eines Rotationsmikrotoms wurden am nächsten Tag Gewebeschnitte mit einer Dicke von 5µm erstellt, wobei für die Erstellung der Rekonstruktionen jeweils ca. 100 Folgeschnitte gemacht wurden. Diese wurden einzeln jeweils in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt und schließlich auf Objektträger aufgezogen. Die auf diese Weise erstellten Folgeschnitte wurden dann für 24h bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet.

### 2.3.2 Immunhistochemische Färbung

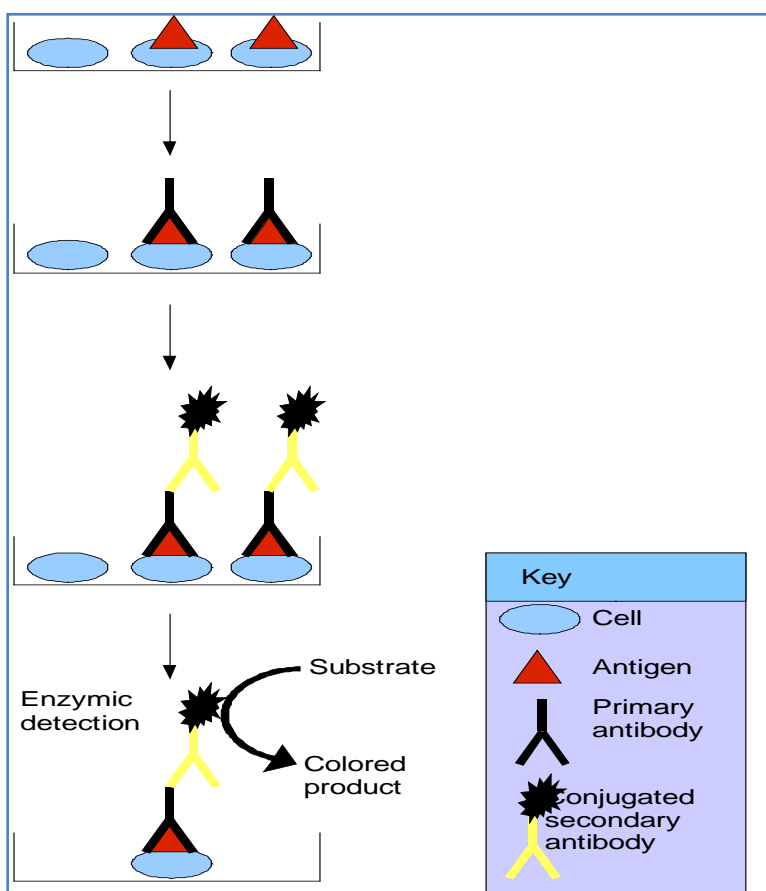
#### Erstellung von Objektträgern für die Darstellung von Renin, Aktin und den Connexinen

1. Für die Färbung von Connexinen wurden die Objektträger zunächst nach folgenden Schritten entparaffiniert:

<b>Alkohol</b>	<b>Dauer</b>
<b>Xylol I</b>	15 Minuten
<b>Xylol II</b>	10 Minuten
<b>Isopropanol absolut I</b>	5 Minuten
<b>Isopropanol absolut II</b>	5 Minuten
<b>Isopropanol 96 %</b>	5 Minuten
<b>Isopropanol 80 %</b>	5 Minuten
<b>Isopropanol 70 %</b>	5 Minuten

2. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für 5 Minuten in PBS-Otto gegeben und auf einen Schüttler gestellt.
3. Sodann wurden die Objektträger in eine Küvette gegeben, in der sich eine TRIS EDTA Lösung befand. Diese wurde zu Beginn der Färbung in einem Wasserbad auf 97 °C erhitzt. Die Objektträger wurden mitsamt der Küvette für 45 Minuten in diesem Wasserbad gekocht.
4. Nach Abschluss des Wasserbades wurden die Objektträger für 30 Minuten abgekühlt.
5. Danach wurden die Objektträger zweimal mit PBS-Otto auf einem Schüttler für jeweils 5 Minuten gewaschen.
6. Anschließend wurden die Objektträger in einen Färbekasten eingespannt und nochmals mit PBS-Otto gewaschen.
7. Danach wurde jeder Objektträger mit jeweils 200 µl Blockierlösung blockiert und für 2 Stunden dunkel bei RT gelagert.

8. Anschließend wurde ein Gemisch aus den primären Antikörpern (Aktin, Renin, Connexin(en)) erstellt, wobei diese jeweils in einem bestimmten Verhältnis in Blockierlösung verdünnt wurden (**siehe 1.6 des Materialteils**).
9. Jeweils 120 µl dieses Gemisches wurden auf einen Objektträger gegeben.
10. Die Objektträger wurden dann über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank dunkel gelagert.
11. Am nächsten Tag wurden die Objektträger insgesamt 3x für jeweils 5 Minuten mit PBS-Otto gewaschen.
12. Gleichzeitig zu den Waschschrritten wurden die sekundären Antikörper für 3 Minuten zentrifugiert.
13. Danach wurden jeweils 120 µl aus einem Gemisch an sekundären Antikörpern (**Verdünnung siehe 1.6 des Materialteils**) und der Blockierlösung, nachdem dieses für 7 Minuten zentrifugiert worden war, zugegeben. Hierbei läuft folgende, schematisch dargestellte, Reaktion ab (**Abb.12**):



**Abb. 12:** Prinzip von immunhistochemischen Färbungen (*frei modifiziert von [www.abcam.com](http://www.abcam.com)*). Der primäre Antikörper bindet an das zu detektierende Antigen im Gewebe. Im nächsten Schritt wird der sekundäre Antikörper hinzugegeben, welcher sich spezifisch gegen die Antigensequenzen der Wirtsspezies, aus der der 1. Antikörper stammt, richtet. Dieser zweite Antikörper ist mit einem signalemittierenden Fluorophor gekoppelt.

14. Als nächstes wurde der Färbekasten für 1,5 Stunden bei RT inkubiert.
15. Nach weiteren Waschvorgängen (3 x 5 Minuten in PBS-Otto und 1x 5 Minuten in entionisiertem Wasser, jeweils im Dunkeln) wurden die Objektträger mit Hilfe von Glycergel Mounting Medium eingedeckelt.
16. Nach 30 Minuten Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C konnten die Objektträger schließlich im Mikroskop betrachtet werden.

### **Erstellung von Objektträgern für die Darstellung von Renin und Aktin bei Serienfärbungen**

1. Der 1. und 2. Schritt entsprechen dem 1. und 2. Schritt bei Erstellung von Objektträgern für die Darstellung von Renin, Aktin und den Connexinen
2. Danach wurden die Objektträger ohne Kochen in TRIS EDTA in einen Färbekasten eingespannt.
3. Nach den ersten drei Schritten wurden die Objektträger 3x für jeweils 5 Minuten in PBS-Otto gewaschen.
4. Danach wurden sie einzeln jeweils mit 200 µl Blockierlösung blockiert.
5. Sodann wurden sie bei RT für 30 Minuten dunkel im Färbekasten gelagert.
6. Anschließend wurde ein Gemisch aus den primären Antikörpern (Aktin und Renin) erstellt, wobei die Antikörper in einem bestimmten Mischverhältnis (**siehe 1.7**) in der Blockierlösung verdünnt wurden.
7. Jeweils 120 µl von diesem Gemisch wurden auf jeden Objektträger gegeben
8. Abschließend wurden die Objektträger über Nacht im Dunkeln bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.
9. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 3x für 5 Minuten mit einem Gemisch aus PBS-Otto und 1 % BSA gewaschen.
10. Gleichzeitig zu den Waschschritten wurden die sekundären Antikörper für 3 Minuten zentrifugiert.
11. Danach wurden jeweils 120 µl pro Objektträger aus einem Gemisch an sekundären Antikörpern (**Verdünnung siehe 1.7**), PBS-Otto und 1 % BSA (= Blockierlösung) zugegeben, nachdem dieses Gemisch für 7 Minuten zentrifugiert worden war.
12. Anschließend wurden die Objektträger für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
13. Nach weiteren Waschvorgängen (3 x 5 Minuten PBS-Otto und 1x 5 Minuten entionisiertes Wasser, jeweils im Dunkeln) wurden die Objektträger mit Hilfe von Glycergel Mounting Medium eingedeckelt.

14. Nach 30 Minuten Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C konnten die Objektträger schließlich im Mikroskop betrachtet werden.

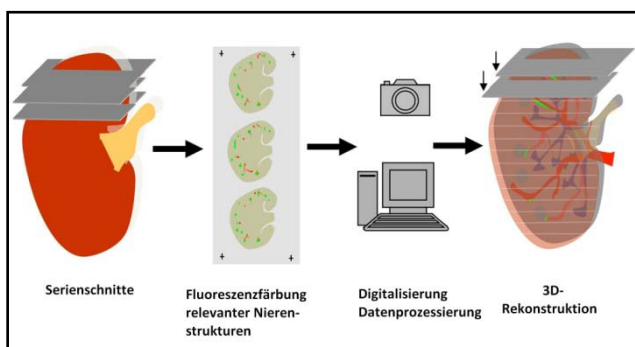
### 2.3.3. Mikroskopie und Bilddigitalisierung

Die Digitalisierung der immunfluoreszenzgefärbten Schnitte erfolgte unter Verwendung eines Axiovert 200M Mikroskops. Dieses verfügte über die entsprechenden Fluoreszenzfilter, eine motorisierte Objektaufgabe, eine Schwarzweiß-CCD-Kamera (AxioCamMRM), sowie über die Software AxioVision von Zeiss.

Zusätzlich zu den Serien- und Einzelaufnahmen, die mittels eines Fluoreszenzmikroskops angefertigt wurden, wurden zusätzlich noch einige Einzelbilder mit einem konfokalen Mikroskop zur noch hochauflösenderen Darstellung von Reninzellen, Glattmuskelaktin und den unterschiedlichen Connexintypen erstellt.

### 2.3.4. Anfertigung von 3D-Rekonstruktionen

Um die genaue Lokalisation von reninbildenden Zellen im Verlauf von Nierengefäßen untersuchen und darstellen zu können, wurden dreidimensionale-Rekonstruktionen (3D-Rekonstruktionen), von Nieren aus unterschiedlich behandelten Mäusen, erstellt (**Abb.13**). In den Rekonstruktionen wurde der arterielle Gefäßbaum mit der dazugehörigen Reninverteilung dargestellt. Dabei wurden eine stimulierte Kontrolle mit einer unbehandelten Kontrolle, sowie ein stimuliertes Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tier und eine unstimulierte Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus, verglichen.



**Abb. 13: Schema zur Methode der 3D-Rekonstruktion** ( mit freundlicher Genehmigung von Prof. Charlotte Wagner zur Verfügung gestellt)

Für die 3D-Rekonstruktion wurden Paraffinschnitte verwendet. Diese wurden mit den oben beschriebenen Techniken fixiert, gefärbt und digitalisiert. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden spezielle Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA und Renin verwendet, womit Renin- und Aktinsignale dargestellt werden konnten. Von einem vorher festgelegten Gewebeausschnitt wurde pro Schnitt jeweils eine Mehrkanalaufnahme mit 100-facher Vergrößerung angefertigt. Nach der Fertigstellung aller Aufnahmen einer Serie wurde, mittels des Bildbearbeitungsprogramms *Image J* (Wayne Rasband, NIH, USA), ein Stapel von Bildern gleicher Größe erzeugt. Anschließend wurden bei den Mehrkanalaufnahmen der Renin- und der  $\alpha$ -SMA-Kanal, mit Hilfe der RGB-Split-Funktion des Programms, wieder voneinander getrennt. Für die eigentliche Rekonstruktion mussten anschließend die Daten in die *Amira 5.4.3 Visualization Software* importiert werden. Anschließend folgte der Schritt des Bildalignments, bei dem die einzelnen Bilder einer Serie möglichst identisch übereinander gelegt wurden. Darauf folgend wurden die Renin und  $\alpha$ -SMA-Signale, welche anhand von charakteristischen Grauwerten erkennbar waren, mit Hilfe von verschiedenen Werkzeugen der Amira-Software, markiert und in einzelnen Labelfields zusammengefasst. Ausgehend von diesen wurden Matrizen des Aktinbaums erstellt und Oberflächenvolumina ausgerechnet. Auf den einzelnen Schnitten waren auch die Glomeruli und die Nierenkapsel erkennbar. Diese wurden mit einem speziellen Werkzeug markiert, woraus sich im Modell letztlich die Glomeruli und die Nierenkapsel ergaben. Abschließend wurde unter Zuhilfenahme einer Messfunktion der Software noch ein Maßstab erstellt.

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 Genotypisierungen**

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden mittels PCR genotypisiert. Dabei erfolgte die Extraktion der genomischen DNA (gDNA) nach der NaOH-Methode.

#### **Protokoll zur gDNA-Extraktion**

1. Zunächst wurden 2 mm eines Mausschwanzes bzw. 1 Niere in einem 0,5 ml Cup mit 100  $\mu$ l 25 mM NaOH versetzt.
2. Dieses Gemisch wurde für 1 Stunde bei 96 °C im Thermomix inkubiert.

3. Anschließend wurde das Cup gut gevortext um den Schwanz aufzulösen und es wurden 10  $\mu$ l 1 M Tris HCl pH8 zugegeben, um den pH zu neutralisieren.
4. Dem folgend wurde das Gemisch für 6 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert.
5. Schließlich wurden 2  $\mu$ l der gDNA, die sich im Überstand befand in die Genotypisierungs-PCR gegeben.

Bei dieser Arbeit lag der Focus auf dem Nachweis von Banden für Connexin-40. Zu diesem Zweck erfolgte die Genotypisierung nach folgendem Reaktionsansatz.

### Genotypisierung Connexin-40

#### 20 $\mu$ l PCR-Reaktionsansatz für Cx-40

Bezeichnung	Menge
Cx-40 wt s	1,0 $\mu$ l
Cx-40 wt as	1,0 $\mu$ l
Cx-40 KO s	1,0 $\mu$ l
Cx-40 KO as	1,0 $\mu$ l
dNTPS	2,5 $\mu$ l
GoTaq	0,3 $\mu$ l
Puffer (GoTaq buffer green)	4,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7,2 $\mu$ l
	18 $\mu$ l + 2 $\mu$ l gDNA

### Amplifizierungsprotokoll Cx-40

Phase	Zyklen	Temperatur	Dauer
Aktivierung	1	94 °C	5 Minuten
Denaturierung	40	94 °C	45 Sekunden
Annealing		60 °C	45 Sekunden
Elongation		72 °C	45 Sekunden
Elongation	1	72 °C	10 Minuten
Store		8 °C	∞

Schließlich wurden die PCR-Ansätze auf ein Agerosegel (2 %) aufgetragen und durch horizontale Gelelektrophorese in die einzelnen DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt, wobei die Auftrennung bei 120 V erfolgte.

#### 2.4.2 Isolation der renalen Gesamt-mRNA

Die Gewinnung der RNA aus gefrorenen Nieren basiert auf der von *Chomczynski und Sacchi 1987* entwickelten Guanidinium-Phenol-Chloroform-Methode, wobei darauf geachtet wurde, eine Kontamination mit RNAase zu vermeiden. In einem ersten Schritt wurden die in flüssigem Stickstoff gefrorenen Organe mit einem Ultra-Turrax Mixer in 1 ml TRIZOL für ca. 30 Sekunden homogenisiert. Das im TRIZOL enthaltene Phenol führt zu einem Lösen von Proteinen und DNA, die RNA bleibt in der wässrigen Phase. Die homogenisierten Organe wurden anschließend für 5 Minuten bei RT inkubiert. Sodann wurde 1/5 des Gesamtvolumens an Chloroform zugegeben (=200 µl). Das Gemisch wurde für 15 Sekunden vorsichtig geschüttelt, um die DNA nicht zu zerkleinern. Anschließend wurde das Gemisch für 3 Minuten bei RT inkubiert, bevor es für 15 Minuten bei 4 °C und mit 12000 rpm zentrifugiert wurde. Nach diesem Schritt befand sich die RNA in dem wässrigen Überstand und konnte abpipettiert werden. Dabei musste darauf geachtet werden, nicht die Interphase, bestehend aus hydrophilen Proteinen, mitabzunehmen. Für die anschließende Fällung der RNA wurde 1 Vol (500 µl) absoluter Isopropanol hinzugegeben und nach mehrmaligem Schwenken und

kurzem Vortexen für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 12000 G bei 4 °C für 10 Minuten konnte der Überstand verworfen werden. Danach wurde das glasige RNA Pellet mit 75 % Ethanol-Lösung gewaschen, für 10 Minuten bei 12000 G zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet und abschließend in nukleasefreiem Wasser für ca. 2 Minuten bei 62 °C gelöst. Zur Quantifizierung wurde die isolierte RNA 1: 50 in nukleasefreiem Wasser verdünnt, bevor sie photometrisch gemessen wurde. Die Qualität der isolierten RNA wurde aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm bestimmt, wobei für die Versuche nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0 verwendet wurde. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **2.4.3 Synthese von cDNA**

Mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase wurde die isolierte RNA in copy DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierbei macht man sich die Eigenschaft zunutze, dass dieses Enzym in der Lage ist eine RNA als Matrize zu benutzen, um anhand dieser einen RNA-DNA-Hybridstrang herzustellen. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass keine relevanten Informationen verloren gehen, jedoch liegt diese in viel stabilerer Form vor und lässt sich mit PCR-Techniken analysieren. 1 µg der isolierten RNA wurde zur cDNA-Synthese verwendet. Dabei wurden als Primer Oligo(dT)<sub>15</sub>-Ketten verwendet, um so die mRNA zu transkribieren, die einen polyA-Schwanz aufweisen.

### **Protokoll**

10 µl Reaktionsansatz:

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

---> 5 Minuten auf 65 °C erhitzen, anschließend wurde das Gemisch sofort auf Eis gestellt.

Anschließend wurde ein Mix aus 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (100 U), je 4 µl dNTPs (2,5 mM) und Puffer (5x first strand buffer), sowie 3 µl DEPC-H<sub>2</sub>O erstellt und zu 10 µl Ansatz gegeben.

---> 1h bei 37 °C inkubieren lassen.

Um für eine Inaktivierung des Enzyms zu sorgen, wurde der Reaktionsansatz anschließend für 2 Minuten auf 94 °C erhitzt.

Bis zur quantitativen PCR wurde die erhaltene cDNA mit 20 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### **2.4.4 Realtime-PCR zur Semiquantifizierung der Renin mRNA**

Um die Renin mRNA quantifizieren zu können wurden RT-PCR-Analysen am LightCycler 480-Gerät unter Verwendung des Lightcycler 480 SYBR Green master PCR Kits von Roche durchgeführt. Bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) erfolgt nach jedem Zyklus eine photometrische Messung der entstandenen Menge an DNA. Die Menge des Produkts wird hierbei indirekt durch die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, der mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA bindet, bestimmt.

##### **Protokoll**

5 µl Lightcycler 480® SYBR Green Master, je 0,5 µl sense und antisense Primer (10 pmol/µl), 3µl add H<sub>2</sub>O und 1 µl cDNA

<b>Aktivierung</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
<b>Aktivierung</b>	11	95 °C	15 Minuten
<b>Denaturierung</b>	40	95 °C	15 s
<b>Annealing</b>		58 °C	20 s
<b>Elongation</b>		72 °C	20 s

Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Des Weiteren wurde am Ende jeden Laufs die Schmelzkurve der amplifizierten DNA bestimmt (das Aufschmelzen der DNA erfolgt von 60 °C bis 95 °C mit 0,1 °C/s) und dabei wurde die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Housekeeper wurde das nicht mitregulierte Kontrollgen GADPH verwendet.

### **2.4.5 Statistische Analysen**

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

-

# Ergebnisse

## 1. Qualitative und quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters an verschiedenen Versuchstieren

In den folgenden Abschnitten sollen die Ergebnisse vorgestellt werden, die im Rahmen dieser Arbeit durch mikroskopische Untersuchungen von Paraffinschnitten und mittels 3D-Rekonstruktionen von Gefäßbäumen gewonnen wurden.

Zuerst wird durch den Vergleich von immunhistologischen Aufnahmen und von Cx-40 mRNA Daten die Deletion von Connexin-40 durch Tamoxifen in ausdifferenzierten Mäusen nachgewiesen (**Punkt 2**).

Anschließend erfolgt unter **Punkt 3** eine semiquantitative Analyse der Reninexpression durch den Vergleich von Renin mRNA Daten unter verschiedenen Bedingungen. Die unter **Punkt 2 und 3** dargestellten Werte unterliegen statistischen Schwankungen, entsprechen jedoch der Standardabweichung.

Die unter **Punkt 4** gezeigten mikroskopischen Immunfluoreszenzaufnahmen wurden angefertigt, um genauere Aussagen über die Lokalisation der Reninzellen und deren Form treffen zu können.

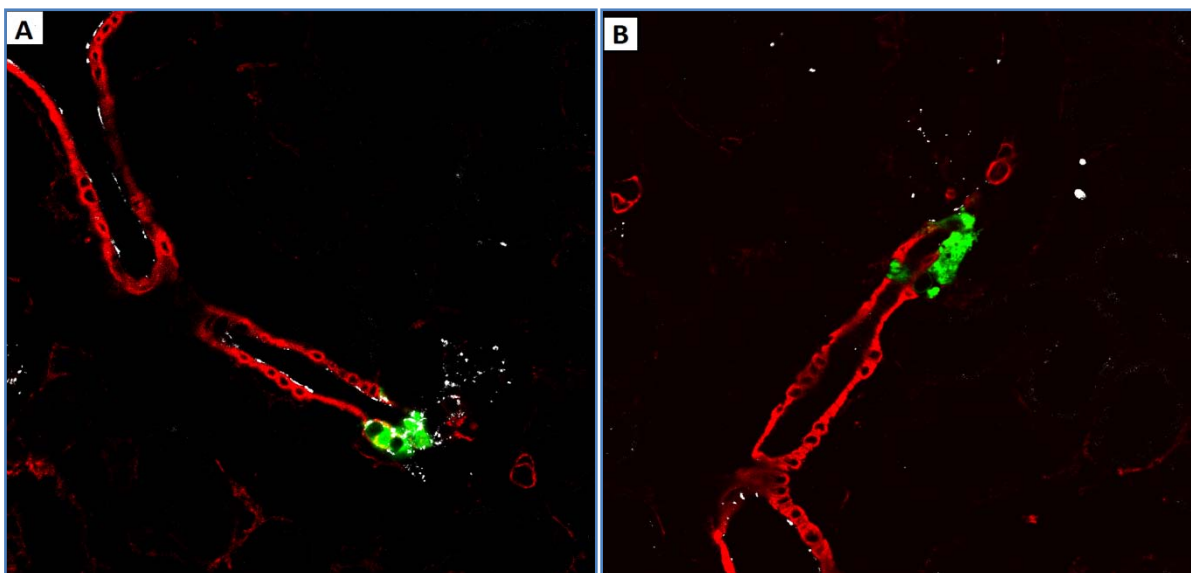
Um die Verteilung der Reninzellen und den Gefäßbaum möglichst gut darstellen zu können, wurden sowohl die Immunfluoreszenzsignale von Aktin, aber auch von Renin mittels der speziellen Software *Amira* dreidimensional dargestellt. Bei allen unter **Punkt 5** gezeigten Rekonstruktionen wurden jeweils ein arcuater Seitenast mit mehreren daraus abzweigenden Arteriae interlobulares, dargestellt. Sofern sich längere Abschnitte von efferenten Arteriolen darstellten, wurden auch diese rekonstruiert.

## 2. Nachweis der Tamoxifen induzierten Connexin-40 Deletion

Um die Deletion von Cx-40 durch Tamoxifen nachweisen zu können, wurden immunhistologische Cx-40 Färbungen angefertigt und es erfolgte eine Bestimmung der Connexin-40 mRNA in Nieren der verschiedenen Versuchsgruppen. Dadurch konnte sowohl durch eine histologische als auch durch eine molekularbiologische Methode der Versuch einer Gendeletion in ausdifferenzierten Mäusenieren verifiziert werden.

### 2.1 Vergleich der Cx-40 Immunfärbung im Wildtyp mit der Färbung in Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen

**Abb. 14** zeigt die immunhistologische Färbung für Cx-40 in der Niere eines nicht stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieres (**links**) und in der Niere eines nicht stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieres nach Tamoxifeninduktion (**rechts**).



**Abb. 14:** Immunhistologische Färbung von Aktin (rot), Renin (grün) und von Connexin-40 (weiß) im unstimulierten Wildtypen (A) und in einer unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus (B). Auffällig sind die deutlich verminderten Connexinsignale (weiß) im Bereich des Glomerulus und der afferenten Arteriole, was auf eine fast vollständige Deletion des Connexin-40 Gens hinweist.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigte das Bild der knock-out Maus eine geringfügige retrograde Rekrutierung an Reninzellen entlang der afferenten Arteriole. Im Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tier hingegen wurde deutlich weniger Connexin-40 exprimiert als im Wildtyp. Jedoch ließ sich vor allem innerhalb des Glomerulus noch eine geringe Expression von Cx-40 gap junctions nachweisen. Im Endothel der afferenten Arteriole hingegen war im Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tiereine Connexin-40 Expression zumindest augenscheinlich nicht nachweisbar.

Auf Grund dieses Vergleichs lässt sich aus immunhistologischer Sicht festhalten, dass durch die 10-tägige Gabe von Tamoxifen die Expression von Connexin-40 zwar deutlich reduziert wurde, jedoch keine vollständige Deletion erreicht wurde.

## 2.2 Connexin-40 mRNA Daten im Wildtyp und in Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen

Um die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen zu überprüfen wurde bei unstimulierten und stimulierten Wildtypen, sowie bei unstimulierten und stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen, jeweils die Cx-40 mRNA Abundanz der Niere gemessen. Die Ergebnisse wurden in **Abb.15** gegenübergestellt, wobei jeder Balken jeweils den Mittelwert aus 8-12 Nieren, die jeweils gleich behandelt wurden, zeigt. Auch dargestellt ist der jeweilige standard error of the mean (SEM).

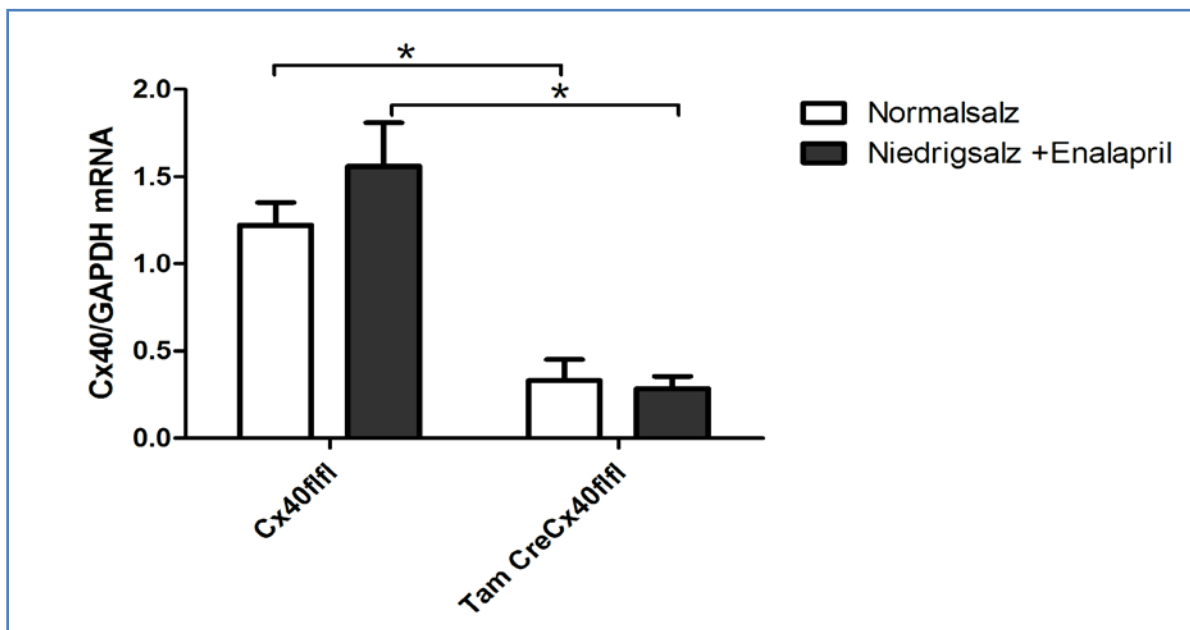


Abb. 15: Cx-40 mRNA Abundanz in Wildtypen (Cx-40<sup>fl/fl</sup>) und in Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam-Cre Mäusen, jeweils unter basalen Bedingungen (weiße Balken) und unter Stimulation des RAAS durch low-salt Diät und den ACE-Hemmer Enalapril (graue Balken). Unter beiden Bedingungen zeigt sich nach Tamoxifen-induzierter Gendeletion ein Rückgang der Cx-40 mRNA auf ca. 25 % im Vergleich zum Wildtyp.

Wie in der Grafik dargestellt (**Abb. 15**), bestätigten die erhobenen Daten die Veränderungen, die bereits bei der Gegenüberstellung der immunhistologischen Aufnahmen gesehen werden konnten (**siehe Abb. 14**). Sowohl unter nicht stimulierenden Bedingungen als auch unter Stimulation des RAAS mit Nidrigsalzdiät und Enalapril ging die Cx-40 mRNA Expression in den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren nach Tamoxifen-induzierter Deletion auf ca. 25 % im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp zurück. Dies bedeutete, dass in den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen deutlich weniger Connexin-40 exprimiert wurde, jedoch fand immer noch eine geringe Expression statt. Dieses Ergebnis erklärte auch, warum in dem histologischen Bild der Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus (**siehe Abb. 14**) noch eine geringe Dichte an Connexin-40 Signalen beobachtet werden konnte.

### 3. Semiquantitative Analyse der Reninexpression

Um die Reninexpression quantitativ bestimmen zu können, wurden Renin mRNA Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in **Abb. 18**(siehe unten) zusammengefasst, wobei ein Balken jeweils den Mittelwert zeigt, der aus 8-12 jeweils gleich behandelten Nieren ermittelt wurde. Des Weiteren ist jeweils der SEM dargestellt.

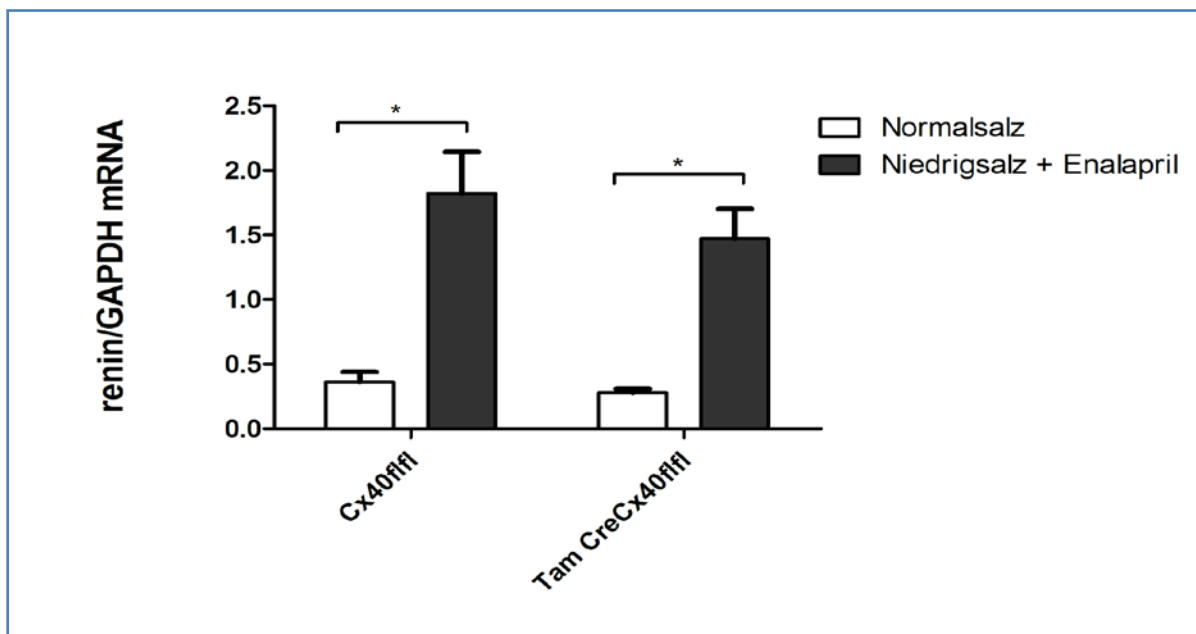


Abb.16: Renin mRNA Abundanz in Wildtypen (Cx-40<sup>fl/fl</sup>) und im induzierten Cx-40 KO Tieren (Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre), jeweils unter Normalbedingungen (weiße Balken) und unter Stimulation des RAAS durch low-salt Diät und den ACE-Hemmer Enalapril (graue Balken). Weder unter basalen Bedingungen, noch unter Stimulation des RAAS zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Wildtypen und den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren.

#### 3.1 Semiquantitative Analyse unter basalen Bedingungen

Beim Vergleich des Wildtyps (Cx-40<sup>fl/fl</sup>) unter normal salt Bedingungen mit Mäusen, bei denen durch die 10-tägige Verabreichung von Tamoxifen ein universeller Cx-40 KO erzeugt wurde (Tam CreCx40<sup>fl/fl</sup>), zeigte sich, dass sich die Konzentrationen an Renin mRNA kaum voneinander unterschieden (**Abb. 16**).

#### 3.2 Semiquantitative Analyse unter chronischer Stimulation des RAAS

Bei Betrachtung der Veränderung der Konzentration der Renin mRNA unter chronischer Stimulation

des RAAS durch die Behandlung mit einer low-salt Diät und dem ACE-Hemmer Enalapril stellte man fest, dass in Wildtypen und in induzierten Cx-40 knock-out Tieren die Konzentration der Renin mRNA zwar signifikant anstieg, aber keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen auftraten (**Abb. 16**). Entscheidend dabei war, dass dieser Anstieg bei beiden Versuchsgruppen gleich stark ausgeprägt war. Sowohl bei den Wildtypen als auch bei den induzierten Cx-40 KO-Tieren kam es im Mittel zu einem 3-4-fachen Anstieg der Renin mRNA.

Weder unter normalen Bedingungen, noch bei chronischer Stimulation des RAAS zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypen und den induzierten Cx-40 KO-Mäusen in Bezug auf die Abundanz der Renin mRNA.

## 4. Untersuchungen zur Positionierung von reninbildenden Zellen nach induzierter Cx-40 Deletion

### 4.1 Vergleich von Wildtypen und Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren unter basalen Bedingungen

Beim Vergleich von immunhistologischen Aufnahmen nicht stimulierter Wildtypen mit nicht stimulierten Mäusen, bei denen versucht wurde durch 10-tägige Verabreichung von Tamoxifen eine Deletion des Cx-40 Gens herbeizuführen, zeigten sich in histologischen Aufnahmen deutliche Unterschiede.

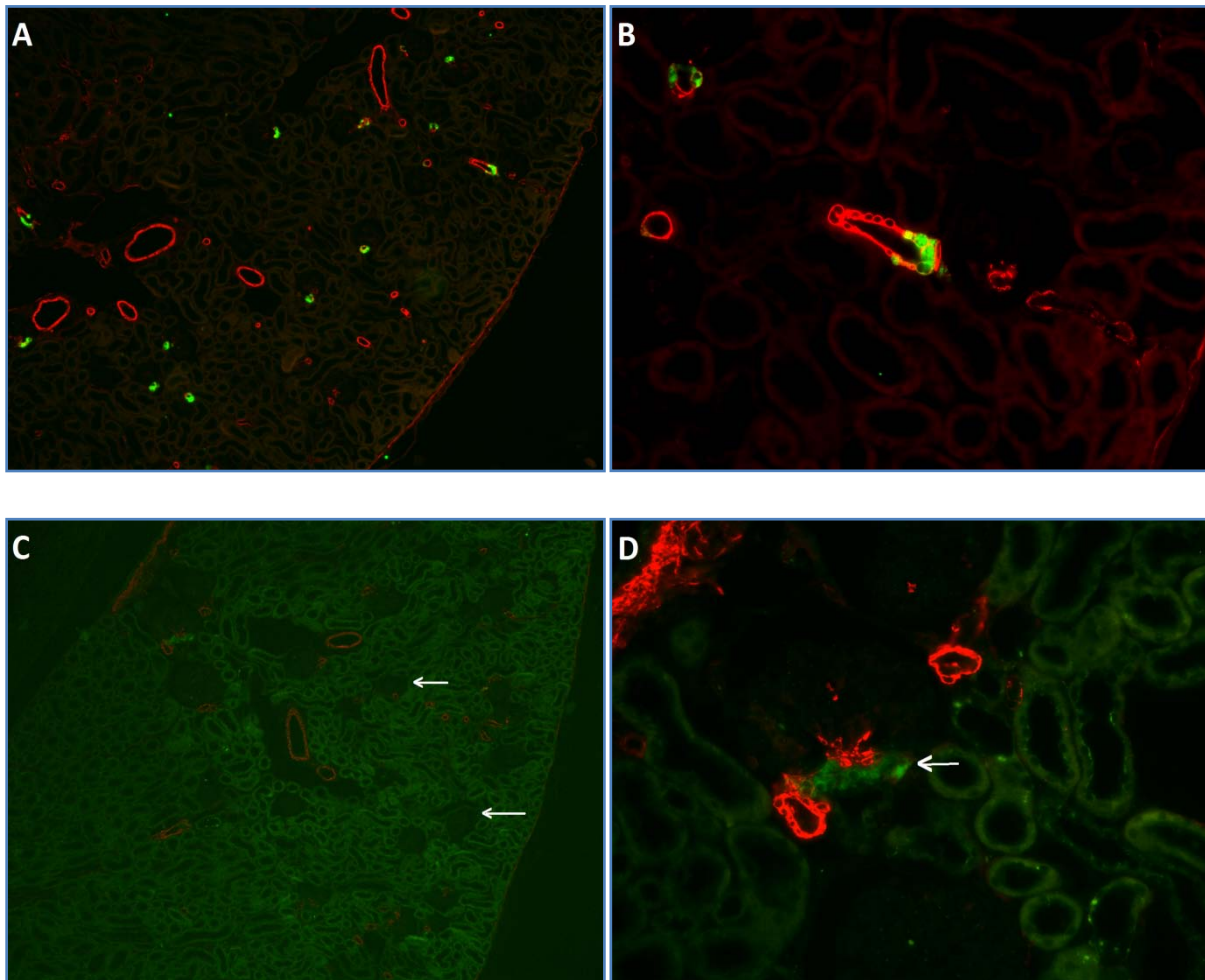
In der histologische Übersichtsaufnahme eines unbehandelten Wildtyps (**Abb. 17 A**) zeigte sich die für einen unbehandelten Wildtyp typische Menge an Reninzellen, wobei ausschließlich reninpositive Glomeruli zu sehen waren. Bereits in dieser Vergrößerung zeigte sich, dass keine Reninproduktion in den arcuaten Seitenästen und den Interlobulararterien stattfand.

Die Detailaufnahme eines Ausschnitts aus der Übersichtsaufnahme (**Abb. 17 B**) zeigte die typische juxtaglomeruläre Position der reninbildenden Zellen unmittelbar vor dem Übergang in den Glomerulus. Lediglich in den terminalen Abschnitten der afferenten Arteriole waren Reninsignale nachweisbar, im Bereich der efferenten Arteriolen fand keine Reninproduktion statt. Die Detailaufnahme zeigte auch die Integration der Reninzellen in die Tunica media der affereten Arteriole, die typische kubische Form der Zellen und, dass sie über das Niveau der eher flachen länglichen Glattmuskelzellen hinausreichten. Auch sah man deutlich, dass die Reninzellen überwiegend Renin und nur in sehr geringem Maße Glattmuskelaktin exprimierten.

Bei der Betrachtung der Übersichtsaufnahme einer unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus (**Abb. 17 C**) fiel auf, dass man im Unterschied zum unbehandelten Wildtyp nur sehr wenige reninpositive Glomeruli finden konnte und dass die Menge an reninproduzierenden Zellen insgesamt deutlich niedriger war. Bereits die Übersichtsaufnahme wies auf eine ektope Positionierung von Reninzellen an reninpositiven Glomeruli hin. Wie im unbehandelten Wildtyp konnte man auch beim induzierten knock-out keine Reninproduktion in den arcuaten Seitenästen oder den Interlobulararterien finden.

Die vergrößerte Darstellung eines reninpositiven Glomerulus (**Abb. 17 D**) in einer Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre Maus zeigte die juxtaglomeruläre Position der Reninzellen, jedoch waren diese ektope positioniert, da

sie sich deutlich außerhalb der Gefäßwand befanden. Durch die Zusammenlagerung mehrerer Reninzellen entstand das Bild von Reninnestern. In Bezug auf Größe und Form zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zum Wildtyp, da die Reninzellen auch im induzierten knock-out eine kubische Form aufwiesen. In den efferenten Arteriolen kam es -wie auch im unbehandelten Wildtyp- zu keiner Reninproduktion.



**Abb. 17:** Dargestellt ist jeweils eine Übersichtsaufnahme und eine Detailaufnahme eines unbehandelten Wildtyps (A und B) und einer Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus (C und D). Renin ist jeweils grün und Aktin rot dargestellt. Auffällig sind u.a. die vielen reninnegativen Glomeruli in der Übersichtsaufnahme der Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus (Pfeile in Abbildung C) und die ektope Positionierung der Reninzellen außerhalb der afferenten Arteriole in der Detailaufnahme des selben Genotyps (Pfeil in Abbildung D).

In folgender Tabelle sind die durch immunhistologische Färbungen erkennbaren Unterschiede zwischen Wildtypen und einem in der ausdifferenzierten Niere induzierten Cx-40 knock-out unter Normalbedingungen nochmals kurz gegenübergestellt.

Vergleich der	Wildtyp	Induzierter Cx-40 knock-out
<b>Position der Reninzellen in Bezug auf das Gefäßsystem</b>	juxtaglomeruläre Position, am Übergang in das Kapillarnetzwerk	juxtaglomeruläre Position, am Übergang in das Kapillarnetzwerk
<b>reninpositiven Glomeruli</b>	ausschließlich reninpositive Glomeruli	kaum reninpositive Glomeruli falls positiv, dann mit Reninestern
<b>Menge an Reninzellen</b>	physiologischer Normalzustand	deutlich vermindert
<b>genauen Position der Reninzellen innerhalb der Gefäßwand</b>	Integration in die Tunica media der afferenten Arteriole	ektopye Lokalisation; außerhalb der Tunica media der afferenten Arteriole
<b>Form der Reninzellen</b>	typisches epitheloidartiges Aussehen	typisches epitheloidartiges Aussehen

#### 4.2 Vergleich von Wildtypen und Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren unter stimulierten Bedingungen

Bei Stimulation des RAAS durch eine low-salt Diät in Kombination mit Verabreichung von Enalapril, kam es in Kontrollen und Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren in gleicher Weise zu Veränderungen der Reninexpression.

Bei Betrachtung der histologischen Übersichtsaufnahme eines stimulierten Wildtyps (**Abb. 18 A**) fiel eine Zunahme an Reninzellen im Vergleich zum unstimulierten Wildtyp auf. Ähnlich wie beim unstimulierten Wildtyp sah man ausschließlich reninpositive Glomeruli und keine Reninproduktion in den arcuaten Seitenästen und in den Interlobulararterien.

Die Detailaufnahmen eines stimulierten Wildtyps (**Abb.18 B-D**) zeigten die unter Stimulation typische retrograde Rekrutierung entlang der afferenten Arteriolen. Die Reninzellen, die sich unmittelbar am Übergang zum Glomerulus befanden, wiesen ein typisches epitheloidartiges Aussehen auf. Die rekrutierten Reninzellen hingegen zeigten keine kubische Form, da sie deutlich kleiner und schmaler waren. Auch zeigten sie eine Koexpression von Renin und Glattmuskelaktin.

Bei Betrachtung der Übersichtsaufnahme einer stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus (**Abb. 18 E**) fielsowohl im Vergleich zum stimulierten Wildtyp als auch im Vergleich zur unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mauseine deutliche Zunahme an Reninsignalen, eine gesteigerte Rekrutierung von Reninzellen entlang der afferenten Arteriole und die Ausbildung von sehr prominenten Reninnestern mit ektopt lokalisierten Reninzellen auf. In den efferenten Gefäßen fand jedoch keine Reninproduktion statt. Im Unterschied zum unstimulierten induzierten knock-out zeigten sich ausschließlich reninpositive Glomeruli.

Die Detailaufnahmen (**Abb.18 F-G**) von stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen zeigten eine deutliche Rekrutierung von Reninzellen. Man konnte erkennen, dass die Reninnester deutlich stärker ausgeprägt waren als in der unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus. Die Reninzellen, die sich in juxtaglomerulärer Position befanden waren ektopt lokalisiert, da sie sich nicht innerhalb der Tunica media der afferenten Arteriole befanden. Die rekrutierten Zellen waren hingegen in der Tunica media integriert, wiesen jedoch keine epitheloidartiges Aussehen auf, da sie deutlich kleiner und schmaler waren als die Reninzellen im juxtaglomerulären Bereich.

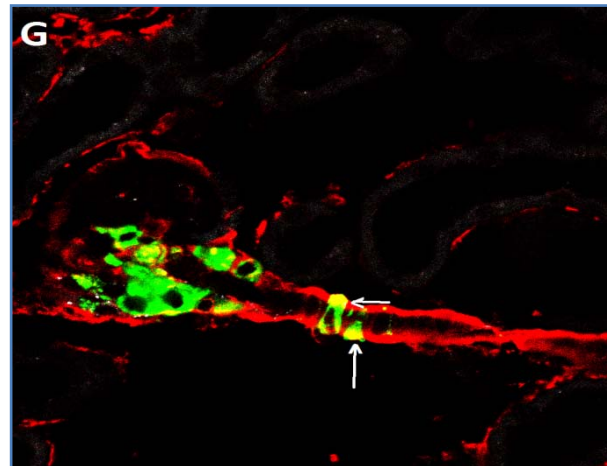
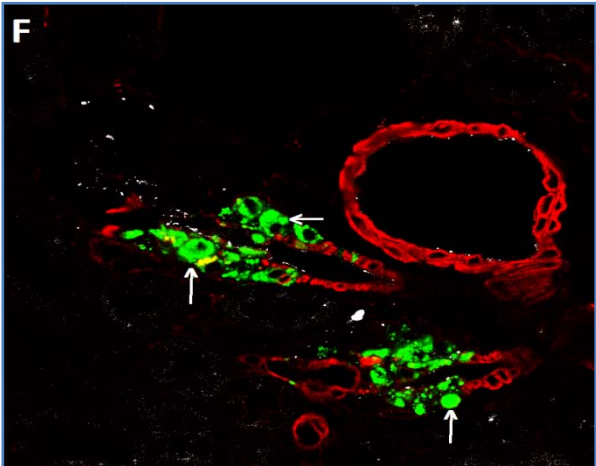
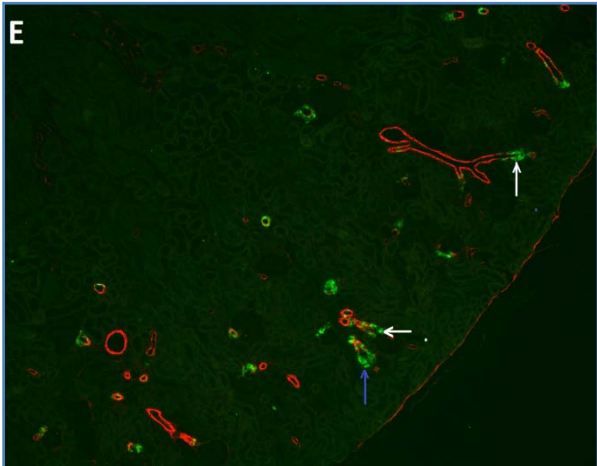
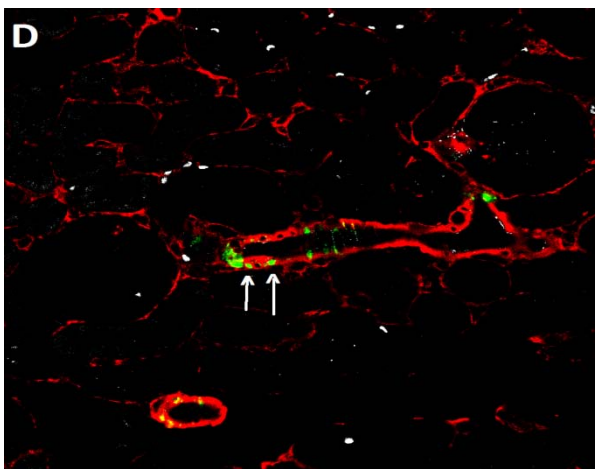
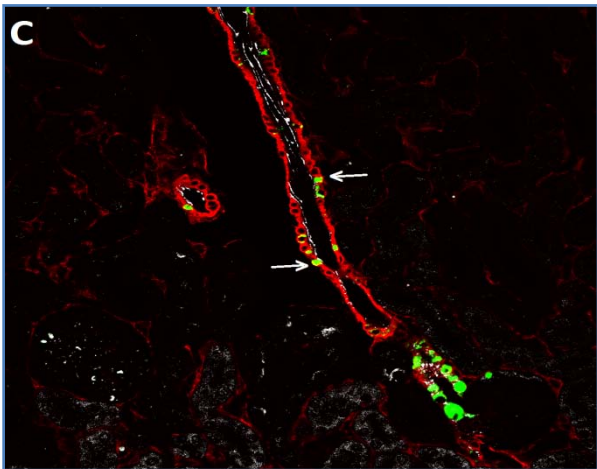
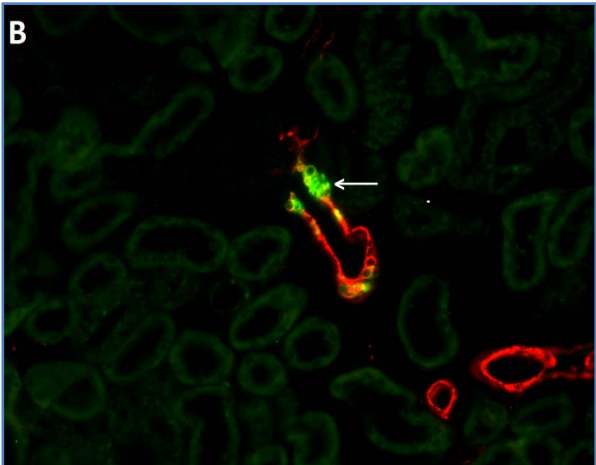
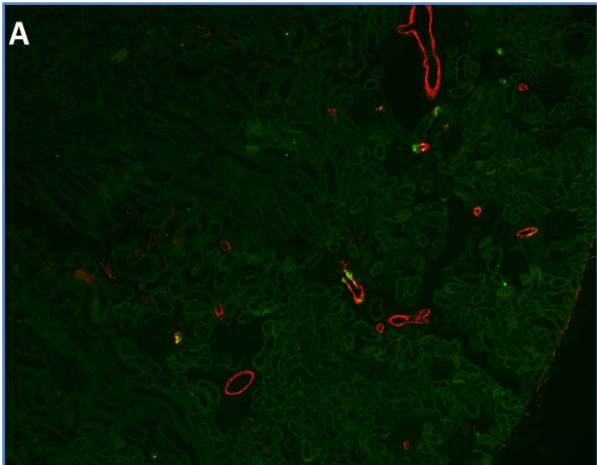


Abb. 18: A: Zunahme von Reninsignalen im Wildtyp unter Stimulation des RAAS. B-D: Retrograde Rekrutierung von Reninzellen im stimulierten Wildtyp mit epitheloidartigen Zellen unmittelbar am Übergang in den Glomerulus (Pfeil in Abb.B) und von deutlich schmäleren rekrutierten Reninzellen ohne epitheloidartiges Aussehen entlang der afferenten Arteriole (Pfeile in den Abb. C und D). E: Deutlich erhöhte Dichte an Reninsignalen bei einer stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus im Vergleich zum stimulierten Wildtypen mit stärker ausgeprägter retrograder Rekrutierung (weiße Pfeile) und sehr prominenten Reninnestern (blauer Pfeil). F-G: Erheblich stärker ausgeprägte Reninnester in stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup>Tam Cre Mäusen als in der unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus mit ektop lokalisierten kubischen Reninzellen (Pfeile in Abb. F) und mit rekrutierten und in die Gefäßwand integrierten Reninzellen entlang der afferenten Arteriole (Pfeile in Abb. G). Die roten Signale entsprechen dem Glattmuskelaktin, grün entspricht Renin. In den Abb. C, D, F und G ist Cx-40 durch die weißen Signale repräsentiert.

Vergleich der	stimulierter Wildtyp	stimulierter Cx- 40 <sup>fl/fl</sup> Tam Cre knock- out
<b>Position der Reninzellen in Bezug auf das Gefäßsystem</b>	retrograde Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole	retrograde Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole
<b>reninpositiven Glomeruli</b>	ausschließlich renin-positive Glomeruli	ausschließlich reninpositive Glomeruli mit prominenten Reninnestern
<b>Menge an Reninzellen</b>	mehr als im unstimulierten Wildtyp	deutlich mehr als im stimulierten Wildtyp und der unstimulierten Cx-40 <sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus
<b>genauen Positon der Reninzellen innerhalb der Gefäßwand</b>	ausschließlich in die Gefäßwand integriert	Reninzellen unmittelbar am Übergang in den Glomerulus: keine Integration in die Tunica media (ektopye Positionierung) Reninzellen entlang der afferenten Arteriole: Integration in Tunica media

## 5. Dreidimensionale Rekonstruktionen zur Beurteilung der Reninverteilung entlang des Gefäßbaumes

### 5.1 Das Reninexpressionsmuster in der unstimulierten adulten Wildtyp-Maus

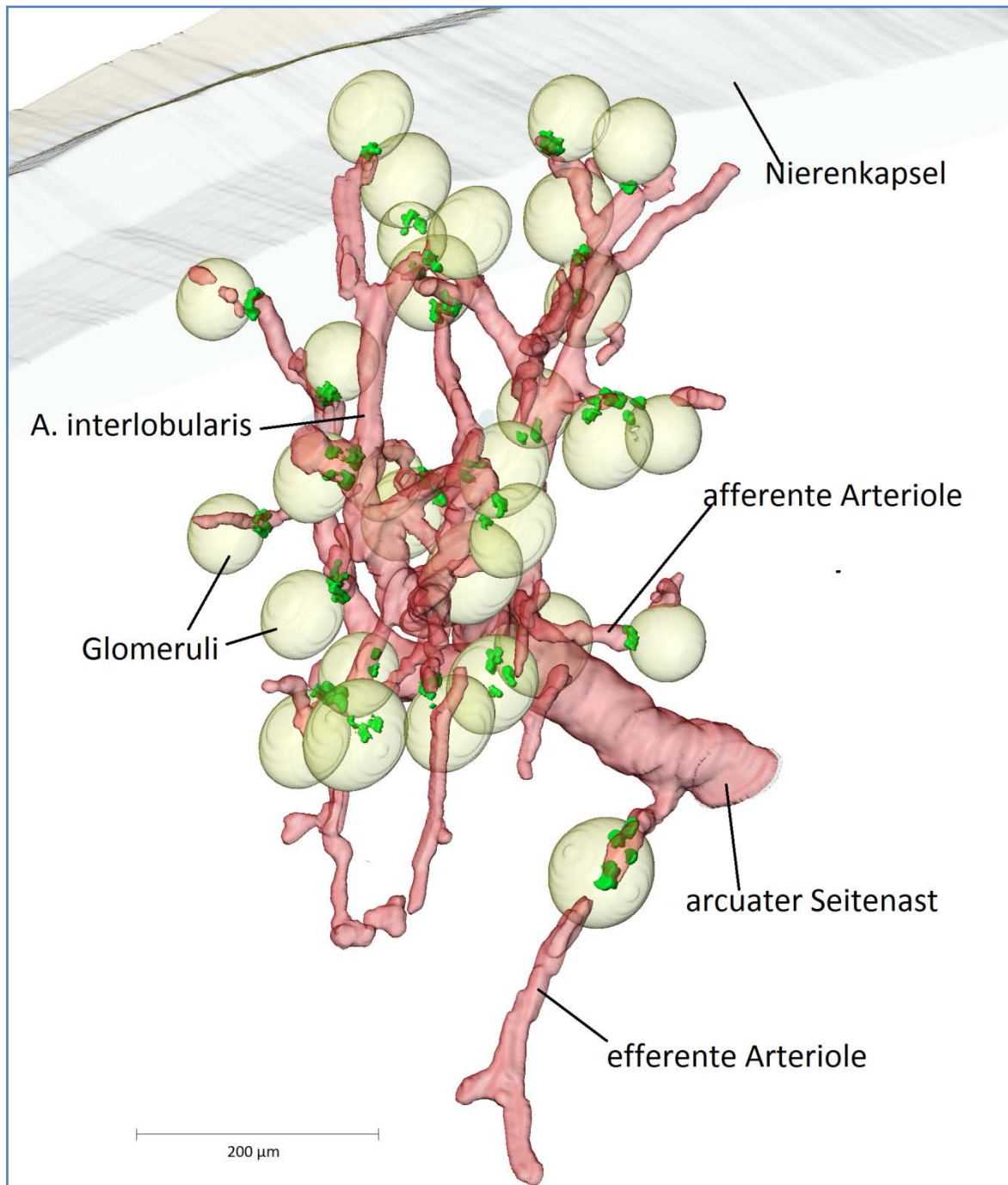


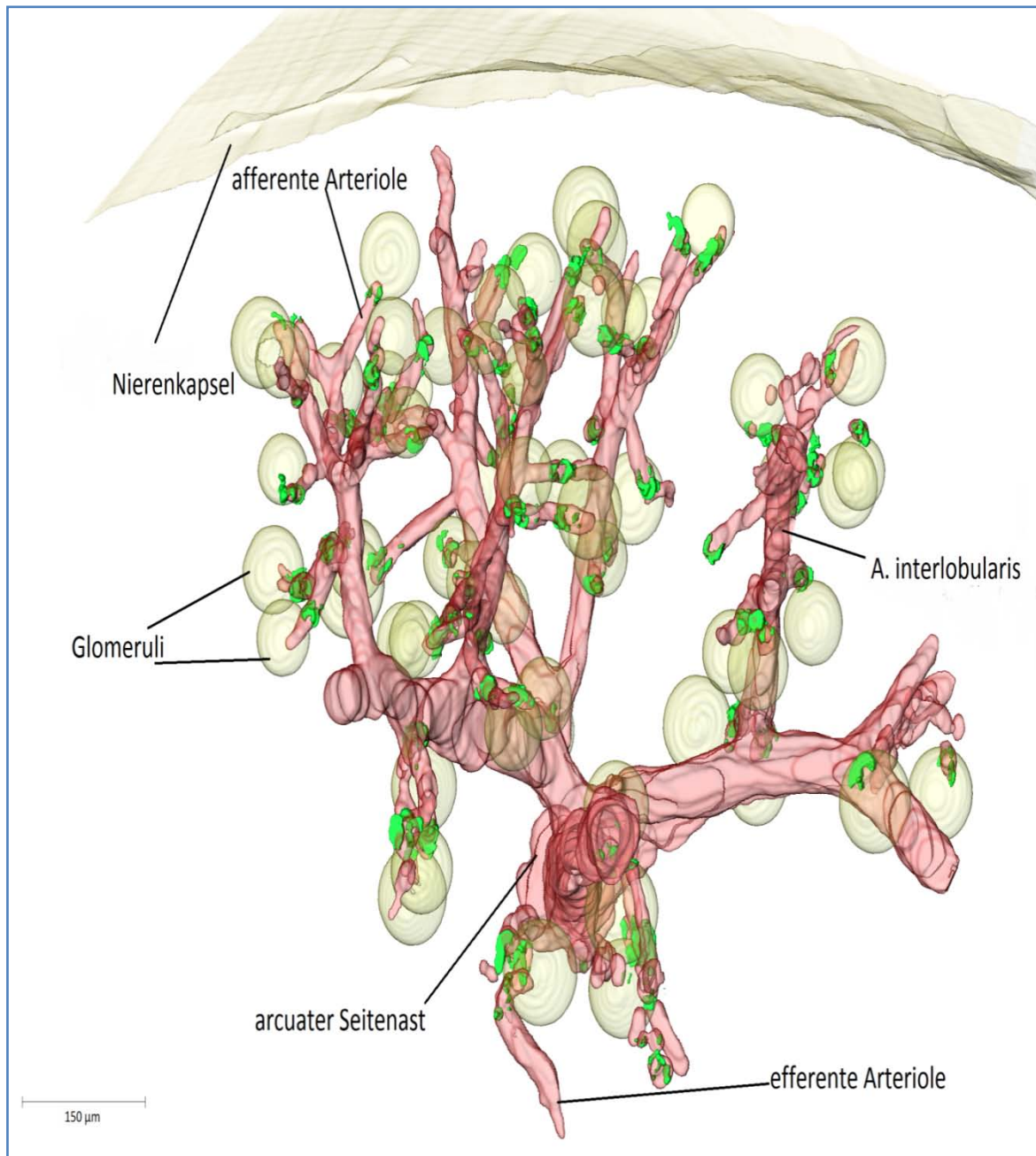
Abb. 19: Amira 3D-Rekonstruktion der Renin (grün)- und Glattmuskelaktin (rot)-Immunfluoreszenzsignale in einem Gefäßbaumausschnitt einer unbehandelten adulten Wildtyp-Maus. Auch die Glomeruli (gelb) und die Nierenkapsel (transparent) sind dargestellt.

Der Gefäßbaum der unbehandelten Wildtypmaus (**Abb. 19**) zeigte das charakteristische Verteilungsmuster der Reninzellen innerhalb der Niere unter normalen Bedingungen. Auch die Menge an Reninzellen entsprach dem physiologischen Normalzustand bei normaler Salzaufnahme durch Zufuhr von Normalfutter mit 0,6 % NaCl. Somit war die obige Rekonstruktion ein wichtiger Vergleichsmaßstab für die folgenden Rekonstruktionen, da sie den physiologischen Normalzustand widerspiegelte.

Auffällig an der Verteilung der reninproduzierenden Zellen war das konstante Expressionsmuster. Die Reninzellen befanden sich stets am Ende der afferenten Arteriolen, unmittelbar vor dem Übergang in das Kapillarnetzwerk. Während man dieses juxtaglomeruläre Expressionsmuster ausnahmslos an jedem Glomerulus beobachten konnte, fand weder in der efferenten Arteriole, noch in den arcuaten Seitenästen eine Reninproduktion statt. Auf Grund dieses Expressionsmusters konnte festgehalten werden, dass in einem unstimulierten Wildtyp jeder Glomerulus Renin exprimierte. Dabei waren in Bezug auf das Verteilungsmuster der Reninzellen keine Unterschiede zwischen juxtamedullären und cortikalen Nephronen vorhanden.

In Bezug auf die Menge der Reninproduktion entsprach diese dem physiologischen Zustand, bei normaler Salzaufnahme durch Normalfutter mit 0,6 %NaCl.

**5.2 Das Reninexpressionsmuster in der adulten Wildtyp-Maus nach Stimulation des RAAS durch zweiwöchige Niedrigsalz-Diät in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril (wt+LS/E)**



**Abb. 20:** 3D-Rekonstruktion der Renin (grün)- und Glattmuskelaktin(rot)-Immunfluoreszenzsignale in einem Gefäßbaumabschnitt einer adulten Wildtyp-Maus nach 14-tägiger Niedrigsalz-Diät in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril (wt+LS/E). Auch die Glomeruli (gelb) und die Nierenkapsel (transparent) sind dargestellt.

Die dreidimensionale Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters in einer adulten Wildtyp-Maus nach zweiwöchiger Stimulation des RAAS durch Niedrigsalz-Diät in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril (wt+LS/E) (**Abb. 20**) zeigte die Verteilung der reninbildenden Zellen nach chronischer Stimulation des RAAS mit einer Niedrigsalzdiät und kombinierter ACE-Inhibition über 10 Tage. Hierbei zeigte sich eine stark erhöhte Reninproduktion, die auf eine retrograde Rekrutierung von Reninzellen entlang der terminalen Arteriolen zurückzuführen war, sodass man im Unterschied zum unstimulierten Wildtyp- auch in den größeren Abschnitten der terminalen Arteriolen Reninzellen fand. In den anderen Abschnitten des Gefäßbaumes, wie den arcuaten Seitenästen, den Interlobulararterien, sowie den efferenten Arteriolen, fand keine Reninbildung statt. Die Rekonstruktion zeigte deutlich, dass es in Bezug auf die Anzahl an reninpositiven Glomeruli keinen Unterschied gibt zu einem unstimulierten Wildtyp, da auch unter Stimulation des RAAS an jedem Glomerulus eine Reninproduktion stattfindet.

### 5.3 Das Reninexpressionsmuster eines nicht stimulierten Wildtyps und eines unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieres im Vergleich

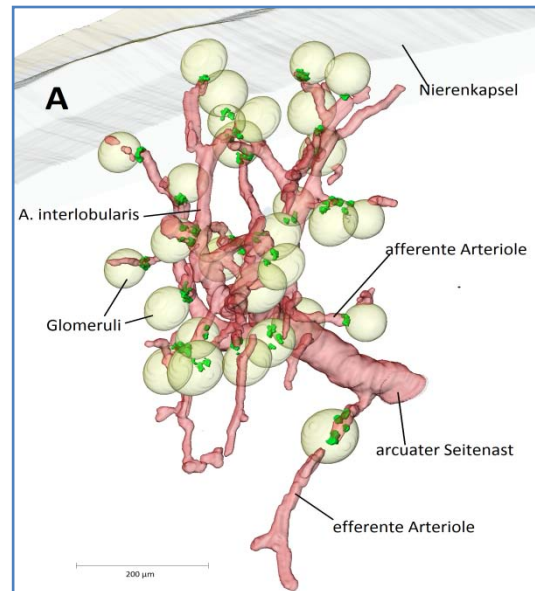
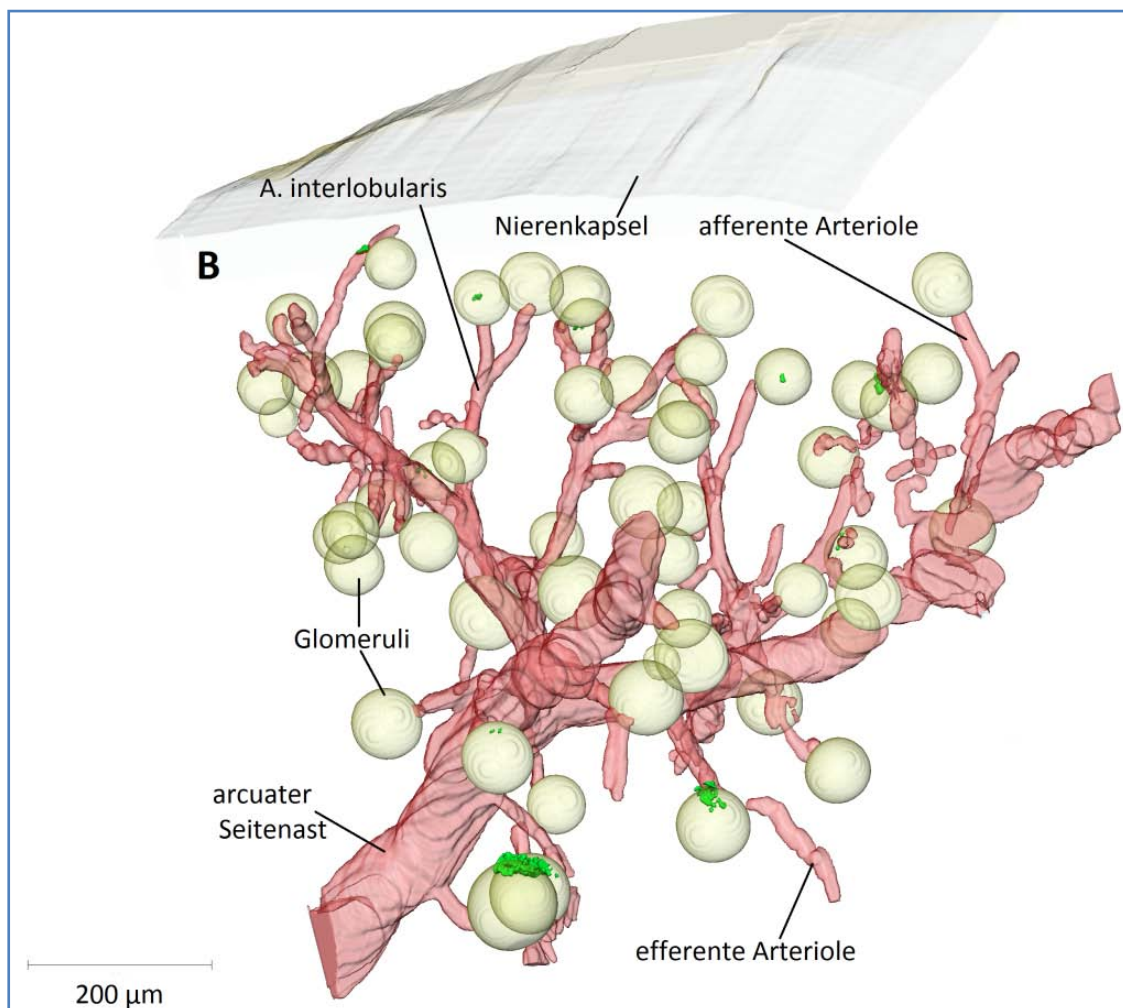


Abb. 21:3D-Rekonstruktion der Renin (grün)- und Glattmuskelaktin (rot)-Immunfluoreszenzsignale in einem Gefäßbaumausschnitt einer adulten unstimulierten Wildtyp-Maus (A) und eines unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieres (B) im Vergleich.



Bei Betrachtung des Gefäßbaumes eines unstimulierten Wildtyps und eines unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieres der vorliegenden Arbeit im Vergleich (**Abb. 21 A und B**) fielen in Bezug auf die Gefäße und die Glomeruli keine größeren Unterschiede auf. Bei beiden Rekonstruktionen zeigten sich annähernd gleich große Glomeruli und auch die Gefäße wiesen in etwa den selben Durchmesser auf.

Beim Vergleich der Verteilung der Reninzellen zeigten sich jedoch einige deutliche Unterschiede. Beim Wildtypen (**Abb. 21 A**) ließ sich das, unter 5.1 beschriebene, typische juxtaglomeruläre Expressionsmuster ohne Ausnahme an jedem Glomerulus finden. Bei der Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Rekonstruktion (**Abb. 21 B**) zeigte sich hingegen, dass man an einigen Stellen unmittelbar vor dem Übergang in den Glomerulus ("periglomerulär") deutliche Reninnester erkennen konnte. Eine Ansammlung von Reninzellen fand sich zwar auch bei der Rekonstruktion der Kontrolle, d.h. unter physiologischen Bedingungen, doch waren diese Ansammlungen bei weitem nicht so deutlich ausgeprägt wie bei der Rekonstruktion des induzierten Cx-40 knock-outs. Auffällig war auch, dass sich die Reninzellen, die sich bei der Rekonstruktion der Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tiere zu Nestern zusammenlagerten, zum Teil außerhalb der Wand der afferenten Arteriole befanden, was im Wildtypen nicht der Fall war. Ein weiterer, deutlich sichtbarer Unterschied war auch, dass Reninzellen bei der induzierten Cx-40 knock-out Rekonstruktion nur an einigen wenigen Glomeruli zu finden waren, während im Wildtyp typischerweise an jedem Gefäßpool eine Reninexpression beobachtet werden konnte. Folglich war die Anzahl reninpositiver Glomeruli in Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Rekonstruktion deutlich niedriger als im Wildtyp.

#### 5.4 Das Reninexpressionsmuster eines stimulierten Wildtyps und eines stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieres im Vergleich

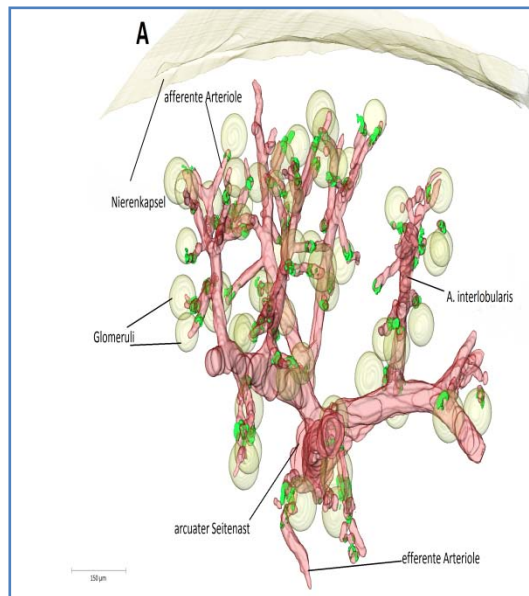
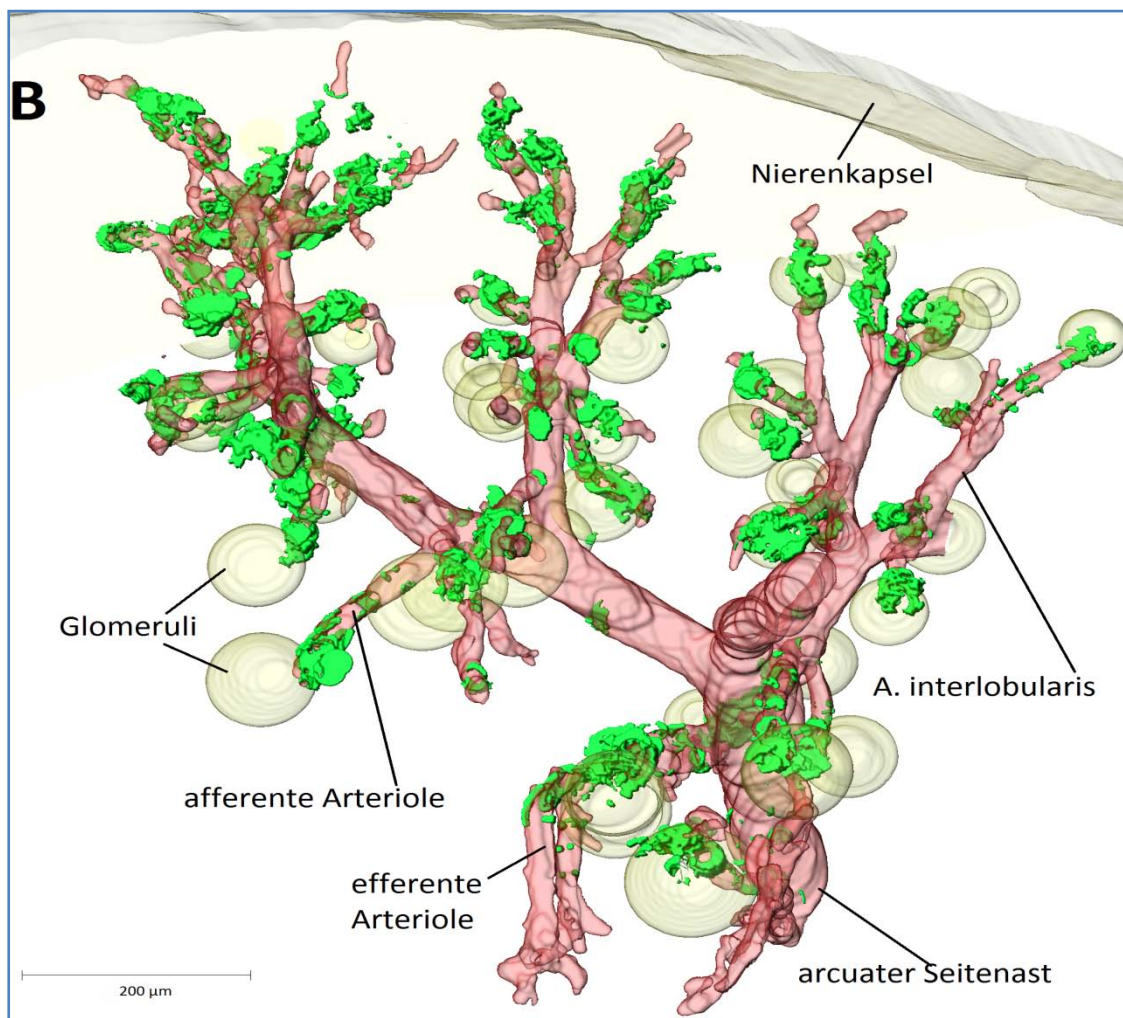


Abb. 22:3D-Rekonstruktion der Renin (grün)- und Glattmuskelaktin (rot)-Immunfluoreszenzsignale in einem Gefäßbaumausschnitt einer stimulierten adulten Wildtyp-Maus (A) und eines stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieres (B) im Vergleich, nach jeweils 10-tägiger Stimulation des RAAS durch eine Nidrigsalzdiät und durch den ACE-Inhibitor Enalapril.



Sowohl das RAAS des stimulierten Wildtyps (**Abb. 22A**), als auch das des stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieres (**Abb. 22B**) wurden jeweils über den gleichen Zeitraum hinweg durch eine low-salt Diät und durch den ACE-Hemmer Enalapril stimuliert.

Betrachtete man den Gefäßbaum eines stimulierten Wildtyps und den einer stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus im Vergleich, so fielen in Bezug auf die Gefäße und die Glomeruli keine größeren Unterschiede auf. Bei beiden Rekonstruktionen zeigten sich annähernd gleich große Glomeruli und auch die Gefäße weisen in etwa den selben Durchmesser auf.

In Bezug auf die Verteilung und Anzahl an Reninzellen zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede. Bei stimulierten Wildtypen kam es typischerweise zu der unter **Punkt 5.2** beschriebenen retrograden Rekrutierung von Reninzellen entlang der afferenten Arteriolen, sodass auch in den größeren Abschnitten der terminalen Arteriolen eine Reninproduktion stattfand. Bei Betrachtung des stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieres fiel auf, dass es auch hier zu einer Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole kam. In stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus waren viele Reninzellen ektop positioniert, da sie sich deutlich außerhalb der Gefäßwand befanden. Auffällig dabei war, dass diese ektope Positionierung deutlich stärker ausgeprägt war als in der unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus, sodass sich wesentlich dichtere Reninnester im stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tier ausbildeten, als dies in der unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus der Fall war.

Des Weiteren kam es -im Unterschied zum stimulierten Wildtyp- zu einer geringfügigen Reninexpression im Bereich der Interlobulararterien. Auch wurde deutlich, dass es bei der stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus, ähnlich wie bei beiden Wildtypen (stimuliert und unstimuliert), zu einer Reninexpression an allen Glomeruli kam, sodass sich die Anzahl an reninpositiven Glomeruli zwischen den Wildtypen und der stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus kaum unterschied. Dadurch wies das stimulierte Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tier nicht nur in Bezug auf die Anzahl an Reninzellen deutliche Unterschiede zum unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tier auf, sondern auch durch die Anzahl an reninpositiven Glomeruli.

# Diskussion

## 1. Effizienz der induzierten Cx-40 Gendeletion

In der vorliegenden Arbeit wurden die phänotypischen Auswirkungen einer nach dem Tamoxifen-ER Cre-Lox P Systems induzierten Connexin-40 Gendeletion in der bereits vollständig ausdifferenzierten Niere untersucht.

Betrachtet man die histologischen Übersichtsaufnahmen der unstimulierten und der stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäuse der vorliegenden Arbeit, so zeigt sich jedoch, dass sich immer noch Fluoreszenzsignale finden lassen, die die Expression von Connexin-40 in den Nieren dieser Tiere nachweisen. Auch die Messungen der Cx-40 mRNA Konzentrationen (vgl. **Abb. 15**) in den verschiedenen Versuchstieren zeigen, dass deren Expression nach Induktion mit Tamoxifenfutter zwar in den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen jeweils auf ca. 25% im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen gesunken ist, aber auch, dass immer noch eine Restexpression des Gens vorhanden ist. Sowohl die mRNA Daten als auch die histologischen Aufnahmen zeigen damit, dass die Cx-40 Expression auf mRNA und Proteinebene zwar deutlich abgenommen hat, jedoch mit dem hier angewendeten Induktionsprotokoll keine vollständige Deletion des Connexin-40 Gens gelungen ist.

Bereits in anderen Arbeiten wurde versucht mit Hilfe des Cre-Lox P Systems eine gewebespezifische und zeitlich determinierte Deletion von bestimmten Genen hervorzurufen, was im Rahmen dieser Arbeit half den Erfolg der versuchten Gendeletion einzuschätzen.

In der Arbeit von *Milbradt A.* aus dem Jahre 2011 wurde versucht eine konditionale gewebespezifische Deletion des Ryanodinrezeptor RyR2 Gens in Mäuseherzern mit Hilfe dieses Systems herbeizuführen. Hierzu wurde eine Mauslinie mit geflochtenen RyR2 Gen mit Cre-Rekombinase exprimierenden Tieren verpaart (*Milbradt A., 2011*). Durch die gewebespezifische Expression der Cre-Rekombinase im ganzen Herzen konnte ein gewebespezifischer und zeitlich kontrollierter knock-out generiert werden. Durch die intraperitoneale Injektion von 2 mg/100µl Miglyol an fünf aufeinanderfolgenden Tagen, im Alter von 6-8 Wochen, wurde die Gendeletion induziert (*Milbradt A., 2011*). Die Experimente mit den RyR2-KO Tieren starteten 4 Wochen nach der ersten Injektion (*Milbradt A., 2011*). Um die Expression der mRNA der drei RyR Isoformen am Herzen

überprüfen zu können, wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Die RyR2 Deletion war im linken Vorhof, im Sinusknoten und in den Ventrikeln erfolgreich, jedoch war eine leichte Expression im rechten Vorhof nachweisbar (Milbrandt A., 2011). Zum Nachweis einer tatsächlichen Deletion des Proteins in den KO-Tieren wurde eine Western- Blot Analyse durchgeführt. In homozygoten KO-Tieren stellte sich heraus, dass in den Ventrikeln kein RyR2 Protein mehr nachgewiesen werden konnte, wohingegen das Protein in den Kontrollen exprimiert wurde (Milbrandt A., 2011). In den Vorhöfen konnte in den homozygoten KO-Tieren und in den Kontrollen eine Expression nachgewiesen werden (Milbrandt A., 2011). Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei dieser Arbeit nicht gelungen ist, eine vollständige Deletion eines Proteins in allen Kompartimenten des Herzens zu erzeugen. Trotzdem wiesen die KO-Tiere u. a. vergrößerte Herzen auf, wobei v. a. der linke Ventrikel stark dilatiert erschien und das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrollen um das 3-fache erhöht war. EKG-Daten zeigten bei den KO-Tieren eine kontinuierliche Abnahme der Herzfrequenz bis zu deren Tod, wobei bereits eine Woche vor deren Tod eine deutliche Sinusbradykardie auffällig war. Zudem fehlte ein Tag-Nacht Rhythmus (Milbrandt A., 2011). Auf morphologischer und struktureller Ebene zeigte sich in den KO-Tieren thrombotisches Material in den beiden Vorhöfen, eine pathologische Fibrosierung in den Ventrikeln, sowie eine Größenzunahme der Myozyten mit Vakuolenbildung und ohne deren typischer Querstreifung (Milbrandt A., 2011).

Ebenfalls 2011 untersuchte Lothar A. an Mäusen den Einfluss des kardialen Mineralokortikoidrezeptors (MR) auf kardiale Hypertrophie und auf die Funktion des Herzens. Um die Funktion des MR in Kardiomyozyten zu charakterisieren, wurde mit Hilfe des Cre-Lox P Systems ein Modell generiert mit Zelltyp-spezifischer Deletion des Rezeptors. Dieses wurde unter basalen Bedingungen und nach künstlich ausgelöster Aortenkonstriktion in 8-10 Wochen alten Mäusen zur Induktion von Hypertrophiemechanismen untersucht. Zur Erzeugung des zellspezifischen knock-outs wurde eine Mauslinie, bei der das Exon 3 des MR-Gens von zwei lox-P Bindestellen flankiert wurde, mit einer Mauslinie gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Myosin-Leichtketten-Promotors exprimiert. Um die selektive Deletion des Rezeptors im Kardiomyozyten nachzuweisen, wurden adulte Kardiomyozyten und Nicht-Myozyten aus Kontrolltieren und den KO Tieren isoliert und anschließend wurde die Konzentration der mRNA des MR mittels PCR bestimmt (Lothar A., 2011). In Nicht-Myozyten zeigten sich keine Unterschiede in der Konzentration der mRNA des MR. In Myozyten nahm die Abundanz der mRNA deutlich ab im Vergleich zu den Kontrollen, jedoch konnte keine vollständige Deletion des MR-Gens durch das Cre-Lox P System erzeugt werden, da noch mRNA Kopien nachgewiesen werden konnten (Lothar A., 2011). Trotz unvollständiger Deletion wiesen die Versuchstiere mit selektiver MR-Deletion im Vergleich zu den Kontrollen unter Normalbedingungen u. a. ein höheres Ventrikelgewicht und eine vergrößerte Myozytenquerschnittsfläche (Lothar A., 2011). Unter Stimulation der

Hypertrophie nahmen die Werte beider Parameter zu, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Lothar A, 2011).

Die Arbeiten von Milbrandt A. und Lothar A. zeigen, dass eine vollständige induzierteselektive Deletion eines Gens nicht trivial ist. Ihre Ergebnisse belegen jedoch, dass es auch durch eine unvollständige Deletion zu phänotypischen Veränderungen auf Grund des Gendosiseffekts kommen kann.

Hösl E. gelang es jedoch 2008 eine vollständige konditionale Gendeletion des HCN4-Promotors im Reizleitungssystem des Herzens mit Hilfe des Cre-Lox P Systems und Tamoxifen zu erzeugen. Der HCN4 Kanalist diejenige Isoform dieser Kanäle, die spezifisch und besonders stark am Herzen exprimiert wird. Um die spezifische Gendeletion zu erzeugen wurden gefloxt HCN4L2/L2-Mäuse mit HCN4KIT/+Mäusen verpaart. In den dabei entstandenen HCN4KIT/L2 Mäusen wurde durch die intraperitoneale Injektion von Tamoxifen (Konzentration: 10 mg/ml; Sigma) an 5 aufeinander folgenden Tagen die Cre-Rekombinase induziert, wobei jeweils 1 mg Tamoxifen pro 25 g Körpergewicht verwendet wurde (Hösl E., 2008). Hierdurch wurde lediglich in den Zellen des Sinus- und AV-Knotens ein HCN4KO erzeugt. Der Gendeletionserfolg wurde durch DNA- und RNA-Untersuchungen von Sinusknotengewebe belegt. Auf DNA-Ebene konnte in den knock-out Tieren lediglich eine schwache artefaktbedingte Expression des Allels nachgewiesen werden, auf RNA-Ebene fand man keine HCN4-Expression mehr (Hösl E., 2008). Analyse via Westernplot und Gewebeschnitten belegten, dass in den KO-Tieren im Reizleitungssystem kein HCN4-Protein mehr gebildet wurde (Hösl E., 2008). Des Weiteren wurde eine Induktionsanalyse des HCN4 KOs durch Tamoxifen durchgeführt, um die minimale Tamoxifen- Dosis zu evaluieren, die für die Generierung eines knock-outs nötig ist. Dazu wurde HCN4KIT/L2- Mäusen 1-5 mal 1 mg Tamoxifen pro Tag injiziert und nach einer und nach vier Wochen Sinusknotengewebe isoliert und mittels Immundetektion untersucht. Dabei ergab sich eine klare Dosis- und Zeitabhängigkeit der Deletion (Hösl E., 2008). Bei der Betrachtung von Gewebeschnitten, bei denen das Gewebe 1 Woche nach der letzten Injektion isoliert wurde, konnte man eine stetige Proteinreduktion mit steigender Tamoxifeninjektion beobachten, wobei auch nach 5-maliger Injektion noch eine Proteinexpression beobachtet werden konnte. Betrachtete man jedoch Gewebeschnitte, bei denen 4 Wochen nach der letzten Injektion das Gewebe isoliert wurde, konnte bereits nach 4-maliger Injektion keine Expression mehr nachgewiesen werden (Hösl E., 2008). Bei den HCN4KIT/L2-Mäusen waren die Herzfrequenz und das EKG unauffällig, jedoch entwickelte sich innerhalb einer Woche nach Tamoxifen-Injektion bei denselben Tieren eine Sinusarrhythmie, die besonders bei niedrigen Frequenzen ausgeprägt war. In beiden Genotypen konnte die Herzfrequenz durch  $\beta$ -Agonisten (Isoprenalin), durch die HCN4-Kanäle indirekt reguliert werden und durch Laufen auf dem Laufband gesteigert werden. Die Senkung der

Herzfrequenz durch Agonisten des muscarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptors und durch A<sub>1</sub>-Adenosin Rezeptor Agonisten fiel in HCN4 KO-Mäusen deutlich stärker bzw. langanhaltender aus als in denselben Tieren vor Tamoxifeninjektion.

Die oben beschriebene Arbeit von *Hösl E.* zeigt, dass es in einigen Fällen bereits gelungen ist, eine komplette induzierte selektive Gendeletion mit Hilfe des Cre-Lox P Systems und Tamoxifen zu erzeugen, aber auch, dass es auf Grund der Dosis- und Zeitabhängigkeit der Deletion nicht trivial ist, ein passendes Protokoll zu entwickeln.

## 2. Phänotypologische Effekte der Connexin-40 Deletion in der adulten Niere: Vergleich der ermittelten Ergebnisse mit Daten von Mäusen mit systemischer Connexin-40 Gendeletion, von Mäusen mit zellspezifischer Connexin-40 Deletion, von Mäusen mit A96S Mutation und von Mäusen mit Cx-40KI45 Mutation

Im Folgenden sollen die Veränderungen der Reninexpression, die in der vorliegenden Arbeit durch einen knock-out des Connexin-40 Gens in vollständig ausdifferenzierten Nieren erzeugt wurden, beurteilt werden. Hierzu sollen die Ergebnisse mit den in der Literatur bereits beschriebenen Veränderungen an Mäusen mit genetisch verändertem Connexin-40 verglichen werden. Dabei handelt es sich um generelle knock-out Tiere, bei denen die Deletion von Connexin-40 bereits während der Nephrogenese vorlag, umreninzellspezifischen knock-out Mäuse, um Mäuse, die eine A96S Mutation im Cx-40 Gen aufwiesen und um Mäuse bei denen Cx-40 durch Cx-45 ersetzt wurde (Cx-40KI45).

### 2.1. Vergleich der Renin mRNA Daten

Betrachtet man den Renin mRNA Gehalt in Mäusen, bei denen eine Deletion von Connexin-40 bereits während der Nephrogenese vorliegt, stellt man deutliche Unterschiede fest, im Vergleich zu den Renin mRNA Konzentrationen, die auftreten, wenn Connexin-40 erst bei einer bereits ausdifferenzierten Niere deletiert wird.

Im Unterschied zum Wildtypen traten bei einem totalen Connexin-40 knock-out unter Normalbedingungen deutlich höhere Renin mRNA Spiegel auf (**Abb. 23 B**) (Krattinger N. et al., 2007), während sich bei einer Connexin-40 Deletion in der ausdifferenzierten Niere kein großer Konzentrationsunterschied zwischen dem Wildtyp und dem induzierten Cx-40 knock-out zeigte (**Abb. 23 A**). Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, dass während der Nephrogenese inhibierende Signale via Cx-40 verbreitet werden, die die Bildung von Renin in vielen Zellen unterdrückt, sodass es, wenn die Cx-40 Deletion bereits in der Nephrogenese vorliegt, zu einem deutlichen Anstieg der Renin mRNA kommt. Im Gegensatz dazu könnten die Signale, die sich nach Abschluss der Nierenentwicklung

über diesen Connexintyp ausbreiteneher Bedeutung haben für das korrekte "homing" der Reninzellen innerhalb der Tunica media der afferenten Arteriole und weniger für die Anzahl an Reninzellen. Wird bei Tieren mit totalem Cx-40 knock-out das RAAS z. B. durch den AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Candesartan oder durch den ACE-Hemmer Ramipril stimuliert, steigt die Konzentration der Renin mRNA, im Vergleich zum stimulierten Wildtypen, nur geringfügig weiter an. Somit ergeben sich für Wildtypen und bei totalem Cx-40 knock-out ähnliche mRNA Konzentrationen (**Abb. 23 B**). Dieser geringfügige Anstieg unter Stimulation bei totalem Cx-40 knock-out stellt einen bemerkenswerten Unterschied zu Nieren da, bei denen eine Deletion von Cx-40 im ausdifferenzierten Stadium erfolgt, da in diesem Fall der Konzentrationsanstieg der Renin mRNA unter Stimulation deutlich stärker ausgeprägt ist (**Abb 23 A**).

Nieren mit endothelspezifischer Cx-40 Deletion (Cx 40<sup>fl/fl</sup>-Tie2-Cre) oder reninzellspezifischer Cx-40 Deletion (Cx 40<sup>fl/fl</sup>-Renin-Cre) zeigten unter Normalbedingungen und unter Stimulation des RAAS keine Veränderungen der Renin mRNA Level im Vergleich zum Wildtyp (Cx 40<sup>fl/fl</sup>) (**Abb. 24 A**) (Wagner C. et al., 2010). Folglich scheinen reninzell- und endothelzellspezifische Cx-40 gap junctions, bzw. die Signale, die über diese übermittelt werden, keinen relevanten Einfluss auf die Anzahl an Reninzellen und somit auf die Konzentration der Renin mRNA zu haben.

Vergleicht man die Daten der vorliegenden Arbeit mit denen von Lübke *et al.* von 2010, die Mäuse generierten, bei denen die Aminosäure Alanin an Position 96 im Connexin 40 durch Serin ersetzt war (A96S Mutation im Cx-40, **vgl. 2.2.4 im Ergebnisteil**), sah man in Mäusen, die homozygot bzgl. dieser Mutation waren unter normalen Bedingungen einen eher geringen Anstieg der Renin mRNA Konzentration um ca. 40 % im Vergleich zum Wildtyp (**Abb. 24 B**) (Lübke *et al.*, 2004). Bei heterozygoten Tieren zeigte sich keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (**Abb 24 B**). Unter Stimulation des RAAS der verschiedenen Genotypen (**Abb. 24 C**) wiesen alle sehr ähnliche Renin mRNA Konzentrationen auf, wobei diese ca. 4 mal höher waren als unter Normbedingungen. Der Vergleich von Mäusen mit einer homozygoten A96S Mutation mit den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren der vorliegenden Arbeit zeigte, dass es in beiden Fällen unter Stimulation zu einem ca. 4-fachen Anstieg der Renin mRNA kommt, sodass in beiden Fällen das RAAS in etwa gleich effektiv stimuliert werden kann. Jedoch ist die absolute Konzentration in den A96S Mutanten unter Stimulation mehr als doppelt so hoch wie in den Tieren der vorliegenden Arbeit mit induziertem Cx-40 KO. Ungefähr das selbe Verhältnis zeigt sich auch unter normalen Bedingungen.

Bis vor kurzem war unklar, ob die fundamentale Rolle, die Cx-40 in Reninzellen einnimmt, auf spezifischen Funktionen dieses Connexins beruht, oder ob dieses Protein auch durch ein anderes Connexin ersetzt werden kann, wie durch Cx-45. Dieser Connexintyp wird normalerweise nicht in JG-Zellen exprimiert, sondern nur in afferenten Arteriolen und im Glomerulus (Schweda F. et al.,

2009). Aus diesem Grund untersuchten Schweda F. et al und Kurtz L. et al Mäuse, in denen die codierende Region von Cx-40 durch die codierende Region von Cx-45 ersetzt wurde (Cx-40KI45 Mäuse), was zur Expression von Cx-45, nicht jedoch von Cx-40, in Reninzellen führte. Verglichen mit Cx-40 Kanälen, haben gap junctions die aus Cx-45 aufgebaut sind eine niedrige elektrische Leitfähigkeit (20-40 vs. 200 pS) und sind sensitiver im Bezug auf Spannungsunterschiede zwischen den Zellen (Schweda F. et al., 2009). Das heißt, dass durch einen Austausch von Cx-40 durch Cx-45 die interzelluläre Kommunikation zwischen den JGA Zellen nicht vollständig unterbunden, sondern nur um ca. 90 % gesenkt wird. Diese Tatsache ist besonders relevant für die vorliegende Arbeit, da durch die Behandlung mit Tamoxifen kein vollständiger knock-out des Cx-40 Gens erzeugt werden konnte. Da in der vorliegenden Arbeit die Konzentration der Connexin-40 mRNA lediglich auf ca. 25% sank, herrschten bei den Cx-40KI45 Mäusen und den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren ähnliche Bedingungen bezüglich der interzellulären Kommunikation. Vergleicht man, jeweils unter Normalbedingungen, die Renin mRNA Spiegel von Cx-40KI45 Mäusen (**Abb. 25**) mit den Reninspiegeln der Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäuse (**Abb. 23 A**), zeigen sich jeweils ähnlich Veränderungen, da es in beiden Fällen kaum zu Veränderungen im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp kam. Wurde das RAAS mit LS+E stimuliert, zeigten sich in den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen der vorliegenden Arbeit ähnliche Veränderungen wie in den beschriebenen Cx-40KI45 Tieren. Die Konzentration der Renin mRNA stieg in beiden Genotypen unter Stimulation des RAAS im Vergleich zum jeweils selben Genotyp unter Normalbedingungen um jeweils ca. das 4-fache an (**Abb. 23 A und Abb. 25**). Auch in Wildtypen (**Abb. 23 A**) stieg unter Stimulation die Konzentration der Renin mRNA im Vergleich zu nicht stimulierten Wildtypmäusen in etwa um den selben Faktor an wie dies bei den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen und den Cx-40KI45 Tieren unter Stimulation der Fall war. Folglich konnte man auch unter Stimulation keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen feststellen. Dies zeigt möglicherweise, dass die Anzahl an Reninzellen und damit die messbare Renin mRNA nicht von spezifischen Eigenschaften von Cx-40 abhängt, sondern dass Cx-40 auch durch Cx-45 ersetzt werden kann, ohne dass es zu signifikanten Veränderungen der Renin mRNA kommt. Die Tatsache, dass weder unter normalen Bedingungen, noch unter Stimulation des RAAS ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen, bei denen die Cx-40 Expression unter Normalbedingungen und unter Stimulation des RAAS auf ca. 25 % im Vergleich zum Wildtyp gesunken war (**Abb. 15**), festgestellt werden konnte, deutet darauf hin, dass eine stark reduzierte Cx-40 Expression in der bereits ausdifferenzierten Niere keinen nennenswerten Einfluss auf die quantitative Reninexpression hatte.

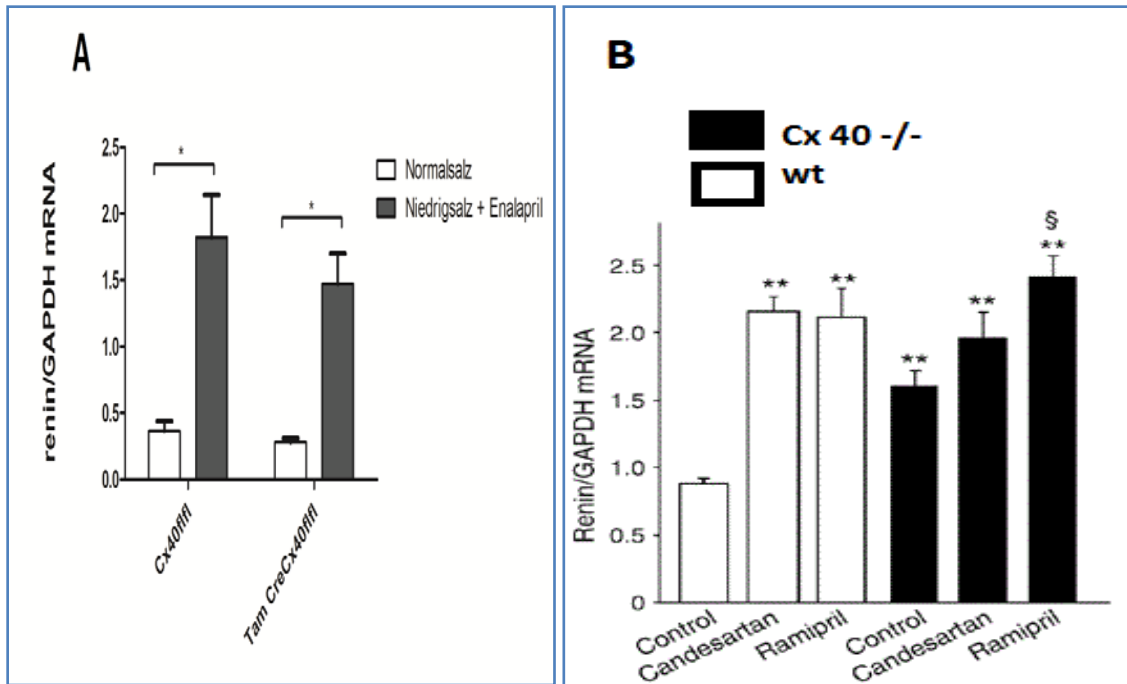


Abb.23: Renin mRNA Daten von Wildtypen und von Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen (A) und von Wildtypen und Mäusen mit totalem Connexin 40-knock out (B), jeweils unter normalen Bedingungen und unter Stimulation des RAAS durch Enalapril, Candesartan oder Ramipril im Vergleich. Auffällig sind, im Vergleich zur totalen Connexin-40 Deletion die erniedrigte mRNA Konzentration unter Normalbedingungen und der geringfügige Anstieg unter Stimulation bei den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen (Abb. rechts: frei modifiziert aus Krattinger N. et al., 2007).

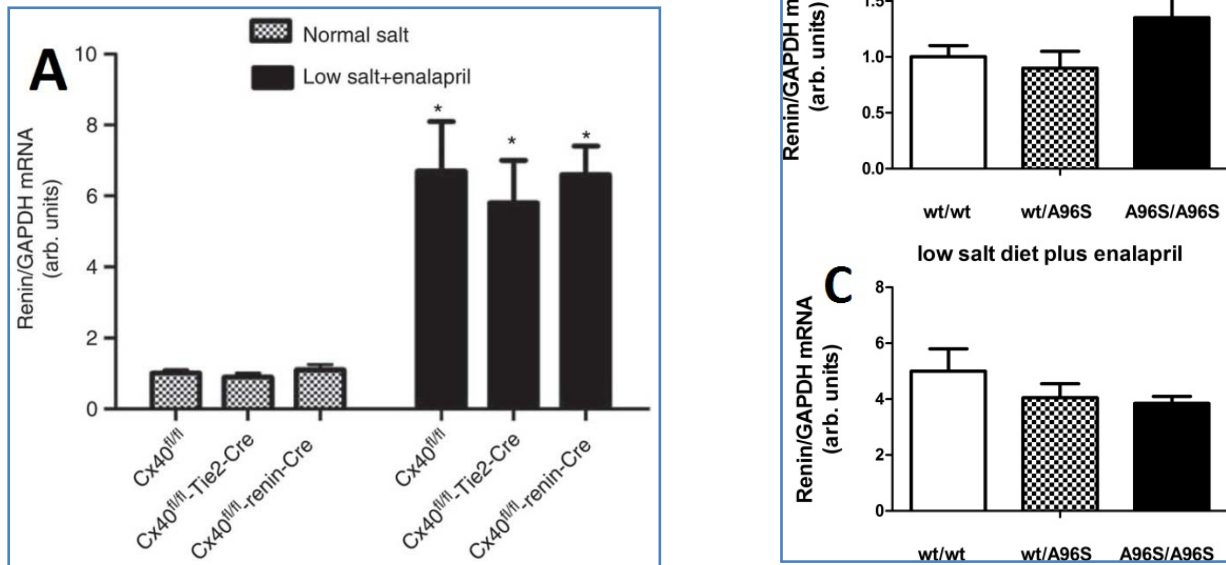


Abb. 24: A: Renin mRNA Daten von Wildtypen (Cx-40<sup>fl/fl</sup>), Mäusen mit einer spezifischen Deletion von Connexin-40 in den Endothelzellen (Cx40<sup>fl/fl</sup>-Tie2-Cre) und von Tieren mit einer spezifischen Connexin-40 Deletion in Reninzelle (Cx40<sup>fl/fl</sup>-Renin-Cre) jeweils unter normalen Bedingungen und unter Stimulation des RAAS im Vergleich. Bemerkenswert ist, dass sich die Konzentrationen in den zellspezifischen knock-out Tieren jeweils ähnlich im Vergleich zum Wildtyp verhalten, wie dies bei einer Connexin-40 Deletion in einer ausdifferenzierten Niere der Fall ist (Abb. 23 A) (Abb. frei modifiziert aus Wagner C. et al., 2010). B und C: Renin mRNA Daten von unstimulierten und stimulierten Wildtypen und von Mäusen die eine A96S Mutation im Cx-40 Gen homo- oder heterozygot aufwiesen. Bemerkenswert ist, dass in der vorliegenden Arbeit das RAAS durch eine low salt Diät und Enalapril in etwa genauso stark stimuliert werden konnte wie in homozygoten A96S Mäusen (Abb. 23 A) (Abbildung B aus: Lübke et al., 2010).

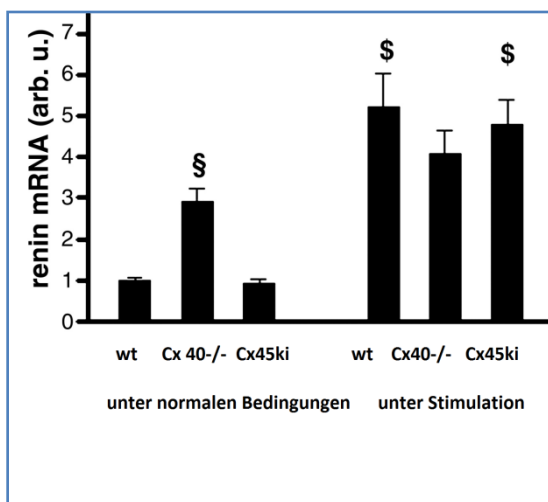


Abb. 25: Konzentration der Renin mRNA in Wildtypen, in Mäusen mit totaler Cx-40 Deletion (Cx-40<sup>-/-</sup>) und in Mäusen bei denen das Cx-40 Gen durch das Cx-45 Gen ersetzt wurde (Cx-45ki), jeweils unter Normalbedingungen und unter Stimulation des RAAS. Auffällig ist, dass sich die Renin mRNA Spiegel bei induziertem Cx-40 KO (Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäuse) (siehe Abb. 23 A) und bei Cx-40KI45 Mutation jeweils ähnlich im Vergleich zu dem jeweiligen Wildtyp verhalten (Abb. frei modifiziert aus Kurtz L. et al., 2009 a).

## 2.2 Vergleich von immunhistologischen Bildern

Liegt eine totale Connexin-40 Deletion bereits während der Nephrogenese vor, ist die Zahl an Reninzellen deutlich höher als in Wildtypen, wobei sich Reninzellen sowohl im juxtaglomerulären Interstitium als auch im extraglomerulären Mesangium und desweiteren zwischen den Tubuli und um die Glomeruli herum finden lassen (Kurtz L. et al., 2007) (**Abb. 26 A**). Die Reninzellen im juxtaglomerulären Bereich sind, anders als im Wildtyp, nicht in die Gefäßwand der afferenten Arteriole integriert, sondern umgeben diese von außen. Die reninpositiven Zellen, die sich außerhalb der juxtaglomerulären Region befinden, zeigen kein epitheloidartiges Aussehen, sondern sehen aus wie mesenchymale Zellen. Unter Stimulation (**Abb. 26 B**) kommt es bei diesem Genotypen nicht zu einer klassischen retrograden Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole, bei der Reninsignale auch in den größeren Gefäßen auftreten, sondern zu einem Anstieg an reninproduzierenden Zellen im periglomerulären Interstitium, womit die periglomeruläre Zellmasse ansteigt (Kurtz L. et al., 2007). Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass die Zell-Zell Kommunikation via Cx-40 essentiell ist für die korrekte Formierung des JGA, dafür, dass die Reninexpression auf die Tunica media der Wand der afferenten Arteriole beschränkt bleibt und für eine retrograde Rekrutierung von Reninzellen unter Stimulation des RAAS. Da jedoch trotz der totalen Cx-40 Deletion reichlich Renin produziert wird, scheinen gap junctions, die aus Cx-40 aufgebaut sind, für die Reninproduktion nicht erforderlich zu sein. Eine mögliche Hypothese wäre, dass korrekt positionierte Perizyten über gap junctions, die aus Cx-40 aufgebaut sind, Signale an ihre Nachbarzellen senden, die dazu führen, dass deren Proliferation und Reninsekretion gestoppt wird. Somit wäre auch ohne Cx-40 eine Reninsekretion möglich, jedoch ist nur unter Anwesenheit von Cx-40 gewährleistet, dass Reninzellen auf ihre typische Position in der Wand des Vas afferens am Übergang in den Glomerulus begrenzt sind.

Auch bei unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren (**Abb. 26 E**) befanden sich die Reninzellen im juxtaglomerulären Bereich außerhalb der Gefäßwand der afferenten Arteriole. Unter Stimulation des RAAS (**Abb. 26 F**) durch low-salt Diät und Enalapril kam es im induzierten knock-out, ähnlich wie beim totalen Cx-40 KO, zu einem Anstieg der periglomerulären Zellmasse und zur Bildung von Reninnestern, da die Reninzellen, welche sich im Bereich des JGA befanden, außerhalb der Tunica media der afferenten Arteriole lokalisiert waren. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich in Bezug auf die Position der Reninzellen einige Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Genotypen finden lassen. Folglich scheint auch ein ubiquitär-konditionaler Cx-40 knock-out in einer bereits vollständig ausdifferenzierten Niere eine wichtige Rolle für die korrekte Positionierung der Reninzellen zu spielen. Denkbar wäre, dass auch nach der vollständigen Entwicklung der Niere inhibierende Signale von Perizyten auf ihre Nachbarzellen übertragen werden, die verhindern, dass

ektop lokalisierte Reninzellen auftreten. Weitere Erkenntnisse könnte man durch eine selektive und durch Tamoxifen herbeigeführte Cx-40 Deletion in Mesangialzellen erlangen.

In unstimulierten Cx-40KI45 Mäusen (**Abb. 26 C**) befinden sich die Reninzellen in juxtaglomerulärer Position, wobei sich die Zellen in einigen Arteriolen in der Media befinden, wohingegen sie sich in anderen Arteriolen außerhalb dieser liegen, jedoch weisen sie immer noch Kontakt zu dieser auf. Folglich führt ein Ersatz von Cx-40 durch Cx-45 dazu, dass sich Reninzellen nicht mehr nur ausschließlich innerhalb der Tunica media befinden, sondern auch außerhalb. Unter Stimulation des RAAS (**Abb. 26D**) durch Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe kommt es zu einer starken Ausbreitung der Reninzellen, jedoch kann in den Cx-40KI45 Nieren keine klare retrograde Rekrutierung, wie dies in stimulierten Wildtypen der Fall ist, beobachtet werden. Stattdessen findet eine Reninproduktion in Zellen statt, die ähnlich aussehen wie Fibroblasten und sich im Interstitium befinden oder mit Gefäßen assoziiert sind. Anstatt einer klassischen Rekrutierung treten große Reninnester auf, ähnlich wie dies bei einer totalen Cx-40 Deletion der Fall ist. Folglich ist denkbar, dass Cx-45 die Funktion von Cx-40 in Bezug auf ein korrektes "homing" der Reninzellen innerhalb der Tunica media nicht vollständig übernehmen kann. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die Ausbreitung von inhibierenden Signalen, die die Reninexpression außerhalb der Tunica media der afferenten Arteriole normalerweise unterdrücken, via Cx-45, im Vergleich zu gap junctions, die aus Cx-40 aufgebaut sind, nur vermindert möglich ist. Folglich zeigte sich bei Cx-40KI45 Tieren ein sehr ähnliches Bild wie bei Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen, da man auch bei einer induzierten Cx-40 Deletion unter basalen Bedingungen (**Abb. 26E**) ektop lokalisierte Reninzellen und unter Stimulation des RAAS prominente Reninnester (**Abb. 26 F**) finden konnte. Somit scheint ein Ersatz der kodierenden Sequenz des Cx-40 Gens durch Cx-45 einen ähnlichen Effekt auf die genaue Lokalisation der Reninzellen zu haben, wie eine induzierte Cx-40 Deletion.

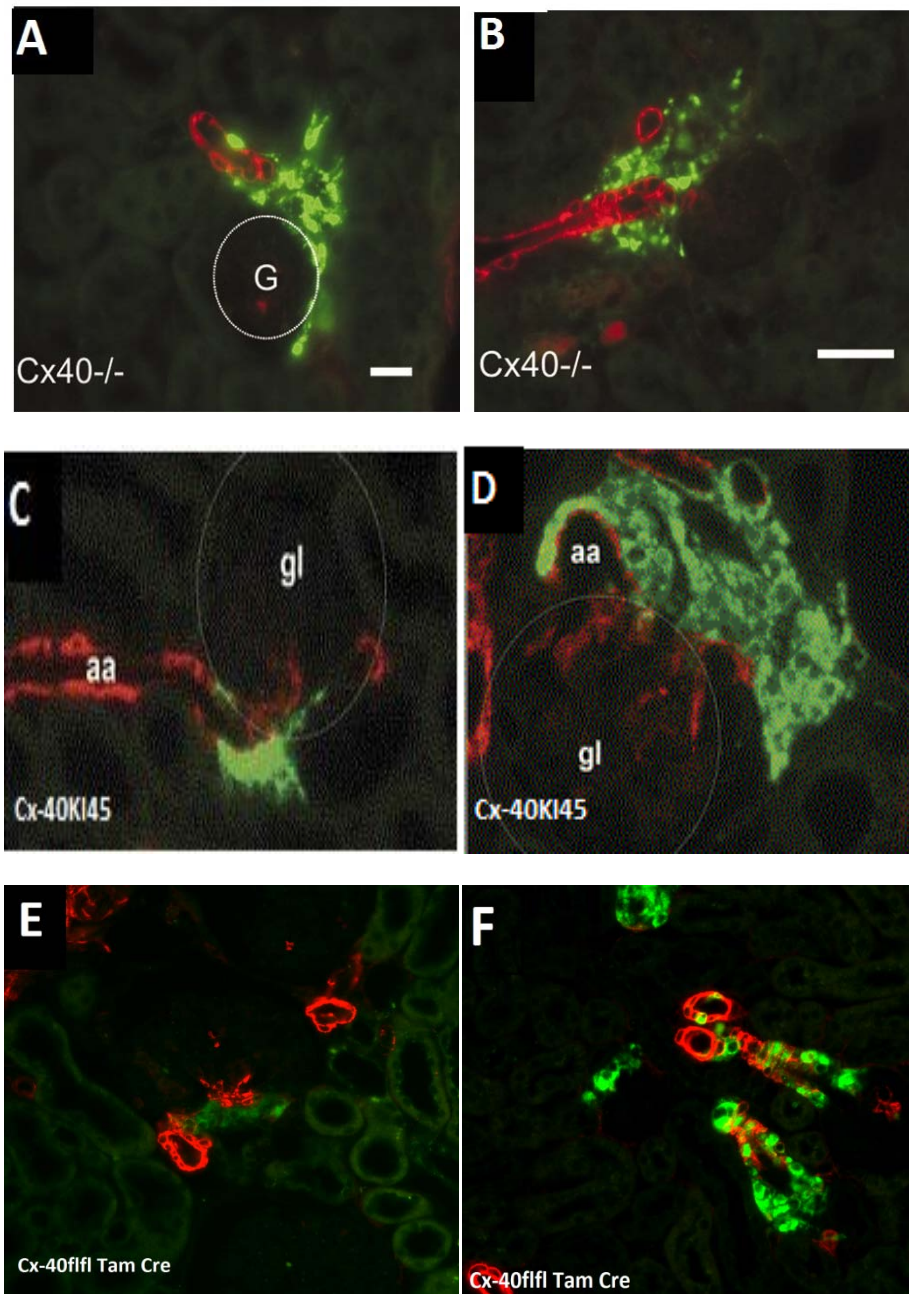


Abb. 26: Immunfluoreszenzaufnahmen von genetisch unterschiedlich veränderten Mäusen im Vergleich. Mäuse mit einem totalen Connexin-40 knock-out während der Nephrogenese ohne (A) und mit Stimulation (B) des RAAS. Unstimulierte (C) und stimulierte Cx-40KI45 Tiere (D), sowie unstimulierte (E) und stimulierte Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäuse (F). Die grünen Signale entsprechen jeweils den Reninzellen, die roten Signale dem Glattmuskelaktin der Gefäßwand (Abbildungen A und B frei modifiziert aus Kurtz L. et al., 2007. Abbildungen C und D frei modifiziert aus Kurtz L. et al., 2009a)

Die Reninzellen in Cx-40<sup>fl/fl</sup>-Tie2-Cre Mäusen weisen eine normale Form auf, ihre Anzahl ist, im Vergleich zum Wildtyp, nicht erhöht und sie nehmen eine typische juxtaglomeruläre Position ein, wobei sie integraler Bestandteil der Tunica media der afferenten Arteriole sind (Wagner C. et al., 2010). Unter Stimulation des RAAS kommt es in diesen Mäusen zu einer typischen retrograden Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole, wobei die Reninzellen auch hier Bestandteil der Tunica

media sind (Wagner C. et al., 2010). Somit ergeben sich im Vergleich zu Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren deutliche Unterschiede, da sich bei einem induzierten Cx-40 KO ekto lokalisierte Reninzellen und Reninester finden lassen (**Abb. 26 E und F**). Die Beobachtung, dass sich aus immunhistologischer Sicht keine sichtbaren Unterschiede zwischen Wildtypen und Mäusen mit endothelspezifischer Cx-40 Deletion ergeben, könnte ein Beleg dafür sein, dass die endotheliale Cx-40 Expression möglicherweise keine wesentliche Rolle für die Positionierung und die Menge an Reninzellen zu haben scheint. Dies könnte daran liegen, dass die inhibierenden Signale, die über die endothelialen gap junction verbreitet werden, nicht wesentlich für das "homing" der Reninzellen sind.

Die Reninverteilung bei Cx-40<sup>fl/fl</sup> Renin-Cre Nieren zeigt unter Normalbedingungen, im Vergleich zum Wildtyp, keine Veränderungen in Bezug auf die Anzahl der Reninzellen, jedoch ist deren Lokalisation eine andere. Die Reninzellen befinden sich außerhalb der Tunica media der afferenten Arteriole im Interstitium und zeigen ein eher fibroblastenähnliches Aussehen (Wagner C. et al., 2010). Unter Stimulation des RAAS steigt die Zahl an Reninzellen im Interstitium an (**Abb 33 f**) (Wagner C. et al., 2010), wodurch sich unter basalen Bedingungen und unter Stimulation einige Parallelen zu Mäusen mit induziertem Cx-40 KO ergeben. Dies lässt daran denken, dass die Kommunikation über reninzellspezifische gap junctions und die Verbreitung von hemmenden Signalen, die über diese möglicherweise stattfindet, von großer Bedeutung für die Positionierung der Reninzellen sein könnte. Somit würden sich der reninzellspezifische Cx-40 knock-out in Bezug auf deren Relevanz für die korrekte Formierung des JGA deutlich vom endothelzellspezifischen knock-out unterscheiden.

In Nieren mit einer homozygoten A96S Mutation im Connexin-40 Gen unterscheidet sich die Anzahl an Reninzellen nicht vom Wildtyp, aber auch hier sind die Reninzellen sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Stimulation ekto lokalisiert und nicht Bestandteil der Tunica media der afferenten Arteriole. Unter Stimulation kommt es nicht zu einer retrograden Rekrutierung, sondern zur Vermehrung von Reninzellen im Bereich des Interstitiums (Lübke et al., 2011). Folglich weisen Mäuse mit einer homozygoten A96S Mutation ähnliche phänotypische Veränderungen auf, wie Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre Mäuse. Dies lässt möglicherweise daran denken, dass auch durch diese Mutation die Ausbreitung von Signalen, die die Reninproduktion außerhalb des JGA hemmen, eingeschränkt ist.

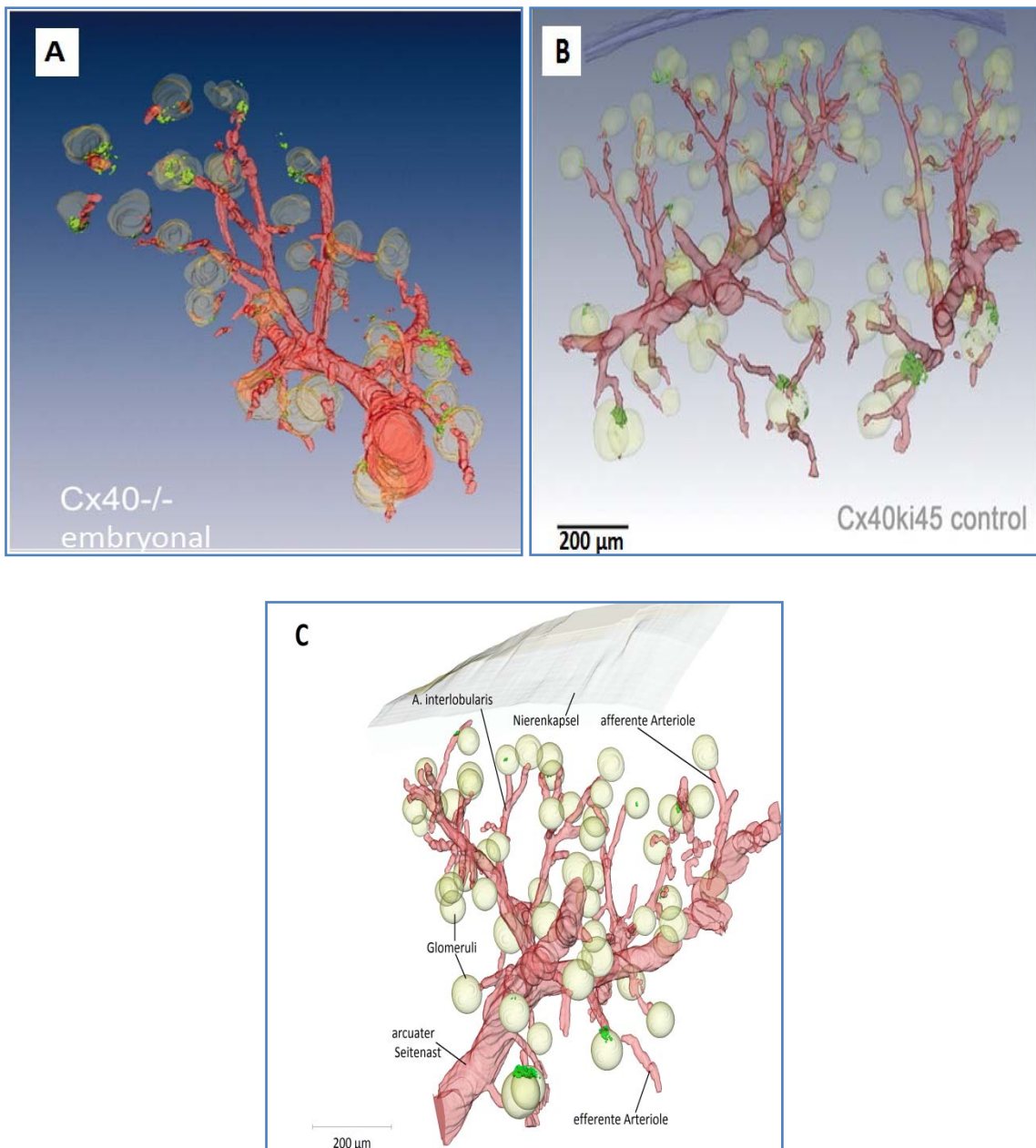
### **2.3 Das Reninexpressionsmuster im Vergleich**

Die 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumes bei einem totalen Cx-40 knock out, bei dem dieser Connexintyp während der Nephrogenese fehlt, (**Abb. 27A**) zeigt ausnahmslos reninpositive Glomeruli.

In der vorliegenden Arbeit wurden Tiere mit einem konditionalen Cx-40 knock-out untersucht, sodass in diesem Fall Schäden an der Niere, die auftreten, wenn Cx-40 bereits in der Keimbahn und somit auch in der Nephrogenese fehlt, ausgeschlossen werden können.

Im Unterschied zur Rekonstruktion bei totalen Cx-40 KO finden sich bei der Rekonstruktion einer Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Niere (**Abb. 27 C**) zahlreiche Glomeruli, an denen keine Reninproduktion stattfindet. Ähnlich wie bei einem totalen Cx-40 knock-out, treten auch bei der Rekonstruktion einer Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Niere Reninnester auf, die sich außerhalb der Gefäßwand befinden. Die Ursache dafür ist möglicherweise, wie bereits oben beschrieben, dass durch das Fehlen von Cx-40 keine inhibierenden Signale bzgl. der Reninexpression von korrekt positionierten Perizyten auf ihre Nachbarzellen übertragen werden. Somit wird die Reninexpression außerhalb der Tunica media der afferenten Arteriole nicht unterbunden, was zur Bildung der Reninnester führt.

Vergleicht man die 3D-Rekonstruktion einer Cx-40KI45 Maus (**Abb. 27 B**) mit der Rekonstruktion eines Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre Tieres (**Abb. 27 C**) sind einige Gemeinsamkeiten bzgl. der Reninverteilung entlang des Gefäßbaums ersichtlich. Unter Normalbedingungen zeigen sich in der Cx-40KI45 Rekonstruktion mehr reninpositive Glomeruli als in einer Rekonstruktion einer gleichbehandelten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Niere, sodass die Cx-40KI45 Rekonstruktion mehr Ähnlichkeiten zu einem unbehandelten Wildtyp aufweist, als die Rekonstruktion einer Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Niere. Jedoch findet man in beiden Rekonstruktionen, im Unterschied zu einem unbehandelten Wildtyp, nicht nur reninpositive Glomeruli. Des Weiteren zeigt sich, dass in beiden Rekonstruktionen die Reninbildung vor dem Übergang in die Glomeruli, sofern eine Reninbildung stattfindet, deutlich stärker ausgeprägt ist, als in einem unbehandelten Wildtypen. In Bezug auf Cx-40KI45 Tiere weist dies möglicherweise darauf hin, dass die Ausbreitung von Signalen, die die Reninsekretion hemmen, via Cx-45 nur in geringerem Ausmaß möglich ist, als in Wildtypen, bei denen die gap junctions aus Cx-40 aufgebaut sind.



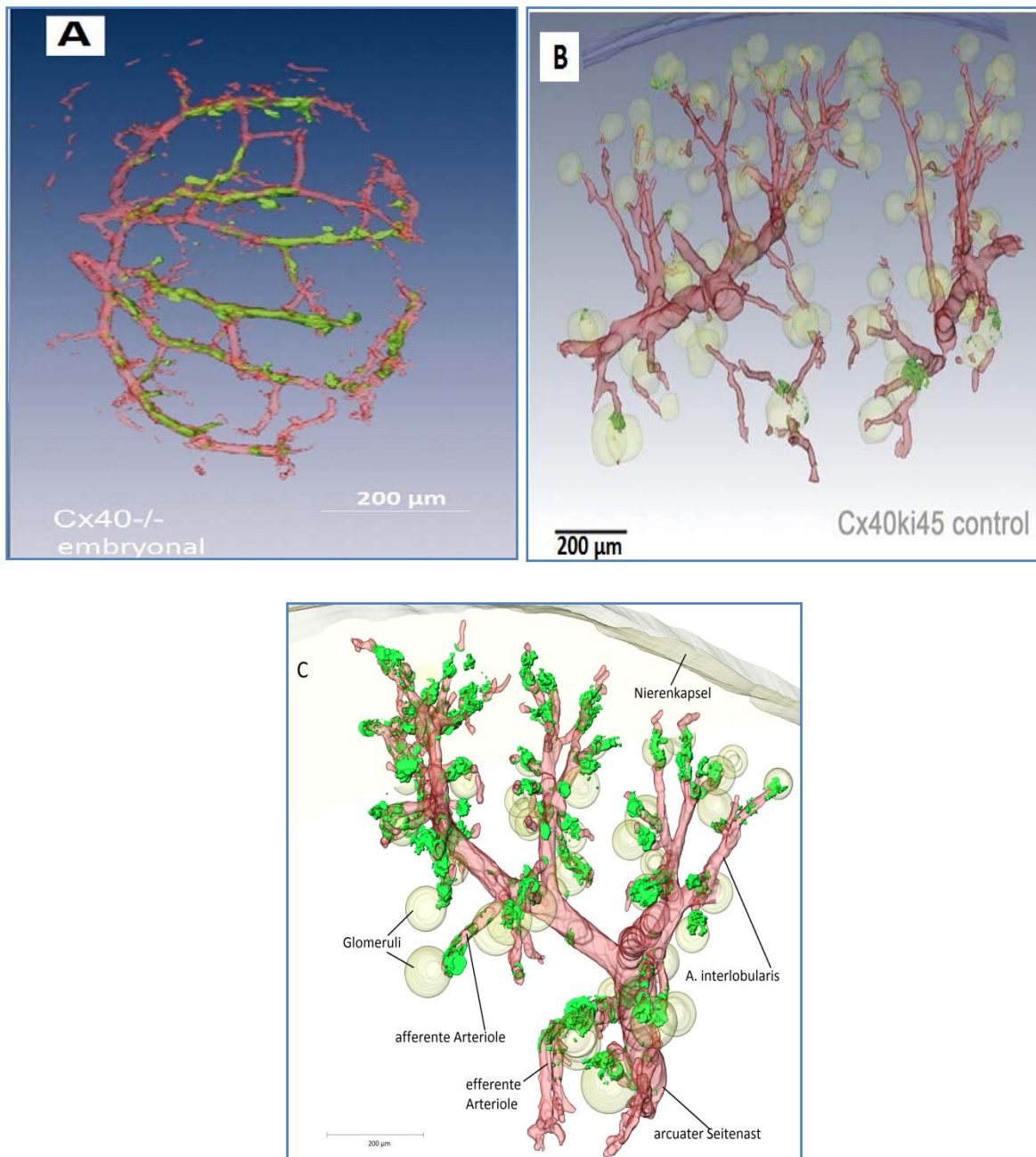
**Abbildung 27:** Vergleich von 3D-Rekonstruktionen von genetisch unterschiedlich veränderten Mäusen (jeweils unter Normalbedingungen). Bei einem totalen Cx-40 knock-out während der Nephrogenese (A) findet man ausschließlich reninpositive Glomeruli. Bei der Cx-40KI45 Rekonstruktion (B) und bei der Cx-40 Tam Cre-Rekonstruktion (C) finden sich ausgeprägte Reninnester und renin-negative Glomeruli, wobei die Anzahl an reninpositiven Glomeruli in Cx-40KI45 Tieren höher ist (Abbildung A frei modifiziert aus Kurtz L. et al., 2007. Abbildung B frei modifiziert aus Kurtz L et al., 2009 a).

Unter Stimulation zeigt sich bei totaler Connexin-40 Deletion bei 30 % aller Glomeruli eine deutliche Zunahme an Reninzellen im periglomerulären Bereich, ohne dass diese in die Gefäßwand integriert sind (**Abb. 28 A**) (Kurtz L. et al., 2007). Betrachtet man dazu im Vergleich die Rekonstruktion einer stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Niere (**Abb 28C**), fällt auf, dass es auch in diesem Fall zu einer Zunahme der Reninzellen kommt, die im Interstitium lokalisiert sind. Die Rekrutierung der Reninzellen entlang der größeren Gefäße ist jedoch eher schwächer ausgeprägt als bei einer totalen Cx-40 Deletion,

wohingegen die Reninnester am Übergang in die Glomeruli tendentiell eher deutlicher ausgeprägt sind. Beide Rekonstruktionen könnten ein Hinweis darauf sein, dass sowohl ein ubiquitär-konditionaler Cx-40 knock-out als auch ein totaler Cx-40 KO die Ausbreitung von inhibierenden Signalen in Bezug auf die Reninexpression beeinträchtigen könnten, da die dafür nötigen gap junctions nicht gebildet werden können. Dies könnte letztlich zur Dislokation der Reninzellen und zur Bildung von Reninnestern.

Auch beim Vergleich von stimulierten Mäusen lassen sich zwischen der Cx-40KI45 Rekonstruktion (**Abb. 28 B**) und einer Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Rekonstruktion (**Abb. 28 C**) Gemeinsamkeiten erkennen. In beiden Fällen kommt es zur deutlichen Ausprägung von Reninnestern, die Reninzellen sind zum Teil ektop lokalisiert und bei beiden Rekonstruktionen finden sich ausschließlich reninpositive Glomeruli. Ein Unterschied ist jedoch, dass in der Cx-40KI45 Rekonstruktion keine Reninbildung in den Interlobulararterien zu beobachten ist.

Aufgrund der oben beschriebenen Ähnlichkeiten zwischen den Cx-40KI45 Tieren und den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren bzgl. der mRNA Daten, der immunhistologischen Aufnahmen und der 3D-Rekonstruktionen kann man zu dem Schluss kommen, dass durch die inkomplette Deletion von Connexin-40 in der vorliegenden Arbeit, ein System entstanden ist, das dem Cx-40KI45 Modell in manchen Punkten sehr ähnlich ist.



**Abbildung 28:** Vergleich einer 3D-Rekonstruktion von einer Maus mit totalem Connexin-40 knock-out während der Nierenentwicklung (A) mit einer  $Cx40^{ki45}$  Mutation und mit einer durch Tamoxifen induzierten  $Cx40$  Deletion (jeweils unter Stimulation). Alle Rekonstruktionen zeigen eine Zunahme an ektopen Reninzellen und ausschließlich reninpositive Glomeruli (Abbildung A frei modifiziert aus Kurtz L. et al., 2007. Abbildung B frei modifiziert aus Kurtz L et al., 2009 a).

Bei Betrachtung der 3D-Rekonstruktionen der anderen Arbeiten stellt man fest, dass sich die Verteilung in  $Cx40^{fl/fl}$ -Tie2-Cre nicht von unbehandelten Wildtypen unterscheiden lässt, da die Reninzellen in der afferenten Arteriole in typischer juxtaglomerulärer Position lokalisiert sind und auch in ihrer Anzahl keinen Unterschied zum Wildtyp aufweisen. Unter Stimulation kommt es bei diesem Genotyp zu der typischen retrograden Rekrutierung, sodass auch hier kein Unterschied zum Wildtyp auffällig ist. Im Vergleich dazu zeigen die 3D-Rekonstruktionen von  $Cx40^{fl/fl}$  Tam Cre-Tieren

deutlich ausgeprägte Reninnester, wobei die Reninzellen zum Teil auch außerhalb der afferenten Arteriole liegen und nicht alle Glomeruli reninpositiv sind. Unter Stimulation zeigen sich in Cx-40 Tam Cre-Tieren deutlich stärker ausgeprägte Reninnester als in Cx40<sup>fl/fl</sup>-Tie2-Cre Mäusen, wobei zum Teil auch eine Reninproduktion in den Interlobulararterien stattfindet.

Liegt eine spezifische Deletion von Connexin-40 in Reninzellen vor (Cx40<sup>fl/fl</sup>-Renin-Cre), ist die Anzahl an Reninzellen unter Normalbedingungen und unter Stimulation des RAAS vergleichbar mit Wildtypen, jedoch sind die Zellen im Interstitium lokalisiert. Diese ektope Lokalisation nimmt unter Stimulation noch weiter zu.

Bezugnehmend auf Mäuse mit einem endothelzellspezifischen und reninzellspezifischen Cx-40 knock-out kann man sagen, dass die 3D-Rekonstruktionen der jeweiligen Genotypen die Beobachtungen, die man anhand von immunhistologischen Bildern machen kann, scheinbar bestätigen. Auch aus den 3D-Rekonstruktionen kann man folgern, dass die endotheliale Cx-40 Expression für das korrekte "homing" der Reninzellen und für deren Menge nur eine untergeordnete Rolle zu haben scheint. Im Gegensatz dazu scheint die Kommunikation via Cx-40 gap junctions eine wichtige Rolle bzgl. der korrekten Positionierung der Reninzellen zu haben.

Bei der Betrachtung von homozygoten A96S Tieren fällt die ektope Lokalisation der Reninzellen im Interstitium auf, wobei die Zahl dieser atypisch lokalisierten Zellen unter Stimulation ansteigt. Bei heterozygoten Tieren fällt auf, dass sich unter Normalbedingungen und unter Stimulation keine Unterschiede im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp zeigen. Somit scheint die 3D-Rekonstruktion das Ergebnis der immunhistologischen Aufnahmen zu bestätigen und es wäre denkbar, dass durch diese Mutation die Ausbreitung von hemmenden Signalen bzgl. der Reninexpression eingeschränkt wird.

### **3. Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hat einige Erkenntnisse darüber erbracht, welche Folgen mit einer inkompletten Deletion von Connexin-40 einhergehen, wobei diese Deletion durch Tamoxifen induziert wurde und erst im adulten Zustand auftrat. Da es im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gelungen ist, eine komplette Deletion des Proteins herbeizuführen, werden in Zukunft weitere Experimente notwendig sein, um eine komplette Deletion zu bewirken, da es von großem Interesse sein wird, solche Mäuse zu untersuchen. In diesem Zusammenhang müssen dann auch noch weitere funktionelle Daten, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit nicht erhoben wurden, gewonnen werden. Von besonderem Interesse ist dabei die druckabhängige Reninsekretion, um festzustellen, ob und wenn ja, in welcher Weise bei einer Connexin-40 Deletion in der ausdifferenzierten Niere der Barorezeptormechanismus verändert ist.

## Literaturverzeichnis

- Ackermann H.** ALLEX - alles fürs Examen : das Kompendium für die 2. ÄP. Band A: Innere Medizin, 2012, Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, S.354-355
- Ackermann H.** ALLEX - alles fürs Examen : das Kompendium für die 2. ÄP. Band B: Klinische Fächer, 2012, Thieme Verlag, Stuttgart, 1, Auflage, S. 354-358
- Ardailou R.** (1999): Angiotensin II receptors. J Am Soc Nephrol. 10 Suppl. 11:S 30-39
- Arensbak B, Mikkelsen HB, Gustafsson F, Christensen F, and Holstein-Rathlou NH.** Expression of connexin 37, 40 and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. Histochem Cell Biol 115:479-487, 2001
- Barajas L, Liu L, and Tucker M.** Localization of connexin 43 in rat kidney. Kidney Int 46:621-626, 1994
- Bosco D, Haefliger J-A, and Meda P.** CONNEXINS: KEY MEDIATORS OF ENDOCRINE FUNCTION. Physiol Rev. 91: 1393-1445, 2011
- Brown E.** Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2013 Jun;27(3):333-43.
- Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C.** Physiology of kidney renin. Physiol Rev. 90: 607-73, 2010
- de Wit C, Roos F, Bolz SS, Pohl U.** Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. Physiol Genomics. 2003 Apr 16;13(2):169-177.
- Figuroa XF, and Duling BR.** Dissection of two Cx37-independent conducted vasodilator mechanisms by deletion of Cx40: electronic versus regenerative conduction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 295: H2001-2007, 2008.
- Firouzi M, Kok B, Spiering W, Busjahn A, Bezzina C.R, Ruijter J.M, Koeleman B.P, Schipper M, Groenewegen W.A, Jongasma H.J, de Leeuw P.W.** Polymorphisms in human connexin 40 gene promoter are associated with increased risk of hypertension in men, J. Hypertens. 24 (2006) 325- 330

**Gollob M.H, Jones D.L, Krahn A.D, Danis L, Gong X. Q,Shao Q, Liu X, Veinot J.P, Tang A.S, Stewart A.F, Tesson F, Klein J.G, Yee R, Skanes A.C, Guiraudon G.M, Ebihara L and Bai D.** Somatic Mutations in the Connexin 40 Gene (*GJA5*) in Atrial Fibrillation, *N. Engl. J. Med.* 354 ( 2006 ) 2677- 2688

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

**Grünberger C, Obemayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F.** The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res.* 2006 Nov 24; 99(11):1197-1206.

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

**Haefliger JA, Demotz S, Braissant O, Suter E, Waeber B, Nicod P, and Meda P.** Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension. *Kidney Int* 60:190-201, 2001

**Haefliger JA, Krattinger N, Martin D, Pedrazzini T, Capponi A, Doring B, Plum A, Charollais A, Willecke K and Meda P.** Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension. *J Clin Invest* 116:405-413, 2006

**Hösl E.** Konditionelle Gendelektion im Reizleitungssystem der Maus, 2008, S. 1-105

**Hoess RH, Abremski K.** Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP, *Biochemistry Proc. Natl.Acad.Sci.USA.* Vol. 81, pp. 1026-1029, February 1984

**Hoess RH, Abremski K.** Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of Molecular Biology* Volume 181, Issue 3, 5 February 1985, Pages 351-362

**Krämer B, Ritthaler T, Ackermann M, Holmer S, Schricker K, Riegger G and Kurtz A.** Endothelium-mediated regulation of renin secretion, *Kidney International*, Vol.46 (1996), pp. 1577-1579

**Krattinger N, Capponi A, Mazzolai L, Aubert J-F, Caille D, Nicod P, Waeber G, Meda P and Haefliger J-A.** Connexin 40 regulates renin production and blood pressure, *Kidney international* (2007) 72, 814-822

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

**Kurtz A, Wagner C.** REVIEW CELLULAR CONTROL OF RENIN SECRETION, *The Journal of Experimental Biology* 202, 219–225 (1999)

**Kurtz A, Wagner C.** Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 275:F849-F862, 1998

**Kurtz L, Gerl M, Kriz W, Wagner C and Armin Kurtz.** Replacement of connexin 40 by connexin 45 causes ectopic localization of renin-producing cells in the kidney but maintains in vivo control of renin gene expression, *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F403-F409, 2009 a

**Kurtz L, Madsen B, Kurz B, Jensen B.L, Walter S, Banas B, Wagner C, Kurtz A.** High-level connexin expression in the human juxtaglomerular apparatus, *Nephron Physiol.* 116 (2010) 1-8

**Kurtz L, Janssen- Bienhold, Kurtz A, Wagner C.** Connexin Expression in Renin- Producing Cells, *J Am Soc Nephrol.* 2009 b March; 20(3): 506-512

**Kurtz L, Schweda F, de Wit C, Kriz W, Witzgall R, Warth R, Sauter A, Kurtz A and Wagner C.** Lack of Connexin 40 Causes Displacement of Renin-Producing Cells from Afferent Arterioles to the Extraglomerular Mesangium, *J Am Soc Nephrol.* 2007 Apr;18(4):1103-11. Epub 2007 Feb 28.

**Lothar Achim.** Der Einfluss des Mineralokortikoidrezeptors in Kardiomyozyten auf kardiale Hypertrophie und Funktion, 2011, S. 1-117

**Lübkemeier I, Machura K, Kurtz L, Neubauer B, Dobrowolski R, Schweda F, Wagner C, Willecke K, Kurtz A.** The connexin 40 A96S mutation causes renin-dependent hypertension, *J. Am. Soc. Nephrol.* 22 (2011) 1031- 1040

**Lukowski R, Weber S, Weinmeister P, Feil S, und Feil R.** Cre/loxP- vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP- Signalwegs in der Maus, *BIOspektrum* 3/05, 11. Jahrgang, S. 287- 290

**Marchant C, Brown L, Sernia C.** Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 22:449-455, 1993

**Mercure C, Ramla D, Garcia R, Thibault G, Deschepper CF, Reudelhuber TL.** Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerula cells. *FEBS Lett.* 1998 Feb 6;422(3):395-399

**Metzger D, Feil R.** Engineering the mouse genome by site-specific recombination, *Current Opinion in Biotechnology* Volume 10, Issue 5, 1 October 1999, Pages 470–476

**Milbradt A.** Konditionelle Gendelektion des Ryanodinrezeptors RyR2 im Herzen der Maus, 2011, S. 1-99

**Neubauer B, Machura K, Kettl R, Lopez ML, Friebe A, Kurtz A.** Endothelium-derived nitric oxide supports renin cell recruitment through the nitric oxide-sensitive guanylate cyclase pathway. *Hypertension.* 2013 Feb;61(2):400-407.

**Persson PB.** Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol.* 2003 Nov 1; 555(Pt 3):667-71. *Cell Tissue Res.* 1998 Jun;292(3):563-71

**Peters J, Clausmeyer S.** Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Dec; 34(12):1561-1568

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

**Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R.:** *Duale Reihe Biochemie*, 2008, Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, S. 360-62

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

**Scholz H, Hamann M, Götz KH, Kurtz A.** Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflugers Arch.* 1994 Sep;428(2):173-178.

**Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O and Kurtz A.** Renin Release, *Physiology* October 2007 22:310–319

**Schweda F, Kurtz L, de Wit C, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, and Charlotte Wagner.** Substitution of connexin 40 with connexin 45 prevents hyperreninemia and attenuates hypertension, *Kidney Int.* 2009 Mar;75(5):482-489.

**Silverthorn D.:** *Physiologie*, 2009, Pearson Studium, München, 4., aktualisierte Auflage, S. 105

**Sipos A, Vargas SL, Toma I, Hanner F, Willecke K, and Peti-Peterdi J.** Connexin 30 deficiency impairs renal tubular ATP release and pressure natriuresis. *J Am Soc Nephrol* 20:1724-1732, 2009

**Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH.** Cell-cell communication in the kidney microcirculation. *Microcirculation.* 2012 Jul;19(5):451-60.

**Sohl G, Willecke K.** Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res* 62:228-232, 2004

**Takenaka T, Inoue T, Kanno Y, Okada H, Meaney KR, Hill CE, Suzuki H.** Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. *Kidney Int* 73:415-422, 2008.

**Thomas C, Gustafsson J.** A CUE hints at tumor resistance. *Nature Medicine* 17, 658-660 (2011)

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

**Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grunberger C, Kurtz A, and Schweda F.** Connexin 40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* 100:556-563, 2007

**Wagner C, Jobs A, Schweda F, Kurtz L, Kurt B, Lopez M, Gomez A, van Veen T, de Wit C, Kurtz A.** Selective deletion of Connexin 40 in renin-producing cells impairs renal baroreceptor function and is associated with arterial hypertension, *Kidney international* (2010) 78, 762-768

**Wagner C, Kurtz A.** CELL TO CELL COMMUNICATION IN RENIN PRODUCING CELLS, 2012, S.1-18

**Wagner C, Kurtz A.** Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 437-441, 1998  
a

**Wagner C, Kurtz L, Schweda F, Simon AM, Kurtz A.** Connexin 37 is dispensable for the control of the renin system and for positioning of renin-producing cells in the kidney. *Pflugers Arch* 459: 151-158, 2009

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

# Anhang

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildungs- nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Seitenzahl im Text</b>
<b>Abb. 1</b>	Schematische Darstellung des RAAS-Systems der Niere.	<b>12</b>
<b>Abb. 2</b>	Schematische Darstellung der Bestandteile des juxtaglomerulären Apparats .	<b>13</b>
<b>Abb. 3</b>	Intrazelluläre Wirkungsweisen von den sekundären Botenstoffen in reninbildenden Zellen.	<b>16</b>
<b>Abb. 4</b>	Möglichkeiten der direkten Kommunikation zwischen Zellen. Neben der direkten Verbindung zwischen Liganden und Rezeptoren (A) können sich Zellen durch verschiedene Adhäsionsmoleküle miteinander verbinden, u.a. durch Connexine (B).	<b>17</b>
<b>Abb. 5</b>	Schematischer Aufbau eines Connexins mit vier membrandurchspannenden Elementen, drei Schleifen und dem aminoterminalen- und dem carboxyterminalen- Ende jeweils im Zytosol (links). Sechs Connexine oligomerisieren während des Transports zur Zellmembran zu einem Hemi-channel (mitte).Lagern sich zwei Hemi-channels vonbenachbarten Zellen	<b>20</b>

zusammen entstehen gap-junctions (rechts).

**Abb. 6** Funktionelle Bedeutung von gap junctions und **20**

Hemi-channels: Gap junctions erlauben den Übertritt vieler verschiedener Moleküle bis zu einer Größe von 0,9 kDa von einer Zelle in eine benachbarte Zelle (oben). Der Austausch von Makromolekülen (> 1.2k Da), wie von Proteinen, ist nicht möglich (mitte). Hemi-channels ermöglichen die Freisetzung zytosolischer Moleküle und Ionen in die EZM (unten).

**Abb. 7** Die Reninsekretion in Abhängigkeit von der **25**

Nierendurchblutung. In Wildtypen (schwarz) liegt eine inverse Beziehung vor. Bei einem Cx-40 knock-out Tier entwickelt sich eine positive lineare Beziehung. Selbiges gilt bei einer Erniedrigung der Calciumkonzentration in der EZM bei Wildtypen (grün).

**Abb. 8** Typische juxtaglomeruläre Position von **26**

Reninzellen im Bereich des terminalen Abschnitts der afferenten Arteriole in einer unstimulierten adulten Wildtypmaus. In der Abbildung sind die Reninzellen grün, das Glattmuskelaktin der afferenten Arteriole rot und Cx-40 weiß dargestellt.

**Abb. 9** Herstellung einer gewebespezifischen **31**

Gendeletion (A): Eine gefloخته Zielmaus (links, Dreiecke stellen loxP-Sequenzen dar und blaue Vierecke ein Exon) wird mit einer gewebespezifischen Cre-Maus verkreuzt (rechts). Die Excision des Exons findet nur in

den Zellen statt, in denen der Promotor aktiv ist (graue Ellipse).

Eine zeitliche Kontrolle der Gendeletion (B) kann durch die Verwendung von Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinasen erfolgen, die zunächst inaktiv sind (rot) und erst nach Gabe eines nicht-endogenen Liganden (z.B. Tamoxifen) aktiviert werden.

**Abb. 10** Wirkung von Tamoxifen auf zellulärer Ebene **34**

Tam: Tamoxifen; ER- $\alpha$ : Östrogenrezeptor  $\alpha$   
GFS: Growth factor signaling

**Abb. 11** Metabolisierung von Tamoxifen durch die Cytochrom-P450-Enzyme in der Leber. **35**

**Abb. 12** Prinzip von immunhistochemischen Färbungen **55**

Der primäre Antikörper bindet an das zu detektierende Antigen im Gewebe. Im nächsten Schritt wird der sekundäre Antikörper hinzugegeben, welcher sich spezifisch gegen die Antigensequenzen der Wirtsspezies, aus der der 1. Antikörper stammt, richtet. Dieser zweite Antikörper ist mit einem signalemittierenden Fluorophor gekoppelt.

**Abb. 13** Schema zur Methode der 3D-Rekonstruktion. **57**

**Abb. 14** **Abb. 16:** Immunhistologische Färbung von Aktin **65**

(rot), Renin (grün) und von Connexin-40 (weiß) im unstimulierten Wildtypen (links) und in einer unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus (rechts). Auffällig sind die deutlich verminderten Connexinsignale (weiß) im Bereich des

Glomerulus und der afferenten Arteriole, was auf eine fast vollständige Deletion des Connexin-40 Gens hinweist.

**Abb. 15** Cx-40 mRNA Abundanz in Wildtypen (Cx-40<sup>fl/fl</sup>) und in Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam-Cre Mäusen, jeweils unter basalen Bedingungen (weiße Balken) und unter Stimulation des RAAS durch low-salt Diät und den ACE-Hemmer Enalapril (graue Balken). Unter beiden Bedingungen zeigt sich nach Tamoxifen-induzierter Gendeletion ein Rückgang der Cx-40 mRNA auf ca. 25 % im Vergleich zum Wildtyp. **66**

**Abb. 16** Renin mRNA Abundanz in Wildtypen (Cx-40<sup>fl/fl</sup>) und im induzierten Cx-40 KO Tieren (Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre), jeweils unzer Normalbedingungen (weiße Balken) und unter Stimulation des RAAS durch low-salt Diät und den ACE-Hemmer Enalapril (graue Balken). Weder unter basalen Bedingungen, noch unter Stimulation des RAAS zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Wildtypen und den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Tieren. **68**

**Abb. 17** Dargestellt ist jeweils eine Übersichtsaufnahme und eine Detailaufnahme eines unbehandelten Wildtyps (A und B) und einer Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus (C und D). Renin ist jeweils grün und Aktin rot dargestellt. Auffällig sind u.a. die vielen reninnegativen Glomeruli in der Übersichtsaufnahme des induzierten KOs (Pfeile) und die ektope Positionierung der Reninzellen außerhalb der afferenten Arteriole in der Detailaufnahme des selben Genotyps (Pfeil). Die roten Signale entsprechen jeweils dem Glattmuskelaktin, grün entspricht Renin. **71**

<b>Abb.18</b>	<p>A: Zunahme von Reninsignalen im Wildtyp unter Stimulation des RAAS. B-D: Retrograde Rekrutierung von Reninzellen im stimulierten Wildtyp mit epitheloidartigen Zellen unmittelbar am Übergang in den Glomerulus (Pfeil in Abb. B) und von deutlich schmäleren rekrutierten Reninzellen ohne epitheloidartiges Aussehen entlang der afferenten Arteriole (Pfeile in den Abb. C und D). E: Deutlich erhöhte Dichte an Reninsignalen bei einer stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus im Vergleich zum stimulierten Wildtypen mit stärker ausgeprägter retrograder Rekrutierung (weiße Pfeile) und sehr prominenten Reninnestern (blauer Pfeil). F-G: Erheblich stärker ausgeprägte Reninnester als in der unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Maus mit ektopt lokalisierten kubischen Reninzellen (Pfeile in Abb. F) und mit rekrutierten und in die Gefäßwand integrierten Reninzellen entlang der afferenten Arteriole (Pfeile in Abb. G). Die roten Signale entsprechen jeweils dem Glattmuskelaktin, grün entspricht Renin. In den Abbildungen C, D, F und G ist Cx-40 durch die weißen Signale repräsentiert.</p>	<b>74/75</b>
<b>Abb. 19</b>	<p>Amira 3D-Rekonstruktion der Renin-(grün) und Glattmuskelaktin (rot)-Immunfluoreszenzsignale in einem Gefäßbaumausschnitt einer unbehandelten adulten Wildtyp-Maus. Auch die Glomeruli (gelb) und die Nierenkapsel sind dargestellt.</p>	<b>76</b>
<b>Abb. 20</b>	<p>3D-Rekonstruktion der Renin (grün)- und Glattmuskelaktin (rot)-Immunfluoreszenzsignale in einem Gefäßbaumausschnitt einer adulten Wildtyp-Maus nach 14-tägiger Niedrigsalz-Diät in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril</p>	<b>78</b>

(wt+LS/E). Auch die Glomeruli (gelb) und die Nierenkapsel sind dargestellt.

**Abb. 21** 3D-Rekonstruktion der Renin (grün)- und Glattmuskelaktin (rot)-Immunfluoreszenzsignale in einem Gefäßbaumausschnitt einer adulten unstimulierten Wildtyp-Maus (oben) und eines unstimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-KO-Tieres (unten) im Vergleich. **80**

**Abb. 22** 3D-Rekonstruktion der Renin (grün)- und Glattmuskelaktin (rot)-Immunfluoreszenzsignale in einem Gefäßbaumausschnitt einer stimulierten adulten Wildtyp-Maus (oben) und eines stimulierten Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-KO-Tieres (unten) im Vergleich, nach jeweils 10-tägiger Stimulation durch eine Niedrigsalzdiät und durch den ACE-Inhibitor Enalapril. **82**

**Abb. 23** Renin mRNA Daten von Wildtypen und von Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen (A) und von Wildtypen und Mäusen mit totalem Connexin 40-knock out (B), jeweils unter normalen Bedingungen und unter Stimulation des RAAS durch Enalapril, Candesartan oder Ramipril im Vergleich. Auffällig sind, im Vergleich zur totalen Connexin-40 Deletion die erniedrigte mRNA Konzentration unter Normalbedingungen und der geringfügige Anstieg unter Stimulation bei den Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäusen. **91**

**Abb. 24** Links: Renin mRNA Daten von Wildtypen (Cx-40<sup>fl/fl</sup>), Mäusen mit einer spezifischen Deletion von Connexin-40 in den Endothelzellen (Cx40<sup>fl/fl</sup>-Tie2-Cre) und von Tieren mit einer spezifischen Connexin-40 Deletion in Reninzelle (Cx40<sup>fl/fl</sup>- **92**

Renin-Cre) jeweils unter normalen Bedingungen und unter Stimulation des RAAS im Vergleich. Bemerkenswert ist, dass sich die Konzentrationen in den zellspezifischen knock-out Tieren jeweils ähnlich im Vergleich zum Wildtyp verhalten, wie dies bei einer Connexin-40 Deletion in einer ausdifferenzierten Niere der Fall ist (Abb. 32 links) Rechts: Renin mRNA Daten von Wildtypen und Mäusen die eine A96S Mutation im Cx-40 Gen homo- oder heterozygot aufwiesen. Bemerkenswert ist, dass in der vorliegenden Arbeit das RAAS durch eine low salt Diät und Enalapril in etwa genauso stark stimuliert werden konnte wie in homozygoten A96S Mäusen.

**Abb. 25** Konzentration der Renin mRNA in Wildtypen, in Mäusen mit totaler Cx-40 Deletion (Cx-40  $-/-$ ) und in Mäusen bei denen das Cx-40 Gen durch das Cx-45 Gen ersetzt wurde (Cx-45ki), jeweils unter Normalbedingungen und unter Stimulation des RAAS. Auffällig ist, dass sich die Renin mRNA Spiegel bei induziertem Cx-40 KO (Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäuse) (siehe Abb. 23 A) und bei Cx-40K145 Mutation jeweils ähnlich im Vergleich zu dem jeweiligen Wildtyp verhalten. **92**

**Abb. 26** Immunfluoreszenzaufnahmen von genetisch unterschiedlich veränderten Mäusen im Vergleich. Mäuse mit einem totalen Connexin-40 knock-out während der Nephrogenese ohne (A) und mit Stimulation (B) des RAAS. Unstimulierte (C) und stimulierte Cx-40K145 Tiere (D), sowie unstimulierte (E) und stimulierte Cx-40<sup>fl/fl</sup> Tam Cre-Mäuse (F). Die grünen Signale entsprechen jeweils den Reninzellen, die roten Signale **95**

---

dem Glattmuskelaktin der Gefäßwand.

**Abb. 27** Vergleich von 3D-Rekonstruktionen von **98**  
genetisch unterschiedlich veränderten Mäusen  
(jeweils unter Normalbedingungen). Bei einem  
totalen Cx-40 knock-out während der  
Nephrogenese (A) findet man ausschließlich  
reninpositive Glomeruli. Bei der Cx-40KI45  
Rekonstruktion (B) und bei der Cx-40 Tam Cre-  
Rekonstruktion (C) finden sich ausgeprägte  
Reninester und renin-negative Glomeruli,  
wobei die Anzahl an reninpositiven Glomeruli in  
Cx-40KI45 Tieren höher ist.

**Abb. 28** Vergleich von 3D-Rekonstruktionen von **100**  
Mäusen mit totalem Connexin-40 knock-out  
während der Nierenentwicklung (A), mit einer  
Cx-40KI45 Mutation und mit einem durch  
Tamoxifen induzierten Cx-40 Deletion (jeweils  
unter Stimulation). Alle Rekonstruktionen  
zeigen eine Zunahme an ektope Reninzellen  
und ausschließlich reninpositive Glomeruli

---

**Abkürzungsverzeichnis**

Sowohl die Kenntnis chemischer Elementsymbole und Stoffverbindungen, als auch von SI-Maßeinheiten und von gängigen, in den Naturwissenschaften und der Medizin gebrauchten Begriffsabkürzungen, wurden in dieser Arbeit als bekannt vorausgesetzt.

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>3D</b>	Dreidimensional
<b>18-<math>\alpha</math>-GA</b>	18- $\alpha$ - glycyrrhetic acid
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACE</b>	Angiotensin- Converting- Enzyme
<b>AC 5/6</b>	Adenylatzyklase 5/6
<b>ADH</b>	Antidiuretisches Hormon
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>ANG I</b>	Angiotensin I
<b>ANG II</b>	Angiotensin II
<b>AT I</b>	Angiotensin-I
<b>AT II- Rezeptoren</b>	Angiotensin-II- Rezeptoren
<b>ATP</b>	Adenosintriophosphat
<b>CAM</b>	cell adhesion glycoprotein
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>cDNA</b>	copy DNA
<b>cGMP</b>	cyclisches Guanosinmonophosphat
<b>CPX</b>	8-cyclopentyl- 1,3-dipropylxanthine
<b>CUEDC2</b>	CUE domain-containing protein-2
<b>CYP</b>	Cytochrom P
<b>Da</b>	Dalton
<b>DCIS</b>	duktales Carcinoma in situ
<b>Cx</b>	Connexin
<b>Cx 40 -/- Nieren</b>	Nieren mit einem homozygoten knock- out von Connexin 40
<b>ER</b>	Östrogenrezeptor
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Östrogenrezeptor $\alpha$
<b>EZM</b>	extrazelluläre Matrix
<b>EZR</b>	Extrazellulärraum
<b>f1/f1</b>	flox flox
<b>G</b>	Grading (= Differenzierungsgrad des Tumors)

<b>GFR</b>	glomeruläre Filtrationsrate
<b>GFS</b>	Growth factor signaling
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>cGKII</b>	Glycerinkinase II
<b>Her2/neu</b>	human epidermal growth factor receptor 2
<b>JG- Zellen</b>	Juxtaglomeruläre Zellen
<b>JGA</b>	juxtaglomerulären Apparat
<b>JGE- Zellen</b>	juxtaglomeruläre Epitheloidzellen
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LCIS</b>	lobuläres Carzinoma in situ
<b>LK</b>	Lymphknoten
<b>PDE3</b>	Phosphodiesterase 3
<b>N+</b>	regionale Lymphknoten sind befallen
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PR</b>	Progesteronrezeptor
<b>p.o.</b>	per os
<b>pT</b>	Beschreibung der Ausdehnung des Primärtumors (T) durch die Pathologie
<b>RAAS</b>	Renin- Angiotension- Aldosteron- System
<b>SEM</b>	standard error of the mean
<b>TAM</b>	Tamoxifen
<b>V</b>	peritumorale vaskuläre Invasion
<b>wt</b>	Wildtyp

**Erklärung:**

Die vorliegende Arbeit wurde von Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner angeregt und unter Ihrer Überwachung ausgearbeitet.

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 stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Vilshofen an der Donau, den 23.11.2015

Josef Vöckl

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner, die mir während der ganzen Zeit der Promotion, bei Fragen und Problemen mit ihrem Rat zur Seite stand. Liebe Charlotte, meinen herzlichsten Dank dafür, dass du es mir ermöglicht hast, meine Doktorarbeit während des Studiums anzufertigen. Ich könnte mir keine bessere Betreuung vorstellen und ich habe mich während der ganzen Zeit immer bestens aufgehoben gefühlt. Es war für mich eine große Erleichterung, dass du immer für mich Zeit gefunden hast, sodass ich ohne Verzögerungen meine Doktorarbeit erstellen konnte. Du bist sowohl menschlich als auch beruflich ein großes Vorbild für mich.

Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz, an dessen Lehrstuhl ich promovieren durfte. Sehr geehrter Herr Kurtz, vielen Dank für diese Möglichkeit. Ich habe sehr gerne an Ihrem Lehrstuhl gearbeitet.

Ein ganz großer Dank geht an meine Eltern Monika und Josef Vöckl, die mein ganzes Leben lang nur das Beste für mich wollen, die mich in allen Lebenslagen unterstützen, auf die ich mich immer verlassen kann und ohne die ich meinen Lebensweg so nicht hätte gehen können und an meine Schwester Marina, die mir immer zur Seite steht, die mir hilft, wo Sie nur kann und ohne der ich mir ein Leben nicht vorstellen könnte. Ihr habt es in den letzten Jahren nicht immer leicht mit mir gehabt und meine Launen, v.a. während der Lernphasen, waren sicherlich manchmal nur schwer auszuhalten. Ich weiß, welch großes Glück es ist, eine so tolle Familie zu haben. Vielen Dank, dass Ihr immer für mich da seid.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Melanie Gerl, die mich stets unterstützt hat. Liebe Meli, ganz ganz herzlichen Dank, dass du mich die ganze Zeit über so toll betreut hast. Du hast dich immer so lieb um mich gekümmert und mir mit einer Engelsgeduld alles erklärt und gezeigt, was ich wissen musste. Ohne dich hätte ich diese Arbeit niemals erstellen können. Ich wünsche dir für deinen weiteren Weg alles Gute.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch den technischen Assistentinnen Anna M'Bangui und Gerda Treuner. Liebe Anna, ohne deiner kompetenten Anleitung hätte ich es wohl nie geschafft die Histoschnitte für meine Rekonstruktionen zu erstellen.

Ein herzlicher Dank auch an die wissenschaftlichen Assistenten Dr. rer. nat. Katharina Machura, Dr. rer. nat. Björn Neubauer und Dr. rer. nat. Dominik Steppan. Danke, dass ich mich mit sämtlichen Fragen jederzeit an euch wenden konnte und für eure wertvollen Tipps. Ihr wart eine sehr große Hilfe für mich.

Abschließend möchte ich mich noch bei allen Menschen bedanken, die ich hier nicht namentlich erwähnt habe, die mich aber während der ganzen Zeit unterstützt haben. Vielen Dank.