

DER EINFLUSS VON ENDOTHELIN
AUF DIE REGULATION
DES RENINSYSTEMS



DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christoph Matthias Langer
aus Neumarkt i. d. OPf.
im Jahre 2016

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum September 2013 bis Oktober 2016 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 07. November 2016.

Die Arbeit wurde angeleitet von Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner.

Prüfungskommission:

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner

Zweiter Gutachter: Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Barbara Braunger

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Anatomie der Niere	3
1.1.1 Makroskopische Anatomie	3
1.1.2 Mikroskopische Anatomie	4
1.1.3 Feinbau der Nierenkörperchen	6
1.1.4 Der glomeruläre Filter	8
1.2 Das Blutgefäßsystem der Niere	9
1.3 Der juxtaglomeruläre Apparat	11
1.3.1 Anatomie und physiologische Bedeutung	11
1.3.2 Die juxtaglomeruläre Zelle	12
1.3.3 Retrograde Rekrutierung	13
1.4 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	13
1.5 Reninsynthese und -sekretion	16
1.6 Regulation der Reninsynthese und -sekretion	18
1.6.1 Physiologische Regulation	18
1.6.2 Humorale Regulation	22
1.6.3 Faktoren der zellulären Regulation	23
1.7 Endotheline	27
1.7.1 Überblick	27
1.7.2 Endothelinsynthese	27
1.7.3 Endothelinrezeptoren	29
1.7.4 Endothelinwirkung auf das Gefäßsystem	30
1.7.5 Endothelinwirkung auf die Niere	32

1.7.6	Endothelinwirkung auf humorale Systeme	38
2	Fragestellung und Zielsetzung	41
3	Material und Methoden	43
3.1	Material	43
3.1.1	Geräte	43
3.1.2	Verbrauchsmaterial	45
3.1.3	Chemikalien, Enzyme, Kits	46
3.1.4	Primer	47
3.1.5	Antikörper	48
3.1.6	Puffer und Lösungen	49
3.1.7	Software und Internetdienste	51
3.2	Methoden	51
3.2.1	Versuchstiere	51
3.2.2	Atomemissionsspektrometrie	53
3.2.3	Osmometrie	54
3.2.4	Histologische Methoden	54
3.2.5	Dreidimensionale Rekonstruktion	58
3.2.6	Molekularbiologische Methoden	64
3.2.7	Statistische Methoden	70
4	Ergebnisse	71
4.1	Lokalisation der Endothelinrezeptoren	71
4.1.1	Lokalisation der Endothelinrezeptoren im Gefäßsystem der Mausniere	71
4.1.2	Lokalisation der Endothelinrezeptoren im Tubulus- und Sam- melrohrsystem	73
4.2	Elektrolyt- und Osmolalitätsmessungen	76
4.2.1	Elektrolyte	76
4.2.2	Osmolalität	78

4.3	Einfluss von Endothelin auf die Reninexpression – Qualitative und quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters	80
4.3.1	mRNA-Analyse	80
4.3.2	Histologische Darstellung des Reninexpressionsmusters . . .	84
4.3.3	Dreidimensionale Darstellung des Reninexpressionsmusters .	89
4.4	Bedeutung des ET _A -Rezeptors für die Stimulierbarkeit des Renin-systems	94
4.4.1	mRNA-Analyse	94
4.4.2	Histologische Darstellung des Reninexpressionsmusters . . .	99
4.4.3	Dreidimensionale Darstellung des Reninexpressionsmusters .	104
5	Diskussion	106
5.1	Lokalisation der Endothelinrezeptoren	106
5.2	Analyse der Elektrolyt- und Osmolalitätsmessungen	108
5.3	Einfluss von Endothelin auf die Reninexpression – Qualitative und quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters	113
5.4	Bedeutung des ET _A -Rezeptors für die Stimulierbarkeit des Renin-systems	118
5.5	Schlussfolgerungen	122
5.6	Ausblick	123
	Abkürzungsverzeichnis	125
	Abbildungsverzeichnis	130
	Literaturverzeichnis	133
	Danksagung	160
	Eigenständigkeitserklärung	161

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Bedeutung von Endothelinen für die Steuerung des Reninsystems. Renin stellt in seiner Rolle als Agens im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und der damit verbundenen Einflussnahme auf den systemischen Blutdruck, die glomeruläre Filtrationsrate sowie den Wasser- und Elektrolythaushalt ein entscheidendes Enzym der Niere dar. Neben dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist das Endothelinsystem das stärkste Vasopressorsystem des Körpers. Zwischen beiden Systemen bestehen zahlreiche Interaktionen (Rossi et al., 1999). Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Untersuchung eben jener Einflüsse des Endothelinsystems auf das Reninsystem. Dazu erfolgte zunächst die Bestimmung der renalen Endothelinrezeptorlokalisierung anhand immunhistochemischer Untersuchungen von Mäusenieren. Anschließend wurde mithilfe einer pharmakologischen Blockade von Endothelinrezeptoren an C57BL/6-Mäusen einerseits und an Ren-1d^{+ / Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäusen mit angeborener reninzellspezifischer Endothelinrezeptordefizienz andererseits untersucht, welche Auswirkungen sich im Hinblick auf Verteilung und Quantität der Reninzellen und der -produktion sowie der Expression von Endothelinrezeptoren ergeben. Als Endothelinrezeptor-Antagonisten fanden die Substanzen BQ610 (ET_A-selektiv), BQ788 (ET_B-selektiv) sowie Bosentan (dualer Endothelinrezeptorantagonist) Verwendung. Zur Bestimmung der endothelialen Beeinflussung der Elektrolythomöostase schloss sich eine atomemissionsspektroskopische Ermittlung der Kalium- und Natrium-Urin-Konzentration sowie der Urin-Osmolalität an. Zur Analyse der Einflussnahme eines angeborenen reninzellspezifischen Endothelinrezeptormangels auf juxtaglomeruläre Zellen auf zellulärer Ebene erfolgte die Untersuchung der Reninproduktion anhand von Ren-1d^{+ / Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäusen. Zur Klärung der Bedeutung des ET_A-Rezeptors für die Stimulation des Reninsystems schließlich lag der Fokus auf der Differenz der

Reninproduktion zwischen Wildtyp- und Knockout-Stämmen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lokalisation der Endothelinrezeptoren in Mäusenieren weitgehend der Expression von Endothelinrezeptoren in der Niere anderer Säugetiere entspricht. Abweichungen ergeben sich insofern, als im Vas afferens, im distalen Tubulus sowie im Sammelrohr keine ET_B -, im proximalen Tubulus hingegen keine ET_A -Rezeptoren nachzuweisen waren. Die Analyse der Elektrolytkonzentrationen förderte keine aufschlussreichen Erkenntnisse zu Tage, eine endotheliale Beeinflussung der Elektrolythomöostase kann nicht postuliert werden. Im Hinblick auf die Reninfreisetzung zeigten die durchgeführten Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede. Trotz der Expression renaler Endothelinrezeptoren scheint sowohl deren Antagonismus als auch deren reninzellspezifische Abwesenheit in vivo keine signifikanten Einflüsse auf das Reninsystem nach sich zu ziehen. Diese mangelnde Einflussnahme bei funktioneller Defizienz der Endothelinrezeptoren lässt mit Blick auf die in der Literatur beschriebenen Auswirkungen von Endothelinen auf eine Vielzahl renaler Parameter – einschließlich des Reninsystems – die Existenz kompensatorischer Mechanismen vermuten. Im Fokus dieser Kompensationsmechanismen könnten möglicherweise Prostaglandine und NO stehen. Ferner verbleibt die Rolle des ET_B -Rezeptors sowie der Endothelinsubtypen ET_2 und ET_3 genauer zu eruieren.

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Niere

1.1.1 Makroskopische Anatomie

Die anatomische Beschaffenheit der Niere von Nagetieren stimmt im Wesentlichen mit der Struktur der Niere aller Säugetiere, einschließlich des Menschen, überein. Im Gegensatz zum Menschen aber, dessen Nieren mehrere Papillen aufweisen, besitzen Mäuse eine unipapilläre Niere, die sich, ebenso wie die menschliche Niere, in drei Anteile gliedert: das Nierenmark (Medulla renalis), die Nierenrinde (Cortex renalis) sowie die Nierenkapsel (Capsula fibrosa) (Weisert, 1990).

Makroskopisch besitzen die Nieren eine bohnenförmige Gestalt und weisen zentral an ihrer medialen Seite eine Einziehung auf, das Hilum renale. Dieses stellt die Eintritts- bzw. Austrittsstelle für die Nierenarterie (A. renalis), die Nierenvene (V. renalis), den Ureter sowie einige Lymphgefäße und Nerven dar. Der Hilus erweitert sich in den Sinus renalis, welcher das Nierenbecken (Pelvis renalis), Gefäße, Nerven und Fettgewebe enthält. Umgeben wird die Niere von der Nierenkapsel (Capsula fibrosa), einer Struktur aus straffem, geflechtartigem Bindegewebe, die als Außenhülle der Niere das Nierenparenchym umschließt und gegen die Fettkapsel abgrenzt. Die Nieren selbst befinden sich im Retroperitonealraum, umschlossen von einer großzügigen Fettkapsel, der Capsula adiposa renis, die dem mechanischen und thermischen Schutz des Organs dient. Die Gerota-Faszie (Fascia renalis) schließlich umgibt als bindegewebiger Faszien­sack die Capsula adiposa und die Nebenniere (Junqueira et al., 2005; Schünke et al., 2009).

Bereits mit bloßem Auge lässt sich am Nierenquerschnitt die Unterteilung des Nierenparenchyms in eine dunkler gefärbte Nierenrinde und ein innen gelegenes helle-

res Nierenmark erkennen (Hees and Sinowatz, 2000). Dabei umfasst die Nierenrinde in Form einer sogenannten Nierensäule (*Columna renalis*) das pyramidenförmige Nierenmark. Von der Basis der Pyramide ziehen sogenannte Markstrahlen – dabei handelt es sich um Bündel von Sammelrohren und Tubulusabschnitten – in die Rinde und unterteilen letztere in Nierenlabyrinth. Dies verleiht dem Nierenmark ein gestreiftes Aussehen. Die Spitze der Markpyramide (*Papilla renalis*) mündet in das Nierenbecken und wird von einem Nierenkelch (*Calyx renalis*) umfasst. Das Nierenmark wird in eine äußere Zone (*Zona externa*) mit einem Außen- und einem Innenstreifen und eine innere Zone (*Zona interna*) unterteilt. Morphologisch gliedert sich das Nierenmark in Markpyramiden (*Pyramis renalis*). Die Niere von Mäusen enthält einen zusätzlichen Abschnitt der äußeren Markzone, der als „innermost stripe“ bezeichnet wird: Er bildet den Übergang zwischen der Außen- und der Innenzone, hat Ähnlichkeit mit dem Innenstreifen und enthält distale Tubuli (Welsch, 2009; Weisert, 1990; Junqueira et al., 2005).

1.1.2 Mikroskopische Anatomie

Die strukturelle und funktionelle Einheit der Niere stellt das Nephron dar. Es besteht aus dem Nierenkörperchen (*Corpusculum renale* = Malpighi-Körperchen) und dem sich anschließenden Tubulussystem (*Tubuli renales*). Die Nierenkörperchen liegen am Beginn des Nephrons und setzen sich aus drei Einheiten zusammen: der Bowman-Kapsel, dem Glomerulus (einem der Filtration dienenden Kapillarknäuel) sowie dem Mesangium. Das Tubulussystem seinerseits gliedert sich in folgende Abschnitte: Am Harnpol des Nierenkörperchens befindet sich der proximale Tubulus mit einer gewundenen *Pars convoluta* und einer geraden *Pars recta*. Der sich anschließende intermediäre Tubulus (*Tubulus attenuatus*) zieht mit einer *Pars descendens* und einer *Pars ascendens* schleifenartig in die Marksubstanz, gefolgt vom distalen Tubulus, wiederum bestehend aus einer *Pars recta* und einer *Pars convoluta*. Über ein Verbindungsstück (*Tubulus renalis colligans*) mündet das Tubulussystem in ein Sammelrohr. Zusammen werden Verbindungsstück und Sammelrohr auch als Sammelrohrsystem bezeichnet. Die *Pars recta* des proximalen Tubulus, der intermediäre Tubulus sowie die *Pars recta* des distalen Tubulus bilden gemeinsam

eine haarnadelförmige Struktur, die sogenannte Henle-Schleife (Ansa nephroni). Allerdings besitzen nur marknah gelegene juxtamedulläre Nephrone lange, tief in das innere Nierenmark eintauchende Henle-Schleifen. Kortikale Nephrone weisen kurze Henle-Schleifen auf (Welsch, 2009; Schünke et al., 2009; Junqueira et al., 2005; Weisert, 1990; Leonhardt, 1990).

Die am Beginn des Nephrons liegenden Nierenkörperchen bestehen aus der Bowman-Kapsel und einem Blutkapillarknäuel, dem Glomerulus, das sich in die Kapsel einstülpt (siehe Abbildung 1.1). Der obere Pol eines Nierenkörperchens wird als Gefäßpol, der untere als Harnpol bezeichnet. In den Nierenkörperchen erfolgt die Ultrafiltration des Blutes. Die Filtrationsfläche ist durch Schlingenbildung der Glomeruluskapillaren vergrößert, der Blutdruck in den filtrierenden Glomeruluskapillaren ist gegenüber nutritiven Kapillaren erhöht (Junqueira et al., 2005). Gespeist wird das Kapillarknäuel von einer zuführenden Arteriola afferens, die sich am Gefäßpol in zahlreiche Kapillarschlingen teilt. An den Glomerulus schließt sich die ebenfalls am Gefäßpol befindliche, nahe der zuführenden Arteriola afferens gelegene Arteriola efferens an, über welche das filtrierte Blut das Nierenkörperchen wieder verlässt (Welsch, 2009; Lüllmann-Rauch, 2015).

Der Raum zwischen den Kapillarschlingen des Glomerulus wird vom Mesangium eingenommen, welches als Aufhängevorrichtung für die glomerulären Kapillaren dient.¹ Das Mesangium bezeichnet einen schmalen Bindegewebsraum, bestehend aus Mesangialzellen, eingebettet in Extrazellulärmatrix. Die Mesangialzellen selbst stellen spezielle kontraktile, perizytenähnliche Zellen dar, die zur Phagozytose befähigt sind und biologisch aktive Substanzen wie etwa Prostaglandine sezernieren. Sie stabilisieren durch ihren Tonus die Kapillarwand gegen den nach außen wirkenden hydrostatischen Druck und sind in der Lage, den Blutfluss durch den Glomerulus zu beeinflussen. Auffallend ist die Vielfalt der Mesangiumzellen an Rezeptoren für vasoaktive Hormone wie etwa Angiotensin II oder Endothelin (Welsch, 2009; Lüllmann-Rauch, 2015; Junqueira et al., 2005).

¹Die Bezeichnung des Gewebes zwischen den Kapillarschlingen als Mesangium erfolgt in Anlehnung an das Mesenterium zwischen den Darmschlingen (Junqueira et al., 2005).

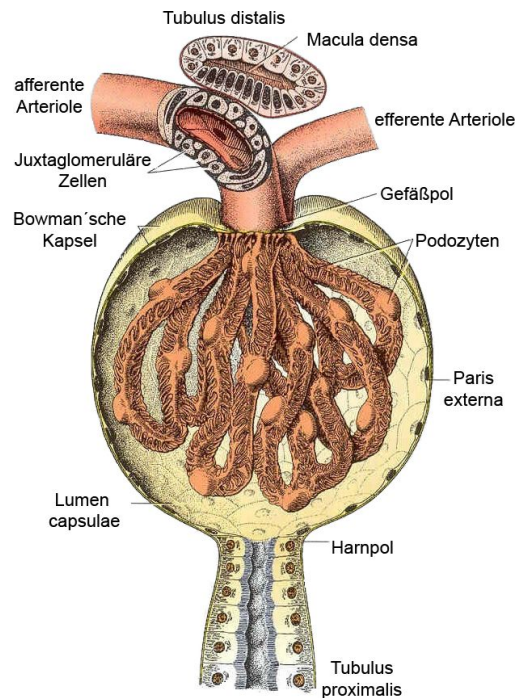


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Glomerulus. Abbildung nach Junqueira et al. (2005).

1.1.3 Feinbau der Nierenkörperchen

Das Nierenkörperchen setzt sich zusammen aus dem Glomerulus und der Bowman-Kapsel.² Letztere umgibt als doppelwandige Kapsel, bestehend aus einem viszeralem und einem parietalen Blatt, den Glomerulus. Am Gefäßpol gehen beide Blätter ineinander über. Das schmale Lumen zwischen den beiden Blättern wird als Kapselraum bezeichnet und findet am Harnpol des Nierenkörperchens – diametral dem Gefäßpol gegenüber gelegen – seine Fortsetzung in Form des Tubulussystems. In den Kapselraum hinein erfolgt die Filtration des Harns. Das parietale Blatt der Bowman-Kapsel besteht aus einschichtigem, flachem Epithel, das den Kapselraum auskleidet und von einer Basallamina unterlagert ist. Das viszerale Blatt entwickelt sich zu einem spezialisierten Epithel aus Podozyten (Lüllmann-Rauch, 2015; Weisert, 1990).

²In der Niere einer Maus befinden sich durchschnittlich etwa 12 400 Glomeruli. Der Durchmesser der Glomeruli beträgt etwa 60–100 μm . Nach Smith (1951) und Hackbarth et al. (1987), zitiert aus Weisert (1990).

Zum Glomerulus werden folgende anatomische Strukturen gerechnet: Kapillarknäuel, Podozyten, glomeruläre Basalmembran und Mesangium.

Das Gefäßkonvolut des Glomerulus setzt sich aus etwa 30 verzweigten, anastomosierenden Kapillarschlingen zusammen. Das Endothel der Kapillaren ist gefenstert und weist kein Diaphragma auf. Damit stellt es einen Teil der Blut-Harn-Schranke dar, die Poren³ halten jedoch lediglich Blutzellen zurück (Welsch, 2009; Lüllmann-Rauch, 2015).

Auf der Harnseite der glomerulären Basalmembran befinden sich die Podozyten. Die Perikaryen der sternförmigen Podozyten weisen kräftige, die Glomeruluskapillaren umgreifende Primärfortsätze auf, aus denen zahlreiche dünne, fingerförmige Sekundärfortsätze (Fußfortsätze, Pedicellen) hervorgehen, die der Befestigung der Podozyten an der glomerulären Basalmembran dienen. Die Fußfortsätze zweier Podozyten interdigitieren, woraus eine fast vollständige Überdeckung der glomerulären Basalmembran resultiert. Es verbleiben lediglich 20–30 nm schmale Filtrationsschlitze, die von einem Schlitzdiaphragma überbrückt werden. An der Plasmamembran der Fußfortsätze befindet sich negativ geladenes Podocalyxin, welches für Ausbildung und Erhalt der speziellen Fußfortsatz-Architektur von Bedeutung ist (Lüllmann-Rauch, 2015).

Die Basalmembran der Podozyten verschmilzt mit der der Endothelzellen der Glomeruluskapillaren zu einer gemeinsamen Basallamina. Diese befindet sich zwischen Kapillarendothel und Podozyten und weist einen dreischichtigen Aufbau auf: Das Grundgerüst dieser Membran wird von der Lamina densa gebildet, welche von einer dem Endothel zugewandten Lamina rara interna sowie einer in Richtung der Podozyten gelegenen Lamina rara externa flankiert wird. Durch eine intensive Vernetzung von Kollagenfasern weist die glomeruläre Basalmembran eine besondere Widerstandsfähigkeit auf. Zugleich stellt die Basallamina einen wesentlichen Anteil des glomerulären Ultrafilters dar, wobei elektrisch negativ geladenes Heparansulfat die wichtigste Komponente der elektrostatischen Barriere ist (Welsch, 2009; Lüllmann-Rauch, 2015; Leonhardt, 1990).

Zwischen den ineinander verzahnten Fußfortsätzen benachbarter Podozyten be-

³Die Fenster im Endothel der Kapillaren besitzen einen Durchmesser von 70–100 nm (Lüllmann-Rauch, 2015).

findet sich das Schlitzdiaphragma. Lange Transmembranproteine (Nephrin spielt hierbei eine Schlüsselrolle) durchspannen den Spaltraum zwischen den Pedicellen. Auf diese Weise entstehen 2–5 nm weite Filtrationsporen (Welsch, 2009; Lüllmann-Rauch, 2015).

1.1.4 Der glomeruläre Filter

Der Harnfilter setzt sich gestaffelt aus den drei Strukturen Endothel, Basallamina und Podozyten zusammen. Durch diesen Filter presst der hydrostatische Kapillardruck den Primärharn, ein proteinfreies Ultrafiltrat des Blutplasmas, in den Kapselraum des Nierenkörperchens. Die wesentliche Barriere für Proteine stellt dabei die Basallamina dar, sowohl aufgrund der Porengröße als auch wegen des stark negativ geladenen Heparansulfats. Deshalb können negativ geladene Moleküle den Filter schlechter durchdringen als positiv geladene. Frei filtrierte werden nur Stoffe mit einer Molekülmasse von 6–15 kD. Substanzen mit einem Molekulargewicht von mehr als 70 kD werden vollständig von der dichten Filterstruktur der Schlitzporendiaphragmen zurückgehalten (Welsch, 2009; Wehner et al., 2007; Junqueira et al., 2005; Leonhardt, 1990).

Der Primärharn verlässt das Nierenkörperchen in das am Harnpol des Nephrons beginnende Tubulussystem. Der proximale Tubulus ist der erste und zugleich längste Abschnitt des Tubulussystems. Er besteht aus einer geknäuelten Pars convoluta, welche sich im Nierenkortex befindet, und einer gestreckten Pars recta, die im Nierenmark lokalisiert ist. In den proximalen Tubuli werden 70–80 % des filtrierten Wassers und Natriums rückresorbiert, außerdem fast die gesamte Menge der filtrierten Glukose und der Aminosäuren. Über einen dünnen Intermediärtubulus (Tubulus intermedius) schließt sich dem proximalen der distale Tubulus an. Auch dieser setzt sich zusammen aus einer geraden Pars recta, die den wesentlichen Teil des aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife bildet, und einer gewundenen Pars convoluta. Im aufsteigenden Teil des distalen Tubulus erfolgt eine intensive Rückresorption von Natrium und Chlorid. Am Übergang der Pars recta zur Pars convoluta nimmt der distale Tubulus am Gefäßpol Kontakt mit dem zugehörigen Glomerulus auf und bildet an dieser Stelle die plaqueartige Macula densa. Zwischen distalem

Tubulus und Sammelrohr befindet sich ein kurzes Verbindungsstück (Tubulus reuniens). Jeweils etwa 10 Verbindungsstücke münden in ein kortikales Sammelrohr. Die Sammelrohre verlaufen in den Markstrahlen in Richtung Nierenmark und Nierenpapille. Durch einen Zusammenfluss entstehen weite papilläre Sammelrohre, die an den Papillen der Markpyramiden in das Nierenbecken münden. Über Urether, Harnblase und Urethra wird der Harn schließlich abgelassen (Welsch, 2009).

1.2 Das Blutgefäßsystem der Niere

Die Nieren gehören zu den am stärksten durchbluteten Organen des Körpers. Obgleich sie weniger als 0.5 % des Körpergewichts ausmachen, entfallen auf sie 20–25 % des Herzminutenvolumens. Die Anatomie des renalen Blutgefäßsystems ist dabei entscheidend für die Nierenfunktion, wobei die Niere eine streng histotopische Ordnung aufweist (Junqueira et al., 2005; Welsch, 2009; Leonhardt, 1990): An jede Niere tritt am Hilum die Nierenarterie (A. renalis) heran, beidseits der Aorta entspringend. Die A. renalis teilt sich zunächst in insgesamt fünf Aa. segmentales auf, welche sich in kleinere Aa. interlobares verzweigen, wobei die Aufzweigung oft schon vor Eintritt in das Nierengewebe im Bereich des Sinus renalis erfolgt. Die Interlobararterien sind zwischen den Markpyramiden in den Columnae renales gelegen und teilen sich an der Basis der Pyramiden in Aa. arcuatae auf, die bogenförmig an der Mark-Rinden-Grenze verlaufen. Von den Aa. arcuatae zweigen Aa. interlobulares (Aa. corticales radiatae) ab, die senkrecht zur Oberfläche der Niere ziehen. Auf ihrem Weg durch die Nierenrinde geben diese Arterien nach allen Seiten Arteriolen afferentes (Vasa afferentia) ab und versorgen mit ihren Endästen die Nierenkapsel (Welsch, 2009; Junqueira et al., 2005).

Die zuführenden Arteriolen glomerulares afferentes verzweigen sich in dünne Äste, die in das Kapillarknäuel des Glomerulus übergehen, an dessen Ende das Blut das Nierenkörperchen über eine Arteriola efferens wieder verlässt. Die Arteriola efferens versorgt die Tubuli der Nierenrinde und teilt sich in zahlreiche Vasa recta, die als feine arterielle Gefäße der Versorgung des Nierenmarks dienen. Im Anschluss an ein Kapillarnetz sammelt sich das Blut zunächst in venösen Vasa recta, welche über Vv. corticales radiatae in Vv. arcuatae übergehen. Letztere verlaufen parallel

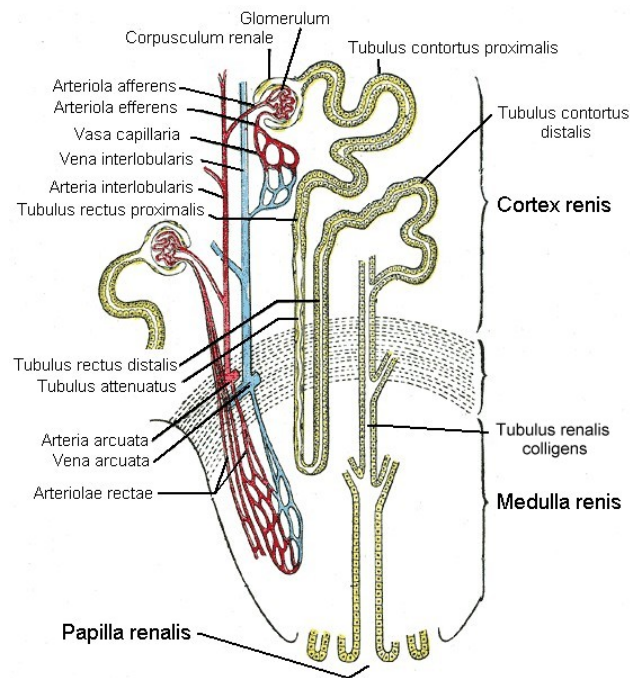


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Blutgefäßsystems der Niere. Nach Gray (2000).

zu den Aa. arcuatae und münden in Vv. interlobares, die am Hilum die Nierenvene (V. renalis) bilden (Welsch, 2009; Junqueira et al., 2005; Weisert, 1990). Auf diese Weise bildet die Anordnung der renalen Blutgefäße ein verschlungenes, iteriertes System mikrovaskulärer Einheiten mit besonderer Bedeutung für die Nierenfunktion (Abrahamson et al., 1998). Sympathikusnerven aus dem Ganglion coeliacum lassen sich in Begleitung der Arterien bis zu jedem Glomerulus verfolgen (Leonhardt, 1990).

Um die glomeruläre Filtration möglichst konstant zu halten, unterliegt die Durchblutung der Nieren einer Autoregulation. Die Angriffspunkte der Autoregulation stellen dabei die afferenten und die efferenten Arteriolen dar, vermittels Vasokonstriktion beider Gefäße wird eine Reduktion des Filtrationsdrucks bei steigendem Perfusionsdruck der Niere erreicht. Die genauen Mechanismen dieser Regulation sind allerdings noch nicht vollständig geklärt (Speckmann et al., 2013).

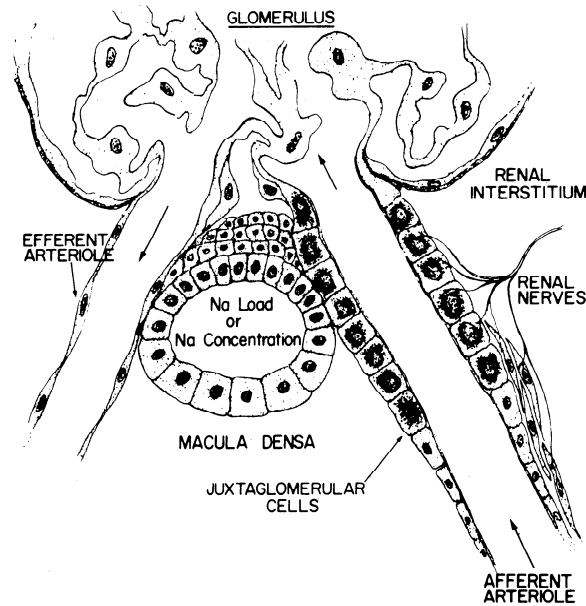


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des juxtaglomerulären Apparates. Dunkle Granula der juxtaglomerulären Zellen enthalten Renin. Abbildung nach Davis and Freeman (1976).

1.3 Der juxtaglomeruläre Apparat

1.3.1 Anatomie und physiologische Bedeutung

Im Bereich des Gefäßpols der Nierenkörperchen befindet sich der juxtaglomeruläre Apparat, bestehend aus folgenden Anteilen: der Macula densa, granulierten juxtaglomerulären Zellen sowie extraglomerulären Mesangiumzellen (Goormaghtigh-Zellen). Die Funktion des juxtaglomerulären Apparates ist sowohl lokal im Sinne einer tubuloglomerulären Rückkopplung sowie systemisch in Form der In-Gang-Setzung der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade zu sehen. Über die Produktion von Renin beeinflusst der juxtaglomeruläre Apparat die Bildung von Angiotensin II. Als Vasokonstriktor nimmt Angiotensin II Einfluss auf den Blutdruck des Gesamtorganismus und damit auf die Durchblutung der Niere, wodurch die Filtrationsrate der Niere reguliert wird. Die Freisetzung von Renin erfolgt vermutlich sowohl mittels Druckrezeptoren in der Wand der Arteriola afferens als auch über Chemorezeptoren, die die Natriumkonzentration im distalen Tubulus detektieren. Die

funktionelle Rückkopplung zwischen Tubulus und Glomerulus, wie sie im Bereich des juxtaglomerulären Apparats erfolgt, wird als tubuloglomeruläre Rückkopplung bezeichnet (Welsch, 2009).

Die Macula densa ist Teil des distalen Tubulus und besteht aus lediglich 20–30 relativ hohen, dicht gestellten Epithelzellen, siehe Abbildungen 1.1 und 1.3. Die Lokalisation der Zellen befindet sich im Kontaktbereich von Arteriola afferens und distalem Tubulus. Die Macula densa registriert die intraluminale NaCl-Konzentration und beeinflusst in Abhängigkeit des gemessenen Wertes die Filtrationsrate des jeweiligen Glomerulus. Weiterhin befinden sich in der Wand der Arteriola afferens granulierte juxtaglomeruläre Zellen. Hierbei handelt es sich um spezialisierte, sympathisch innervierte Zellen, die in unterschiedlicher Menge zytoplasmatische Sekretionsgranula enthalten, welche das Renin beherbergen. Diese Zellen sind keine glatten Muskelzellen, allerdings besitzen beide Zelltypen einen gemeinsamen Vorläufer (Sequeira-Lopez et al., 2001). Die extraglomerulären Mesangiumzellen sind sowohl untereinander über Gap junctions als auch mit den granulierten juxtaglomerulären Zellen und den glomerulären Mesangiumzellen verbunden. Darüber hinaus bestehen Verbindungen zu glatten Muskelzellen von Arteriola afferens und Arteriola efferens. Sie erhalten von den Zellen der Macula densa Informationen über den Natriumgehalt im distalen Tubulus, mittels Kontraktion der Arteriola efferens wird die glomeruläre Filtrationsrate vermindert (Welsch, 2009; Lüllmann-Rauch, 2015).

1.3.2 Die juxtaglomeruläre Zelle

Die juxtaglomeruläre Zelle ist der Ort der Reninsynthese und -speicherung und zuständig für die exozytotische Sekretion des Renins in die Blutbahn (Peters and Clausmeyer, 2002; Wagner and Kurtz, 1998). Bei diesem Zelltyp handelt es sich um modifizierte glatte Muskelzellen, die typischerweise in der Tunica media im terminalen Gefäßabschnitt der Arteriola afferens zu finden sind. Die juxtaglomerulären Zellen ersetzen an dieser Stelle die Glattmuskelzellen und bilden so einen Teil der Gefäßwand des Vas afferens, exprimieren im Gegensatz zu diesen aber kein Glattmuskelaktin (α -SMA), ein kontraktiles Protein, das üblicherweise in pe-

rivaskulären Zellen kleiner Blutgefäße exprimiert wird (Liu and Ballermann, 1998; Yokota et al., 2006; Zhao et al., 2012). Die zahlreichen reninhaltigen Granula verleihen den juxtaglomerulären Zellen ihre kubische, epitheloide Form, wodurch sie gut von den umgebenden glatten Muskelzellen zu unterscheiden sind. Daneben werden vereinzelte granulierte Zellen in der Tunica media von efferenten Arteriolen sowie in der Tunica adventitia von Interlobulararterien vorgefunden (Kon, 1999). Ab dem zehnten postpartalen Tag beschränkt sich das Reninvorkommen auf den juxtaglomerulären Bereich der Arteriola afferens (Sauter et al., 2008).

1.3.3 Retrograde Rekrutierung

Die Anzahl juxtaglomerulärer Zellen entlang der afferenten Arteriole ist variabel. Der Aktivitätszustand des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS, s. u.) besitzt direkte Auswirkungen auf die Up- oder Downregulation dieser Zellen. Eine Zunahme der Aktivität des RAAS zieht eine Rekrutierung reninpositiver Zellen entlang der afferenten Arteriole und der Interlobulararterien nach sich. Bei diesem Vorgang kommt es zur Umwandlung glatter Gefäßmuskelzellen in reninproduzierende Zellen. Das Rekrutierungsmuster erfolgt diskontinuierlich nach einem noch nicht geklärten Schema (Casellas et al., 1994; Reddi et al., 1998; Fuchs et al., 2002). Bei chronischer Suppression des RAAS verringert sich die Anzahl granulierter Zellen und es erfolgt eine Umwandlung von der reninproduzierenden Zelle hin zur glatten Muskelzelle (Kurtz and Penner, 1989; Gomez et al., 1990; Sequeira-Lopez et al., 2001).

1.4 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die Entdeckung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems reicht bis in das 19. Jahrhundert zurück. Bereits im Jahre 1898 beschrieben Robert Tigerstedt und Per Bergman an Kaninchen eine Steigerung des Blutdrucks durch Injektion eines aus Kaninchennieren gewonnenen Extraktes. Die Forscher konnten eine von der Niere sezernierte blutdrucksteigernde Substanz nachweisen und bezeichneten diese gemäß ihrem Bildungsort als „Renin“ (Tigerstedt and Bergman, 1898).

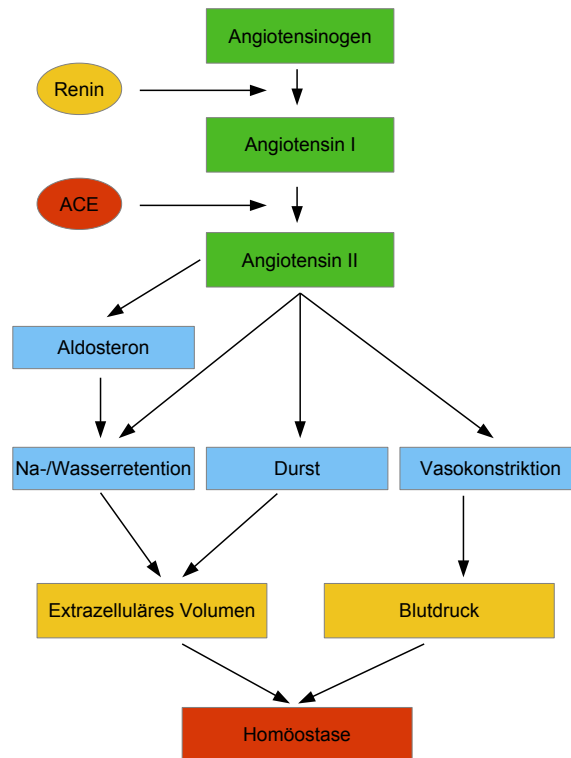


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Signalkaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS).

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) stellt ein zentrales Regulationssystem des Körpers dar. Es dient der Aufrechterhaltung des Blutdrucks sowie der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts. Darüber hinaus reguliert es die Gefäßspannung und moduliert Wachstumsprozesse (Wagner and Kurtz, 1998; Peters and Clausmeyer, 2002). Die beiden für das RAAS charakteristischen enzymatischen Reaktionen finden im Blutplasma statt und führen zur Bildung von Angiotensin II (Davis and Freeman, 1976): In einem ersten Schritt spaltet die Aspartyl-Protease Renin aus hepatisch synthetisiertem Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab (Mercure et al., 1998). Aus Angiotensin I entsteht mittels enzymatischer Hydrolyse unter Abspaltung zweier weiterer Aminosäuren das aktive Oktapeptid Angiotensin II (Klinke et al., 2005; Speckmann et al., 2013). Die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II vollzieht sich hauptsächlich in

der Lunge (Davis and Freeman, 1976; Paul et al., 2006); katalysiert wird dieser Schritt von der Metalloprotease Angiotensin Converting Enzyme (ACE), die sich auf der Membran von Endothelzellen des Gefäßsystems befindet (Mercure et al., 1998). Angiotensin II stimuliert in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde die Aldosteronsekretion, welche eine Natrium- und Wasserresorption nach sich zieht. Dadurch steigen Blutdruck und -volumen. Der Reninmetabolismus erfolgt in der Leber und korreliert mit dem hepatischen Blutfluss (Davis and Freeman, 1976). Die Wirkung von Angiotensin II wird über die Angiotensin-II-Rezeptor-Subtypen AT_1 und AT_2 vermittelt. Während die meisten Säugetiere nur ein einzelnes AT_1 -Gen exprimieren, besitzen Nagetiere AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor-Gene. Beide Subtypen weisen aber eine hohe Übereinstimmung ($> 95\%$) auf. AT_1 -Rezeptoren sind G_q -Protein-gekoppelt und vermitteln ihre Wirkung vornehmlich über Phospholipasen, Calciumkanäle und Tyrosinkinasen. Die meisten bekannten Effekte von Angiotensin II beruhen auf AT_1 -Rezeptoren: Vasokonstriktion, renale Salzreabsorption im Tubulussystem, Stimulation der Aldosteronfreisetzung, zentrale Effekte wie die Vermittlung eines Durstgefühls und die Vasopressinsekretion (De Gasparo et al., 2000; Castrop et al., 2010). Der physiologische Effekt des AT_2 -Rezeptors besteht in einer Proliferationshemmung und unterscheidet sich damit grundsätzlich von der des AT_1 -Rezeptors. Darüber hinaus wurden antiinflammatorische, antifibrotische und vasodilatative Wirkaspekte beschrieben (Steckelings, 2011). Während der AT_2 -Rezeptor stark im Rahmen der fetalen Entwicklung exprimiert wird, ist er im adulten Gewebe weniger zahlreich vertreten (De Gasparo et al., 2000). Die Wirkungen des Oktapeptids Angiotensin II sind somit vielfältig: Es führt zu einer Vasokonstriktion, senkt den renalen Blutfluss und vermittelt ein Durstgefühl. Zusätzlich steigert es die Sekretion von ADH, Aldosteron und Katecholaminen. Auf diese Weise nimmt das RAAS die Aufrechterhaltung des Blutdrucks sowie die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts wahr (Speckmann et al., 2013; Klinka et al., 2005). Ein Überblick über das RAAS findet sich in Abbildung 1.4. Allerdings muss nach Paul et al. (2006) das aus den Lehrbüchern in dieser Form bekannte systemische RAAS um die Einführung lokaler Renin-Angiotensin-Systeme modifiziert werden, nachdem in zahlreichen weiteren Organen die lokale Bildung von Renin nachgewiesen wurde. Die jeweiligen Funktionen der verschiedenen Sys-

teme sind aber noch nicht vollständig geklärt (Paul et al., 2006).

1.5 Reninsynthese und -sekretion

Die Struktur des Reningens wurde bereits für verschiedene Spezies analysiert. Sequenzanalysen zeigten dabei hohe Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Arten. Sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen ist das Reningen auf Chromosom 1 lokalisiert. Strukturell gliedert sich das Reningen bei Ratten und Mäusen in neun Exons und acht Introns, während Menschen und Schafe ein zusätzliches zehntes Exon aufweisen, das für drei weitere Aminosäuren kodiert. Die Größe des menschlichen Reningens beträgt 11 700 bp, das der Maus 9600 bp (Castrop et al., 2010; Morris, 1992).

Eine Besonderheit ist die Existenz eines zweiten reninkodierenden Genlocus bei einem Teil der Mäusepopulation. So besitzen manche Labormausstämme zwei Reningene, Ren-1d und Ren-2, wohingegen andere Stämme lediglich ein Reningen, das Ren-1c, aufweisen. Die Existenz des zweiten reninkodierenden Gens wurde zunächst durch Duplikation des einen genuinen Reningens vor etwa 3 Millionen Jahren zu erklären versucht (Dickinson et al., 1984; Castrop et al., 2010). Da aber ältere Mausspezies beide Reningene aufzuweisen scheinen, wird auch eine Deletion des ursprünglichen zweiten Gens diskutiert (Holm et al., 1984; Morris, 1992). Die funktionelle Bedeutung der Existenz beider Genloci ist noch unklar. Das Genprodukt des Ren-2-Gens wird hauptsächlich in der Glandula submandibularis exprimiert. Es weist keine Glykosylierungen auf und wird deshalb konstitutiv sezerniert. Die Plasmapreninkonzentrationen unterscheiden sich allerdings nicht in Abhängigkeit der Existenz eines zweiten reninexprimierenden Genlocus (Dzau et al., 1988; Castrop et al., 2010).

Die Aspartyl-Protease Renin spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des RAAS. Vornehmlich in den juxtaglomerulären Zellen, die sich in der Wand der afferenten Arteriole am Eingang in den glomerulären Kapillarknäuel befinden, wird Renin als Pre-Pro-Renin gebildet, welches zunächst unter Abspaltung eines Signalpeptids in die Zisternen des endoplasmatischen Retikulums transportiert wird. Das hierdurch gebildete Pro-Renin – ein Polypeptid mit 43 kDa – gelangt zur weiteren

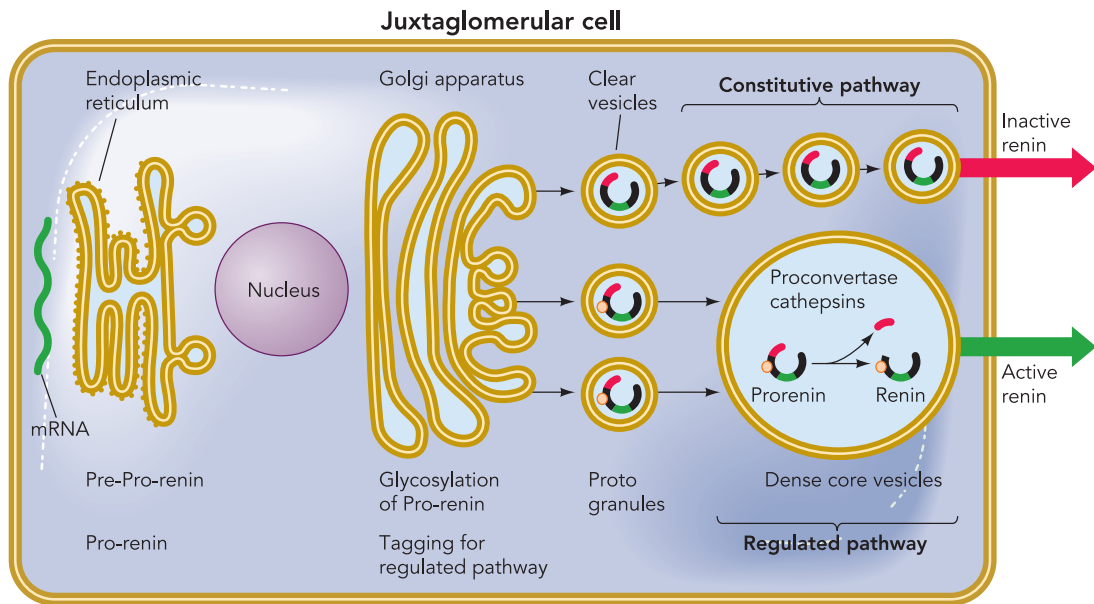


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Reninsynthese und -sekretion. Abbildung nach Schweda et al. (2007).

Modifizierung und zur Verpackung in sekretorische Vesikel in den Golgi-Apparat. Das Pro-Renin wird entweder als inaktives Renin mittels kleiner Vesikel konstitutiv sezerniert oder der regulierten Exozytose als aktives Renin⁴ zugeführt (Morris, 1992; Schweda et al., 2007).

Sezerniertes Renin findet sich im Blutplasma sowohl in seiner aktiven als auch zu einem relativ großen Anteil in seiner inaktiven Form (Sealey et al., 1983). Die Sekretion von aktivem Renin erfolgt durch reife sekretorische Granula, wohingegen die Sekretion von inaktivem Renin, das eine verkürzte Version des aktiven Prorenins darstellt (Hirose et al., 1985), durch Exozytose unreiferer Granula vermittelt wird. Renin-Granula können als modifizierte Lysosomen aufgefasst werden (Taugner et al., 1987). Lysosomale Enzyme, sekretorische Proteine und Plasmamembran-Proteine werden im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Nach Abspaltung eines Signalpeptids wird eine kotranslationale Glykosylierung vermittelt, im Anschluss an Translokation und Transport zum Golgi-Apparat erfährt die Mischung aus lysosomalen Enzymen und sekretorischen Proteinen eine Vielzahl post-

⁴Renin ist ein aus 340 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit einem Molekulgewicht von 38 kDa (Morris, 1992).

translationaler Modifikationen (Faust et al., 1987; Chao et al., 1990; Bader and Ganten, 2000). Die Glykosylierung von Renin ist notwendig für die Verpackung des Renins in dichte sekretorische Vesikel (dense core vesicles). Darüber hinaus spielt die Glykosylierung eine wichtige Rolle bei der durch Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren vermittelten Aufnahme von Renin oder Prorenin in andere Gewebe. Im sauren Milieu der sekretorischen Granula erfolgt unter Abspaltung eines aus 43 Aminosäuren bestehenden N-terminalen Propeptids durch Proteasen die Aktivierung von Prorenin zu Renin. Nur etwa 25 % des synthetisierten Renins werden über Granula der regulierten Sekretion zugeführt, 75 % hingegen konstitutiv als Prorenin sezerniert. Ein wichtiger Schritt für die Initiierung der Exozytose in juxtaglomerulären Zellen scheint das Anschwellen der Renin-Speichergranula zu sein. Die Freisetzung des Renins aus den sekretorischen Vesikeln vollzieht sich in drei Schritten: Zunahme des Vesikelvolumens, Abnahme der Kontraktion des Aktin-Myosin-Komplexes⁵ und Anlagerung der Vesikel an und Fusion mit der Zellmembran (Kurtz and Wagner, 1999; Schweda et al., 2007; Skøtt, 1986; Taugner et al., 1984). Die Sekretion erfolgt gequantelt nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip (Peti-Peterdi et al., 2004; Kurtz and Wagner, 1999).

1.6 Regulation der Reninsynthese und -sekretion

Renin stellt den limitierenden Faktor in der Synthese von Angiotensin II dar. Verschiedene Faktoren auf systemischer und zellulärer Ebene regulieren die Reninsynthese und -sekretion in juxtaglomerulären Zellen (Bader and Ganten, 2000).

1.6.1 Physiologische Regulation

1.6.1.1 Blutdruck

Der stärkste Stimulus für die Sekretion von Renin besteht in der Abnahme des renalen Perfusionsdrucks. Eine Erhöhung des Blutdrucks, nicht des Blutflusses, bewirkt eine Reduktion der Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen,

⁵Eine Zunahme der Kontraktion des Aktin-Myosin-Netzwerks hemmt die Freisetzung von Renin (Kurtz and Wagner, 1999).

vermittelt durch eine steigende intrazelluläre Calcium-Konzentration (Bader and Ganten, 2000).

Die Nieren weisen physiologischerweise einen Mechanismus auf, der auf kleine Blutdruckabfälle mit einer Erhöhung der Renin-Sekretion reagiert. Dieser Vorgang wird über einen drucksensiblen renalen Barorezeptor vermittelt, der sich auf Nephron-ebene im Gefäßsystem der Niere selbst befindet und der Aufrechterhaltung des Blutdrucks dient (Skinner et al., 1964; Bock et al., 1992; Hackenthal et al., 1990). Eine mechanische Dehnung der reninproduzierenden Zellen führt zu einer Reduktion der Reninfreisetzung sowie zu einer verminderten Konzentration an Renin-mRNA als Antwort auf einen erhöhten Perfusionsdruck (Carey et al., 1997; Bader and Ganten, 2000). Dieser Effekt wird auf zellulärer Ebene über einen Second-Messenger-Signalweg vermittelt: Der Dehnungsreiz und die damit verbundene Depolarisation der Zellmembran (Fray, 1976) führen zu einem Einstrom von Calcium in die Zelle. Die nachfolgende Aktivierung der Phospholipase C begünstigt die hydrolytische Spaltung von Inositolbisphosphat (PIP_2) und einen dadurch bedingten zytosolischen Anstieg von Inositoltriphosphat (IP_3). Letzteres führt nach Bindung an Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums zur Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher (Ryan et al., 2000). Der daraus resultierende Anstieg der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration stellt ein inhibitorisches Signal für die Reninfreisetzung aus juxtaglomerulären Zellen dar. Dieser Sachverhalt wird gemeinhin als „Calcium-Paradoxon“ bezeichnet (Scholz et al., 1994). Zugleich führt die Zunahme der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen des juxtaglomerulären Apparates. Auf diese Weise bewirkt ein hoher systemischer Blutdruck eine Vasokonstriktion des Vas afferens. Die vaso-konstriktorische Antwort der glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole ist nicht auf die juxtaglomerulären Zellen beschränkt. Darum ist dies ein möglicher Mechanismus für die Rekrutierung von glatten Muskelzellen zur Synthese von Renin bei niedrigem renalem Perfusionsdruck (Bader and Ganten, 2000).

1.6.1.2 Macula Densa und Salzhaushalt

Die Macula densa scheint von großer Relevanz bei Blutdrücken unterhalb des autoregulatorischen Bereichs zu sein, während im autoregulatorischen Bereich selbst die Funktion der Vasorezeptoren vorherrschend ist (Davis and Freeman, 1976). Zwischen der Macula densa und den granulierten Zellen besteht eine enge anatomische Beziehung (Vander, 1967): Im distalen Tubulus registriert die Macula densa den luminalen Natrium-Chlorid-Gehalt und fungiert auf diese Weise als Mediator zwischen dem distalen Tubulus und den juxtaglomerulären Zellen, indem sie den Tonus und damit den Widerstand der afferenten Arteriole sowie die Reninfreisetzung kontrolliert. Über einen tubuloglomerulären Rückkopplungsmechanismus, der eine inverse Beziehung zwischen der detektierten NaCl-Konzentration und der glomerulären Filtrationsrate darstellt, wird über eine Vasodilatation der Arteriola afferens und eine Stimulation der Reninfreisetzung Einfluss auf die renale Salzausscheidung genommen und damit der Salzhaushalt des Körpers stabilisiert (Schnermann, 1998; Bader and Ganten, 2000).

Die orale Salzzufuhr stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus der Aktivität des RAAS dar (Castrop et al., 2010). Untersuchungen von Holmer et al. (1993) belegen eine negative Korrelation zwischen der dietätisch aufgenommenen NaCl-Menge und der Reninsekretion sowie der mRNA-Konzentration (Holmer et al., 1993), insbesondere wirkt ein Abfall der lokalen NaCl-Konzentration an der Macula densa stimulatorisch auf die Reninproduktion (Skøtt and Briggs, 1987; Davis and Freeman, 1976).

1.6.1.3 Das sympathische Nervensystem

Wenngleich die beiden oben erwähnten Mechanismen vorrangig in der Regulation der Reninsekretion sind, spielt auch die nervale Versorgung der Niere bei der Regulation der Reninsekretion eine Rolle: Taquini et al. (1964) beschrieben eine Verringerung des Reningehalts an denervierten Rattennieren, und wie Untersuchungen von Tobian et al. (1965) belegen, ging eine deutliche Reduktion der Anzahl der Granula der juxtaglomerulären Zellen damit einher. Eine direkte elektrische Stimulation renaler Nervenendigungen hingegen führte zu einem Anstieg der Reninfrei-

setzung (Vander, 1967).

Das sympathische Nervensystem führt über verschiedene Effekte zu einer differenzierten Regulation der Nierenfunktion, indem es Einfluss auf Blutgefäße, Nierentubuli und juxtaglomeruläre Zellen nimmt. Dies ermöglicht eine optimale Flexibilität in der Koordination der physiologischen Antwort auf eine Vielzahl homöostatischer Anforderungen (DiBona, 2000).

Sympathische Nervenendigungen wurden in direkter Nachbarschaft zu den juxtaglomerulären Zellen entdeckt (Bader and Ganten, 2000; Law and Summers, 1987), die Sympathikusaktivität wird über β_1 -Rezeptoren der juxtaglomerulären Zellen vermittelt. Entsprechend führt eine renale Denervation zu einer Verminderung der Reninproduktion und -sekretion (Zhang et al., 1992; Churchill et al., 1983; Wagner and Kurtz, 1998). Die Stimulation der β -Adrenozeptoren durch systemische oder lokal sezernierte Katecholamine bewirkt die Aktivierung einer Adenylylzyklase. Hierdurch steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration an und führt in der Folge zu einer Förderung von Reninsynthese und -sekretion. Dieser Signalweg ist einer der am besten dokumentierten Mechanismen in der Regulation der Reninsynthese (Bader and Ganten, 2000). Wie Osborn et al. (1981) und Holmer et al. (1997) aufzeigen, stellt die neuronale Aktivierung von β_1 -Adrenozeptoren einen starken Stimulus für die Expression und die Freisetzung von Renin dar. Allerdings ist der Einflussbereich beschränkt auf die Umgebung der juxtaglomerulären Zellen. Eine Wirkung auf glatte Muskelzellen oder andere Teile der afferenten Arteriole wird nicht erzielt (Bader and Ganten, 2000; Kurtz and Wagner, 1999).

Das sympathische Nervensystem stellt somit eine Art tonischer Stimulator für die Reninsekretion und die mRNA-Expression dar. Im Normalfall wird dieser Effekt allerdings durch die inhibitorische Wirkung des renalen Perfusionsdrucks auf das Reninsystem maskiert. Damit ist die Aktivität renaler Nerven zwar eine wichtige Determinante der Reninstimulation, deren Bedeutung aber insbesondere bei reduziertem arteriellen Blutdruck in der Niere zum Tragen kommt (Wagner et al., 1999).

1.6.1.4 Angiotensin II

Angiotensin II nimmt über seine bereits erwähnten physiologischen Effekte Einfluss auf Blutdruck und Salzhaushalt und damit auch indirekt auf die Reninsekretion. Steigende Plasmakonzentrationen von Angiotensin II verringern über einen negativen Feedback-Mechanismus die weitere Reninfreisetzung (Davis and Freeman, 1976). Untersuchungen von Vandongen et al. (1974) gaben Hinweise auf eine Suppression der Reninfreisetzung durch die Gabe von Angiotensin II. Die direkte intravenöse Infusion von Angiotensin II bewirkte bei Versuchen mit Ratten eine Suppression der Plasma-Renin-Konzentration und führte zu einem signifikanten Anstieg des arteriellen Mitteldrucks (Schunkert et al., 1992). Weitere Forschungsergebnisse zeigen eine Steigerung der Reninexpressionsrate nach pharmakologischer Behandlung von Ratten mit AT_1 -Rezeptor-Blockern (Candesartan) oder der Verabreichung von ACE-Hemmern (Captopril) an menschlichen Probanden (Höcherl et al., 2001; Oates et al., 1974; Kono et al., 1981). Der entscheidende Mechanismus für die Kontrolle des Blutdrucks durch das RAAS besteht dabei in der Regulation der Natrium-Exkretion durch die Niere (Crowley et al., 2005).

Wie die Untersuchungsergebnisse von Oliverio et al. (1998) nahelegen, stellt der AT_{1A} -Rezeptor keine Notwendigkeit für Entwicklung einer normalen Niere dar. Allerdings ist das Fehlen dieses Rezeptors mit einem signifikant niedrigeren Blutdruck sowie einer Hypertrophie des juxtaglomerulären Apparates assoziiert. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme von Renin-produzierenden Zellen entlang des proximalen Vas afferens sowie der Interlobararterien im Sinne einer Rekrutierung reninbildender Zellen (Oliverio et al., 1998).

1.6.2 Humorale Regulation

Neben diesen klassischen Faktoren der Reninregulation nehmen auch eine Reihe humoraler und lokal sezernierter Faktoren Einfluss auf die Synthese und Sekretion von Renin. Die Stimulation der Expression des Reningens und die Reninsekretion erfolgen unter anderem durch Adrenomedullin, Arachidonsäure, Bradykinin, Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Dopamin, Histamin, NO, Prostaglandin PGE_2 , Prostazyklin (PGI_2), außerdem durch Thyroxin, Triiodthyronin

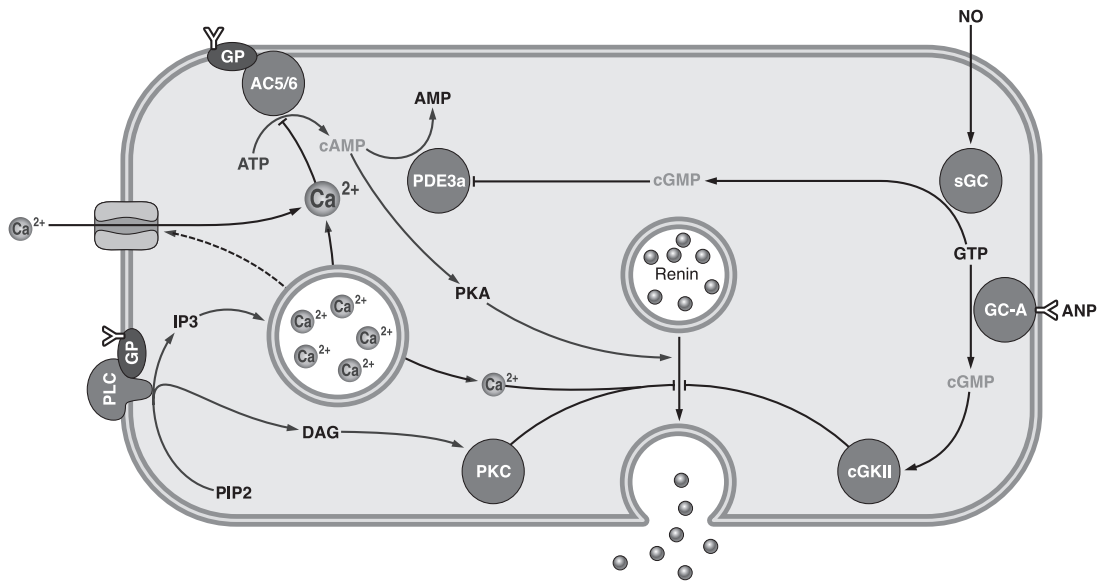


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege. Abbildung nach Castrop et al. (2010).

und vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP). Eine hemmende Wirkung auf das Reninsystem hingegen besitzen Adenosin, das antidiuretische Hormon (ADH, Vasopressin), das atriale natriuretische Peptid (ANP), Cyclooxygenase-Inhibitoren, Endothelin, Interleukin-1 und -6, der Platelet-Activating Factor (PAF) sowie Tumornekrosefaktoren ($TGF-\alpha$, $TGF-\beta$). Darüber hinaus interagiert das Kallikrein-Kinin-System sowohl in funktioneller als auch in biochemischer Hinsicht mit dem RAAS. Die Effektor-Peptide beider Systeme, Bradykinin und Angiotensin II, besitzen antagonistische Effekte auf Gefäßwiderstand, Blutdruck und Nierenfunktion. Das Angiotensin Converting Enzyme, das die Bildung von Angiotensin II katalysiert, ist identisch mit der Kininase II, welche ihrerseits Bradykinin inaktiviert (Castrop et al., 2010; Davis and Freeman, 1976; Kageyama and Brown, 1990; Keeton and Campbell, 1980; Kurtz et al., 1986, 1988; Kurtz, 1989; Petrovic et al., 1997; Pfeilschifter et al., 1985; Pietri et al., 2002; Scholz et al., 1995; Todorov et al., 2002).

1.6.3 Faktoren der zellulären Regulation

Ein Überblick über die intrazellulären Signalwege findet sich in Abbildung 1.6.

1.6.3.1 Der cAMP-Signalweg

Es besteht eine enge Verbindung zwischen der intrazellulären cAMP-Konzentration und der Reninsekretion (Hackenthal et al., 1990). Die Aktivierung des cAMP-Signalwegs über eine Stimulation der Adenylylzyklase durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Reninsynthese und -freisetzung (Chen et al., 2007; Neubauer et al., 2009): Die Bindung von Liganden an eine G_s-gekoppelte Untereinheit des β_1 -Adrenozeptors führt zu einer Aktivierung der Adenylylzyklase und in der Folge zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Hackenthal et al., 1990; Lalli et al., 1994). cAMP bewirkt in den juxtaglomerulären Zellen eine starke und schnelle Aktivierung der Transkription des Reningens und der Reninsekretion (Della Bruna et al., 1993). Die DNA enthält sogenannte cAMP-responsive Elemente (CRE). Die Aktivierung der Proteinkinase A katalysiert die Phosphorylierung eines CREB (CRE binding protein = cAMP-responsive element binding protein). Dieser Schritt ist notwendig für die Aktivierung der Transkription (Lalli et al., 1994): Der Transkriptionsfaktor CREB bindet an das DNA-Motiv Ren-1c-CRE, welches dabei mit dem Transkriptionsfaktor CREB nach Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren zur Ausbildung von DNA-Protein-Komplexen führt (Pan et al., 2001). Auf diese Weise aktiviert cAMP über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB die Transkription des Reningens in juxtaglomerulären Zellen (Klar et al., 2002). Endotheline sind in der Lage, die cAMP-stimulierte Expression des Renin-Gens via ET_B-Rezeptoren zu inhibieren (Ritthaler et al., 1995).

Die Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration stellt deshalb ein wichtiges stimulatorisches Signal für die Freisetzung von Renin dar. Auf diese Weise bewirken auch Inhibitoren der cAMP-Phosphodiesterase eine Stimulation der Reninsekretion (Hackenthal et al., 1990).

1.6.3.2 Der cGMP-Signalweg

Zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) kann stimulatorische, inhibitorische oder biphasische Effekte auf die Reninsekretion haben (Schrickler and Kurtz, 1993; Noble et al., 1994; He et al., 1995; Greenberg et al., 1995; Gambaryan et al., 1996).

Die stimulatorischen und inhibitorischen Signalwege von cGMP sind wahrscheinlich räumlich voneinander getrennt (Castrop et al., 2010).

Einerseits ist cGMP in der Lage, die Reninsekretion zu stimulieren: Die Hydrolyse von cAMP durch die in der renalen Arteriola afferens relativ stark exprimierte cAMP-Phosphodiesterase 3 (PDE-3) wird durch cGMP inhibiert (Beavo et al., 1995; Sandner et al., 1999). Der daraus resultierende cAMP-Anstieg fungiert als endogener Stimulus auf die Reninsekretion (Beierwaltes, 2006; Friis et al., 2002). Auf diese Weise erhöht cGMP die intrazelluläre Konzentration von cAMP in den juxtaglomerulären Zellen. Die damit einhergehende gesteigerte Adenylatzyklaseaktivität stimuliert die Reninfreisetzung.

Andererseits sind cGMP-basierte regulatorische Systeme entscheidend, um dem RAAS entgegenzuwirken (Gambaryan et al., 1996). Die Reninfreisetzung korreliert invers mit der intrazellulären Konzentration an cGMP. Auf diese Weise vermittelt cGMP einen inhibitorischen Effekt auf die Reninsekretion, lässt die intrazelluläre Calcium-Konzentration dabei aber unbeeinflusst (Kurtz, 1989). Eine zentrale Rolle spielt hierbei Typ II der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGKII). Die cGKII findet sich unter anderem in den juxtaglomerulären Zellen der Niere, lokalisiert in den Reninspeichergranula und an der Zellmembran. Der Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker Losartan, ein indirekter Aktivator der Reninexpression, erhöht die Konzentration an Renin und cGKII in juxtaglomerulären Zellen. Dies legt eine Beteiligung von cGKII an der Freisetzung von Renin nahe (Gambaryan et al., 1996). Hohe Konzentrationen von cGMP vermögen die cGKII zu aktivieren, welche prinzipiell die Stimulation der Reninfreisetzung hemmen kann. Deshalb supprimieren hohe Konzentrationen von cGMP die Reninsekretion (Castrop et al., 2010). Auf diese Weise wirkt cGKII als natürlicher Antagonist zum cAMP in der Regulation der Reninsekretion in juxtaglomerulären Zellen (Kurtz and Wagner, 1999).

Zyklisches Guanosin-Monophosphat scheint eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus zu spielen. Es vermittelt die vasorelaxierende Wirkung verschiedener pharmakologischer sowie physiologischer Agonisten (NO) der Guanylatzyklase. Im Hinblick auf die enge Verbindung zwischen Vasorelaxation und Reninfreisetzung ist cGMP als möglicher intrazellulärer Botenstoff an der Kontrolle der Reninsekretion beteiligt (Hackenthal et al., 1990).

Insofern übt cGMP eine zweifache Kontrolle der Reninsekretion aus: Es besitzt eine inhibitorische Wirkung mittels cGKII und vermittelt eine stimulatorische Wirkung über cAMP (Kurtz and Wagner, 1999).

1.6.3.3 Intrazelluläres Calcium und Proteinkinase C

Es ist allgemein bekannt, dass Calcium die exozytotische Freisetzung von Enzymen, Hormonen und Neurotransmittern stimuliert. Die Sekretion von Renin allerdings wird durch intrazelluläres Calcium supprimiert (Hano et al., 1990). Die Reninsekretion verhält sich in dieser Hinsicht gerade gegensätzlich zu typischen Sekretionsmechanismen, welche positiv mit der intrazellulären Calcium-Konzentration korrelieren. Diese Eigentümlichkeit der Reninfreisetzung wird als „Calcium-Paradoxon“ bezeichnet (Kurtz, 1989).

Die juxtaglomerulären Zellen enthalten intrazelluläre Calcium-Speicher, die durch Rezeptor-vermittelte oder G-Protein-gekoppelte Aktivierung der Phospholipase C mobilisiert werden können (Kurtz, 1989). Eine intrazelluläre Zunahme der Konzentration an freiem Calcium ist mit einer Inhibition der Reninsekretion assoziiert. Das dazu benötigte Calcium strömt entweder über spannungs- oder rezeptorgekoppelte Calcium-Kanäle von extrazellulär ein, oder es erfolgt eine Freisetzung aus intrazellulären Calcium-Speichern durch Aktivierung des IP_3 -Signalweges: Die Phospholipase C, eine membranständige Phosphodiesterase, vermittelt die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 vermittelt die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, woraus ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration resultiert. DAG aktiviert die membranständige Phospholipid-abhängige Proteinkinase C. Hierdurch wird der sekretorische Stimulus inhibiert. Der transmembranäre Einstrom von Calcium nach Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle vermag die Sekretion zusätzlich zu reduzieren (Kurtz, 1989; Hackenthal et al., 1990; Churchill, 1985). Für den Einfluss von Endothelinen auf die Reninsekretion spielt der IP_3 -Signalweg eine besondere Rolle.

Bei der Vermittlung der Calcium-Wirkung kommt Calmodulin eine bedeutende Rolle zu (Means and Dedman, 1980). Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wird

durch die Aktivierung der Proteinkinase C aufrechterhalten. Calmodulin und Proteinkinase C nehmen auf diese Weise inhibitorischen Einfluss auf die Reninfreisetzung (Hano et al., 1990). Die cAMP-vermittelte Wirkung ist dabei unabhängig vom Calcium-Calmodulin-System (Antonipillai and Horton, 1985).

Der supprimierende Effekt von Calcium auf die Renin-Freisetzung wird durch Hemmung der Adenylylzyklase-Isoformen AC5 und AC6 in juxtaglomerulären Zellen vermittelt: Diese werden durch Calcium inhibiert, weshalb eine verringerte intrazelluläre Calcium-Konzentration die Inhibition der Adenylylzyklasen reduziert, woraus die Synthese von cAMP und in der Folge die Freisetzung von Renin resultiert. Dies liefert eine Erklärung für das Calcium-Paradoxon (Grünberger et al., 2006; Ortiz-Capisano et al., 2007).

1.7 Endotheline

1.7.1 Überblick

Die Familie der Endotheline besteht aus den drei Isopeptiden ET-1, ET-2 und ET-3 (Vignon-Zellweger et al., 2012). Die ersten Hinweise auf die Existenz von Endothelinen als Endothel-assoziierte Vasokonstriktoren stammen aus frühen Studien von Hickey et al. (1985) an kultivierten Endothelzellen. Yanagisawa et al. (1988) gelang die Isolierung des Peptids. Entsprechend seiner Herkunft aus dem Gefäßendothel bezeichneten sie es als „Endothelin“. Seit der Entdeckung des Endothelins ET-1 im Jahre 1988 gab es über 20 000 Publikationen zu diesem Themenkomplex. Es gilt als erwiesen, dass ET-1 an praktisch jedem Aspekt der Blutdruckregulation und des Salz-Haushalts beteiligt ist. Der Fokus des Großteils der Studien liegt auf Endothelin-1 (Kohan et al., 2011), welches die in vivo vorherrschende Isoform darstellt und als para- und autokrines Hormon wirkt (Vignon-Zellweger et al., 2012).

1.7.2 Endothelinsynthese

Alle drei aktiven Endotheline bestehen aus 21 Aminosäuren (siehe Abbildung 1.7). Das menschliche ET-1-Gen liegt auf Chromosom 6 und besteht aus 6838 bp. Die ET-1-mRNA kodiert für ein biologisch inaktives Preproendothelin-1 (PPET1), das

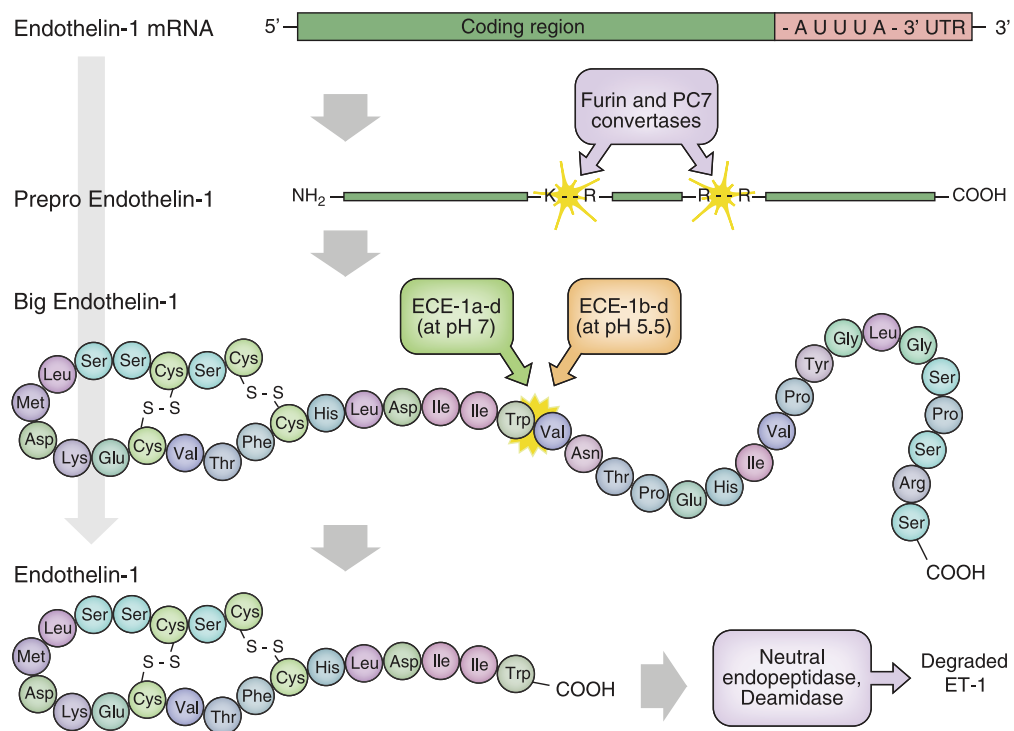


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Endothelinsynthese. Nach Kohan et al. (2011).

beim Menschen aus 212 und bei der Maus aus 202 Aminosäuren besteht (Vignon-Zellweger et al., 2012). Durch Abspaltung eines Signalpeptids entsteht Pro-ET-1, welches mittels Endopeptidasen in ein aus 38 Aminosäuren bestehendes, biologisch ebenfalls inaktives Big ET-1 gespalten wird (Denault et al., 1995). In Endothelzellen erfolgt diese Umwandlung durch Furin-Konvertasen. Die physiologisch relevante Proteolyse von Big ET-1 zu ET-1 wird mittels sogenannter Endothelin-Converting Enzymes (ECE-1, -2, -3) vollzogen (Xu et al., 1994; Emoto and Yanagisawa, 1995). Verschiedene Isoformen des ECE-1 ermöglichen die Spaltung von Big ET-1 in aktives ET-1 sowohl intra- als auch extrazellulär (Kohan et al., 2011; D'Orleans-Juste et al., 2003). Die Aminosäuresequenz von ET-1 ist bei Mensch und Maus identisch (Vignon-Zellweger et al., 2012).

1.7.3 Endothelinrezeptoren

Es gibt zwei Typen von Endothelin-Rezeptoren, ET_A und ET_B (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Bei Säugetieren kodieren zwei Gene für diese beiden Rezeptoren: Das Gen für den menschlichen ET_A -Rezeptor ist auf Chromosom 4 lokalisiert, das für den ET_B -Rezeptor auf Chromosom 13. Der ET_A -Rezeptor besitzt die höchste Affinität für ET-1, der ET_B -Rezeptor bindet alle Endotheline mit gleicher Affinität (Vignon-Zellweger et al., 2012). ET-1 weist beiden Rezeptoren gegenüber dieselbe Affinität auf (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Obwohl nahezu jede Körperzelle Endothelin-Rezeptoren exprimiert, ist ET_A vornehmlich auf glatten Gefäßmuskelzellen und Myozyten zu finden, während ET_B hauptsächlich auf Endothelzellen und renalen Tubuluszellen vorkommt. Nach Aktivierung beider Rezeptortypen werden die intrazellulären Signalwege G-Protein-gekoppelt vermittelt und führen zur Stimulation der Phospholipase C. Die nachfolgende Produktion von Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) erhöht die intrazelluläre Calcium-Konzentration über die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum und den Calcium-Einstrom über membranständige Calcium-Kanäle (Simonson and Dunn, 1990). Daran schließt sich nach Aktivierung von Adenylatzyklen, Cyclooxygenasen (COX) oder NO-Synthasen (NOS) eine Vielzahl von Signalkaskaden an (Kohan et al., 2011).

ET_A und ET_B können synergistische oder antagonistische Wirkungen vermitteln, in Abhängigkeit von Zelltyp, Gewebetyp und physiologischer Situation. Die Bindung von ET-1 an seine Rezeptoren, vor allem an ET_A , zieht lang andauernde biologische Effekte nach sich. Einerseits ist das auf eine nahezu irreversible Bindung des Peptids an den Rezeptor zurückzuführen, andererseits bleibt die Bindung von ET-1 an ET_A auch nach Endozytose des Rezeptors erhalten. ET_B -Rezeptoren sind vornehmlich für die Beseitigung des zirkulierenden ET-1 verantwortlich, welche hauptsächlich in der Lunge, der Leber und in den Nieren erfolgt (Johnström et al., 2005). Nach Aktivierung wird der ET_B -Rezeptor internalisiert und den Lysosomen zugeführt (Bremnes et al., 2000). Die Plasmakonzentration von Endothelin ist gering und besitzt physiologischerweise vermutlich keinen systemischen Einfluss auf die Zellfunktion. Die lokalen Endothelin-Konzentrationen im Gewebe hingegen

sind um ein Vielfaches höher und physiologisch relevant. Die meisten polarisierten Zellen sezernieren Endotheline auf ihrer basolateralen Seite. Auf Epithelzellen sind auch die Endothelin-Rezeptoren primär auf der basolateralen Seite lokalisiert, wodurch eine autokrine und parakrine Regulation ermöglicht wird. Deshalb sollten Endotheline als autokrine und parakrine Regulatoren der Zellfunktion und nicht als endokrine Faktoren angesehen werden. Mit diesem Konzept lässt sich die Vielzahl häufig entgegengesetzter Wirkungen der Endotheline erklären (Kohan et al., 2011).

Endothelinrezeptoren können als Homo- und Heterodimere (ET_A/ET_A , ET_A/ET_B , ET_B/ET_B) vorliegen, worauf die Komplexität der ET-1-vermittelten Wirkungen beruhen könnte (Evans and Walker, 2008). Antagonisten der Endothelinrezeptoren sind Peptide mit hoher Rezeptorselektivität. Nach Watts (2010) existieren für beide Rezeptortypen spezifische Antagonisten, etwa der ET_A -Antagonist BQ-123 oder der ET_B -Antagonist BQ-788 (Ishikawa et al., 1994). Bei Bosentan handelt es sich um einen kombinierten ET_A/ET_B -Rezeptor-Blocker (Iglarz et al., 2008). Die Rezeptor-Selektivität dieser Substanzen resultiert aus in-vitro-Experimenten, die Bestätigung ihrer Spezifität in vivo ist ausstehend (Kohan et al., 2011).

1.7.4 Endothelinwirkung auf das Gefäßsystem

Im Gefäßsystem werden ET_A -Rezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, ET_B -Rezeptoren zusätzlich auf Endothelzellen. Die Anzahl der ET_B -Rezeptoren im Gefäßsystem übersteigt die der ET_A -Rezeptoren (Kohan et al., 2011). Allerdings weist jedes Gefäßbett eine unterschiedliche Verteilung der Rezeptoren auf, wodurch die jeweilige Antwort auf ET-1 moduliert wird (Calo et al., 1996).

Das von den Endothelzellen produzierte ET-1 wird größtenteils basolateral sezerniert und bindet auf parakrinem Wege sowohl an ET_A - als auch an ET_B -Rezeptoren der glatten Muskelzellen (Wagner et al., 1992). Die Bindung von ET-1 an den ET_A -Rezeptor zieht eine Vasokonstriktion nach sich (Curtis and Scholfield, 2001; Pernow and Modin, 1993). Die Bindung an ET_B -Rezeptoren hingegen bewirkt einen vasorelaxierenden Effekt: ET-1 aktiviert ET_B -Rezeptoren auf Endothelzellen, woraus eine Stimulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und die konsekutive

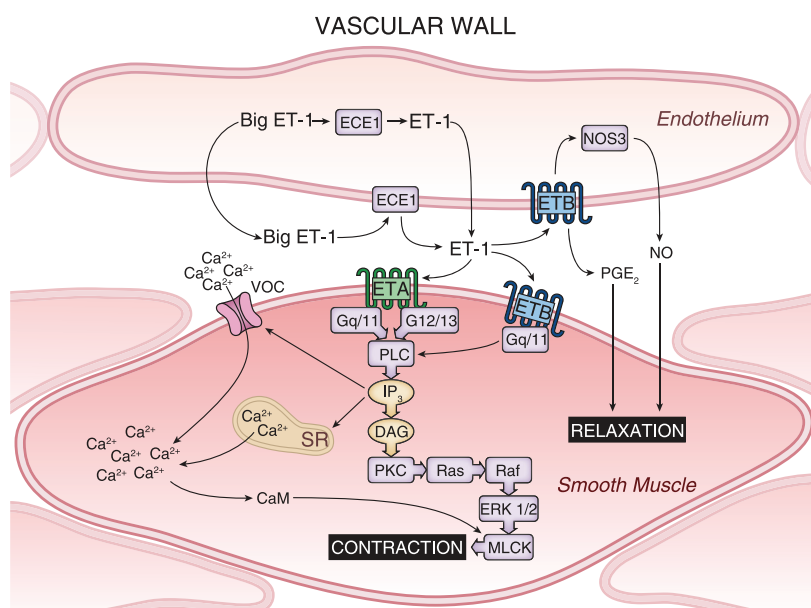


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der ET-1-Expression und der ET-1-vermittelten Wirkung auf die Gefäßwand. Abbildung nach Kohan et al. (2011).

Freisetzung von NO resultiert. NO vermittelt über die Reduktion der intrazellulären Calcium-Konzentration eine Vasodilatation (Kohan et al., 2011; Vignon-Zellweger et al., 2012). Eine selektive Blockade von ET_A -Rezeptoren verstärkt die NO-vermittelte Vasodilatation (Verhaar et al., 1998; Prié et al., 1998; Barton et al., 1998), wohingegen eine Blockade von ET_B -Rezeptoren zu einer Vasokonstriktion führt (Verhaar et al., 1998). Genetisch bedingter Mangel an ET-1 führte bei Mäusen zu einem geringgradig höheren Blutdruck (Kurihara et al., 1994).

Im renalen Gefäßbett ruft ET-1 eine vergleichsweise starke Vasokonstriktion hervor. Die physiologisch bedeutendere Rolle von ET-1 besteht aber in der ET_B -vermittelten Vasodilatation. ET-1-induzierte Vasokonstriktion dauert auch nach Entfernung des Liganden an (Clozel and Clozel, 1989), während der vasodilatatorische Einfluss vorübergehend ist. Ein Hauptmechanismus für die endothelinvermittelte renale Vasokonstriktion ist die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration in glatten Muskelzellen, über welche der prä- und postglomeruläre Gefäßwiderstand reguliert wird (Kohan et al., 2011).

1.7.5 Endothelinwirkung auf die Niere

1.7.5.1 Überblick

Erste Studien nach Entdeckung von ET-1 zeigten, dass das Endothelinsystem von besonderer Bedeutung für die Niere ist. Das innere Mark der Niere besitzt die mit Abstand größte Konzentration an ET-1 im Körper (Kitamura et al., 1989). Jeder Zelltyp der Niere weist Endothelin-Rezeptoren auf, nahezu jede Zelle der Niere synthetisiert ET-1. Die Niere besitzt Endothelin-Rezeptoren insbesondere in den Gefäßen und im Mark. Darum ist es wenig überraschend, dass das Endothelin-System in der Lage ist, die Nierenfunktion und zahlreiche funktionelle Parameter der Niere zu regulieren. Es ist erwiesen, dass das Endothelinsystem den Blutfluss, die glomeruläre Filtrationsrate, die Salz- und Wasserausscheidung, den Säure-Base-Haushalt, den Medikamenten-Transport, die Zellproliferation, die Akkumulation extrazellulärer Matrix, Entzündungsvorgänge und andere Funktionen moduliert (Kohan et al., 2011).

In ausreichender Dosis exogen verabreichtes ET-1 bewirkt eine Reduktion von renalem Blutfluss und glomerulärer Filtrationsrate. Die systemische Gabe von ET-1 führt zu einer gesteigerten Wasserausscheidung mit dem Urin. Veränderungen der renalen Endothelin-Konzentration oder der ET-1-Ausscheidung mit dem Urin können als Antwort auf Veränderungen im Volumen-Haushalt gemessen werden. Nach gesteigerter Natrium-Aufnahme zeigte ein Großteil der durchgeführten Studien eine verstärkte ET-1-Ausscheidung mit dem Urin. Dies lässt darauf schließen, dass eine Volumenzunahme mit einer gesteigerten renalen ET-1-Produktion assoziiert ist. Auf diese Weise scheint ET-1 einen natriuretischen Effekt zu besitzen (Kohan et al., 2011).

1.7.5.2 Renales Gefäßsystem

Wendel et al. (2006) untersuchten die Lokalisation der Endothelin-Rezeptoren im Gefäß- und Tubulussystem von Rattennieren: Im Gefäßsystem werden ET_A- und ET_B-Rezeptoren in der Media der Interlobulararterien sowie der afferenten und efferenten Arteriolen exprimiert. Auf glatten Muskelzellen der Aa. interlobares et

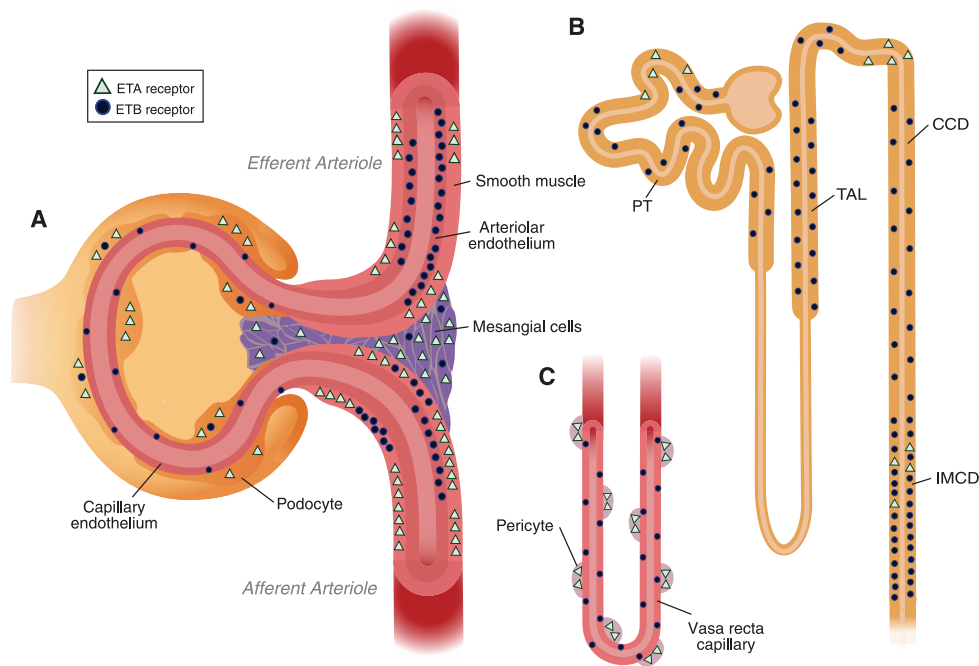


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Verteilung der Endothelin-Rezeptoren im Glomerulus, im renalen Gefäßsystem und im Tubulussystem. Abbildung nach Kohan et al. (2011).

arcuatae sind nur ET_A -Rezeptoren nachzuweisen. Wenngleich der Nachweis von ET_B -Rezeptoren auf Endothelzellen renaler Arterien nur spärlich gelingt, können ET_B -Rezeptoren vor allem peritubulär, auf glomerulären Kapillaren sowie in den Vasa recta nachgewiesen werden. Daneben sind ET_B -Rezeptoren auf Epithelzellen des proximalen Tubulus und im Sammelrohr des inneren Marks lokalisiert. ET_A -Rezeptoren können auf Mesangialzellen und Perizyten, im distalen Tubulus sowie im kortikalen Sammelrohr nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass beide Rezeptortypen im renalen Kortex eine Vasokonstriktion vermitteln, obgleich sie im Nierenmark partiell antagonistische Effekte aufweisen (Wendel et al., 2006). Die renale Lokalisation der beiden Rezeptor-Subtypen ist in Abbildung 1.9 dargestellt. Die Expression der Endothelin-Rezeptoren wird von physiologischen Veränderungen beeinflusst. So wiesen etwa Schneider et al. (2007) nach, dass chronische Salzzufuhr zu einer verstärkten ET_B -Expression führt, wohingegen die ET_A -Expression unverändert bleibt. Im renalen Gefäßsystem produzieren

Endothelzellen der Aa. interlobulares und der Aa. arcuatae Endotheline. Die Freisetzung von ET-1 erfolgt im Allgemeinen rasch nach der Bildung von Prepro-ET-1 und Spaltung durch ECE-1, weshalb die sekretorischen Zellen keine Speicherorte für aktives ET-1 besitzen. Entzündungen, oxidativer Stress und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems begünstigen die renale ET-1-Produktion (Kohan et al., 2011).

Die Beziehung zwischen Endothelin und der hämodynamischen Regulation der Niere ist komplex. Die Freisetzung von Endothelinen vermag eine kräftige und andauernde Vasokonstriktion nach sich zu ziehen und dient auf diese Weise der Regulation des glomerulären Filtrationsdrucks. ET-1 verringert die Filtrationsrate (Vuurmans et al., 2004) und vermittelt, hauptsächlich über ET_A -Rezeptoren, eine Reduktion des renalen Blutflusses (Evans et al., 2001). ET_B -Rezeptoren auf Endothelzellen wirken diesem Effekt entgegen und vermitteln über die Aktivierung der eNOS und der Freisetzung von Prostaglandinen eine Vasodilatation (Matsuura et al., 1997). Untersuchungen von Denton et al. (2004) zeigen, dass ET-1 zwar den Durchmesser der juxtaglomerulären Arteriole reduziert, dies aber keine Reduktion des medullären Blutflusses nach sich zieht. Aktuell besteht Einigkeit darüber, dass ET_A - und ET_B -Rezeptoren auf kortikale afferente Arteriolen eine vasokonstriktorische Wirkung besitzen, ET_B -Rezeptoren auf efferente Arteriolen eine eher vasodilatatorische (Vignon-Zellweger et al., 2012).

Studien von Pollock and Opgenorth (1993, 1994) weisen darauf hin, dass die Vasokonstriktion der afferenten Arteriole die Aktivierung von ET_A - und ET_B -Rezeptoren widerspiegelt. Eine ET_A -Blockade schwächt diesen Effekt ab, eine Blockade beider Rezeptor-Subtypen verhindert ihn komplett. Auch an der Vasokonstriktion der efferenten Arteriole sind beide Rezeptortypen beteiligt, ihr Zusammenspiel aber ist komplizierter. So bewirkt etwa die ET_A -Blockade bei geringer ET-1-Konzentration unter 100 pM eine moderate Vasodilatation, wohingegen ET-1-Konzentrationen über 1 nM eine Vasokonstriktion hervorrufen. Die Ergebnisse legen nahe, dass der vasodilatatorische ET_B -Rezeptor auf dem Gefäßendothel eine dominantere Rolle für die efferente Arteriole spielt und die ET_B -abhängige Vasokonstriktion erst bei höherer Konzentration der Agonisten hervorgerufen wird. Damit scheint der ET_B -Rezeptor einen vasodilatatorischen Einfluss auf die efferente

rente Arteriole auszuüben, aber als Vasokonstriktor auf die afferente Arteriole zu fungieren. Eine Hochsalz-Diät schwächt über eine Zunahme der präglomerulären ET_B -Rezeptoren eine afferente Vasokonstriktion ab (Kohan et al., 2011). Eine ET_A -Blockade kann den ET-1-vermittelten Abfall von renalem Blutfluss und glomerulärer Filtrationsrate komplett unterbinden (Pollock and Opgenorth, 1993, 1994). Auf systemische oder intrarenale Infusion von Endothelin reagieren die Nieren einheitlich mit Vasokonstriktion. Untersuchungen von Saito et al. (1994) belegen eine stärkere präglomeruläre (Vas afferens) Vasokonstriktion als eine postglomeruläre (Vas efferens). Badr et al. (1989) wiesen nach, dass ET-1 den renalen Blutfluss an Rattennieren reduzierte und den Widerstand der afferenten bzw. efferenten Arteriole um 65 % bzw. 82 % ansteigen ließ (Badr et al., 1989). Die Infusion des kombinierten ET_A/ET_B -Antagonisten Bosentan führt zu einer geringen Reduktion des Blutdrucks, einhergehend mit einer starken Abnahme des glomerulären Kapillardrucks (Qiu et al., 1995). Eine selektive ET_A -Blockade zeigte unter gleichen Bedingungen keinen Einfluss auf den arteriellen Blutdruck oder die glomeruläre Hämodynamik. Dies suggeriert, dass endogenes ET-1 einen ET_B -vermittelten vasodilatatorischen Einfluss auf die renale Mikrozirkulation nimmt (Kohan et al., 2011). Die intrarenale Infusion von ET-1 reduziert über eine Aktivierung von ET_A -Rezeptoren die glomeruläre Filtrationsrate und den renalen Blutfluss und erhöht zugleich den Widerstand an afferenter und efferenter Arteriole. Die renale Vasokonstriktion scheint dabei eine Kombination aus der direkten ET-1-Wirkung und indirekten Effekten über andere vasoaktive Mediatoren wie etwa Angiotensin II widerzuspiegeln (Heller et al., 1996; Kohan et al., 2011).

1.7.5.3 Glomerulus, Mesangiumzellen und Podozyten

Endothelin hat verschiedene Auswirkungen auf die glomerulären Zellen. Im Mesangium bewirkt ET-1 eine Kontraktion, Proliferation und Akkumulation von extrazellulärer Matrix (Vignon-Zellweger et al., 2012). Das Endothelin-System vermag die glomeruläre Filtrationsrate durch Modifikation der glomerulären Zellfunktion zu beeinflussen (Kohan et al., 2011), bei Bluthochdruck wurde eine Steigerung der mesangialen ET-1-Produktion beobachtet (Ikeda et al., 1995). Möglicherweise

führt die ET-1-vermittelte mesangiale Kontraktion zu einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate, welche zu einer verminderten renalen Natrium-Ausscheidung beitragen könnte (Kohan et al., 2011).

Glomeruläre Podozyten exprimieren sowohl ET_A- als auch ET_B-Rezeptoren und sind in der Lage, Endotheline zu synthetisieren. Endotheline bewirken unter anderem eine Destabilisierung der Aktinfilamente von Podozyten und nehmen Einfluss auf die Zytoskelett-Remodellierung (Kohan et al., 2011; Vignon-Zellweger et al., 2012).

1.7.5.4 Tubulussystem

Wenngleich in geringerer Menge als weiter distal gelegene Abschnitte des Tubulussystems, synthetisiert auch der proximale Tubulus ET-1 und exprimiert Endothelin-Rezeptoren – wahrscheinlich beide Rezeptortypen, ET_A und ET_B. Die Aktivierung von ET_B-Rezeptoren am proximalen Tubulus vermag den Natrium-Transport sowohl zu stimulieren als auch zu inhibieren (Kohan et al., 2011). Eine Aktivierung der ET_B-Rezeptoren im proximalen Tubulus zieht eine Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität nach sich (Liu et al., 2009).

Der dünne Schenkel der Henle-Schleife scheint an der endothelinvermittelten Regulation des extrazellulären Wasserhaushalts nicht beteiligt zu sein (Kohan et al., 2011). Der dicke aufsteigende Schenkel der Henle-Schleife synthetisiert Endotheline in größeren Mengen als der proximale Tubulus, allerdings weniger als das Sammelrohr. Zugleich werden Endothelin-Rezeptoren exprimiert, primär ET_B-Rezeptoren. Die Endothelin-Produktion im medullären dicken aufsteigenden Schenkel stellt eine natriuretische Antwort auf eine hohe Salzzufuhr dar: Eine hohe Salzzufuhr steigert die medulläre Tonizität, und mit einem Anstieg der Osmolalität geht eine Steigerung der ET-1-Expression einher. Das freigesetzte ET-1 bindet auf autokrinem Wege an ET_B-Rezeptoren und stimuliert die Bildung von NO, wodurch die Aktivität des Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Kotransporters (NKCC2) und damit die NaCl-Rückresorption im dicken aufsteigenden Schenkel gehemmt wird (Herrera et al., 2009; Plato et al., 2000). Die ET-1-vermittelte Hemmung des Chlorid-Transports kann durch Gabe eines ET_B-Rezeptor-Blockers verhindert werden, wohingegen die Verabreichung ei-

nes ET_B-Agonisten diesen Effekt verstärkt (Kohan et al., 2011).

1.7.5.5 Sammelrohr

Das Sammelrohr (collecting duct, CD) ist der vorherrschende Ort der Endothelin-Produktion,⁶ wobei der größte Teil der Peptide im Sammelrohr des inneren Marks (IMCD) synthetisiert wird. Das Sammelrohr ist der Hauptort der Rezeptor-Expression und zeigt die höchste Dichte an ET_B-Rezeptoren in der Niere. Es werden im Sammelrohr nur vergleichsweise wenige ET_A-Rezeptoren exprimiert, das Vorkommen des ET_B-Rezeptors überwiegt; die höchste Konzentration der Rezeptor-Expression findet sich im IMCD (Kohan et al., 2011; Vignon-Zellweger et al., 2012).

Studien legen ET-1-vermittelte natriuretische und antihypertensive Effekte im Sammelrohr nahe, die auf autokriner Aktivierung von ET_B-Rezeptoren, aber auch auf der Aktivierung von ET_A-Rezeptoren und parakriner Regulation benachbarter Zellen beruhen (Kohan et al., 2011). Wie auch der Rest des Nephrons besteht das Sammelrohr aus polarisiertem Epithel. ET-1 wird im IMCD vornehmlich an der basolateralen Seite freigesetzt und ist ein wichtiger Modulator des Salz- und Wassertransports im Sammelrohr: Das freigesetzte Endothelin bindet vor allem an basolateral lokalisierte Rezeptoren (Kohan and Padilla, 1992) und übt auf diese Weise einen autokrinen Effekt auf die Tubuluszellen des Sammelrohrs aus. Daraus resultiert eine Hemmung der Natrium-Rückresorption, indem ET-1 die Offenwahrscheinlichkeit des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) reduziert. Zudem vermag ET-1 die Na⁺/K⁺-ATPase im IMCD zu hemmen. Eine Zunahme des extrazellulären Wasserhaushalts führt zu einer gesteigerten Endothelin-Produktion. Damit stellt das Endothelinsystem des Sammelrohrs einen wichtigen physiologischen Inhibitor der Natrium-Reabsorption dar und übt auf diese Weise einen starken antihypertensiven Effekt aus. Ein Abfall der Endothelin-Produktion im Sammelrohr könnte zur Retention von Natrium und einem erhöhten Blutdruck beitragen (Kohan et al., 2011; Vignon-Zellweger et al., 2012).

ET_A-Rezeptoren werden im Sammelrohr nur in vergleichsweise geringer Zahl ex-

⁶Das Sammelrohr produziert mehr Endothelin als jeder andere Zelltyp der Niere und möglicherweise sogar des gesamten Körpers (Kohan et al., 2011).

primiert, hemmen aber ebenfalls die Natrium-Rückresorption. Damit reduzieren sowohl ET_B - als auch ET_A -Rezeptoren die Natrium-Rückresorption (Vignon-Zellweger et al., 2012). Möglicherweise reduzieren Vasopressin und Angiotensin II, welche die Natrium-Resorption im Nephron stimulieren, die Expression der Endothelin-Rezeptoren im IMCD, um den gegensätzlichen natriuretischen Effekt des Endothelinsystems zu limitieren (Kohan et al., 2011; Vignon-Zellweger et al., 2012). Der ET-1-vermittelte Transport von Natrium wird durch eine Vielzahl von Signalwegen reguliert, unter anderem ist NO in die Endothelin-vermittelte Inhibition der Natrium-Reabsorption im Sammelrohr involviert. Die NO-Produktion im Sammelrohr wird durch Endotheline stimuliert (Kohan et al., 2011).

Endotheline inhibieren dosisabhängig die Rückresorption von Wasser im Sammelrohr. Auf autokrinem Wege reguliert ET-1 die Vasopressin-Wirkung im Sammelrohr und fördert die Diurese, indem die durch Vasopressin gesteigerte Permeabilität für Wasser durch ET-1 reduziert wird (Kohan et al., 2011; Ge et al., 2008). Die diuretischen Effekte von ET-1 im Sammelrohr werden hauptsächlich von ET_B -Rezeptoren vermittelt. Möglicherweise bewirken ET_A -Rezeptoren einen antidiuretischen Effekt im Sammelrohr. Vasopressin und Angiotensin II, welche die Natrium-Resorption im Nephron stimulieren, könnten die Expression der ET-Rezeptoren im IMCD reduzieren, um den gegensätzlichen natriuretischen Effekt des Endothelinsystems zu beschränken (Kohan et al., 2011; Vignon-Zellweger et al., 2012).

1.7.6 Endothelinwirkung auf humorale Systeme

1.7.6.1 Nebennierenrinde: Aldosteron

In der Nebennierenrinde wird ET-1 gebildet, außerdem werden beide Endothelinrezeptorsubtypen exprimiert, insbesondere in der Zona glomerulosa, in welcher ET-1 die Aldosteronproduktion stimuliert. Wenngleich der Effekt im Vergleich zu der von Angiotensin II vermittelten Wirkung gering ist, könnte ET-1 die Angiotensin-II-Wirkung auf die Nebenniere verstärken – die Blockade von Endothelin-Rezeptoren reduziert die Aldosteron-Konzentration im Plasma. ET-1 stimuliert sowohl auf autokrinem als auch auf parakrinem Wege Calcium-abhängig die adrenale Aldosteron-Produktion, die ET_A - und ET_B -vermittelte Freisetzung von Aldosteron

aus Zellen der Zona glomerulosa beruht teilweise auf der PKC. Unklar ist weiterhin die Rolle von ET-1 in der physiologischen Aldosteron-Produktion in Bezug auf Natrium-Haushalt und Blutdruckkontrolle (Kohan et al., 2011).

1.7.6.2 Renin-Angiotensin-System

In Anbetracht der Bedeutung von Endothelin und Renin für die Kontrolle des Blutdrucks könnte man eine direkte Interaktion beider Substanzen erwarten. In der Tat deuten Studien auf einen hemmenden Einfluss von ET-1 auf die Reninfreisetzung aus juxtaglomerulären Zellen infolge einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration hin. Diese inhibitorischen Einflüsse des Endothelins schließen auch die Hemmung stimulatorischer Faktoren auf die Renin-Freisetzung, wie etwa cAMP, ein (Takagi et al., 1989; Ritthaler et al., 1995, 1996). Da es Hinweise auf eine ET_B-vermittelte Inhibition der Reninfreisetzung gibt (Ritthaler et al., 1995), wurde untersucht, ob der modulierende Einfluss von ET-1 auf die Reninfreisetzung von anderen endothelialen Faktoren, allen voran NO, abhängt. So kann endotheliales ET-1 die Reninfreisetzung zwar abschwächen, unabhängig aber von Prostaglandinen oder NO. Tharaux et al. (1997) zeigten, dass die Hemmung der NO-Synthase die Reninfreisetzung Calcium-abhängig reduziert. Folgeexperimente mit dem dualen Rezeptorantagonisten Bosentan ergaben, dass NO eine inhibitorische Wirkung auf den Einfluss von ET-1 auf die Reninfreisetzung besitzt (Tharaux et al., 1997).

Trotz großer Übereinstimmung, dass ET-1 die Freisetzung von Renin hemmt, ist die physiologische Bedeutung dieses Vorgangs unklar. Studien belegen, dass endogenes ET-1 die Blutdruck-abhängige Kontrolle der Reninfreisetzung moduliert. Möglicherweise fördert endogenes ET-1 die Natrium-Exkretion, indem es die Wirkung des renalen Barorezeptors, der für die Freisetzung von Renin verantwortlich ist, abschwächt. Es besteht Uneinigkeit darüber, welcher Endothelin-Rezeptor in vivo die größere Bedeutung für die Kontrolle der Reninfreisetzung besitzt. Da die Aktivierung des ET_B-Rezeptors die NO-Produktion stimuliert und NO die Reninfreisetzung steigert, ist ungeklärt, auf welche Weise der ET_B-Rezeptor die Freisetzung von Renin inhibiert (Kohan et al., 2011). Untersuchungen von Berthold

et al. (1999) weisen eine Assoziation einer selektiven ET_A -Rezeptorblockade mit einer Stimulation des RAAS nach (Berthold et al., 1999). Eine weitere wichtige Beziehung zwischen ET-1 und dem Renin-Angiotensin-System entstammt einer großen Vielzahl von Studien, die nahelegen, dass Angiotensin II die Reninfreisetzung stimuliert, die mRNA-Expression in kultivierten Endothelzellen steigert und die ET-1-Produktion in kultivierten glatten Muskelzellen fördern kann. ET-1 vermittelt vasokonstriktorische Effekte von Angiotensin II, erhöht die Gefäßsensitivität gegenüber anderen Vasokonstriktoren und vermag die Vasokonstriktion zu verstärken. Die selektive ET_A - und die duale Endothelinrezeptor-Blockade können eine durch Angiotensin II hervorgerufene Hypertonie abschwächen, wobei die Entwicklung einer Angiotensin-II-bedingten Hypertonie abhängig von der Natrium-Aufnahme ist. Darum könnte eine Interaktion zwischen Angiotensin II und ET-1 in der Einflussnahme auf die renale Natrium-Exkretion bestehen (Kohan et al., 2011).

2 Fragestellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von Endothelin auf die Regulation des Reninsystems der Niere eingehender untersucht werden. Das Endothelinsystem spielt eine große Rolle in der Steuerung zahlreicher physiologischer Vorgänge: Es steht in engem Zusammenhang zur Nierenfunktion, indem es in den Wasser- und Salzhaushalt des Körpers eingreift und für die Freisetzung unterschiedlicher Hormone und vasoaktiver Substanzen, wie etwa Angiotensin II oder Renin, von Bedeutung ist. Neben dem Reninsystem stellt das Endothelinsystem das stärkste Vasopressor-system des Körpers dar. Es ist erwiesen, dass zwischen beiden Systemen zahlreiche Interaktionen bestehen (Rossi et al., 1999; Berthold et al., 1999). Es liegt die Frage nahe, in welcher Form der potente Vasokonstriktor Endothelin Einfluss auf das Reninsystem nimmt. So gibt es Hinweise auf eine ET_B -vermittelte Inhibition der Reninsekretion *in vitro* (Ritthaler et al., 1995). Wie aber stellt sich diese Situation *in vivo* dar? Welche Rolle spielt der ET_A -Rezeptor? Welchen Einfluss nimmt eine endothelinvermittelte Vasokonstriktion auf die Steuerung des Reninsystems? Es springt etwa folgender hypothetischer Zusammenhang ins Auge: Die endothelinvermittelte Vasokonstriktion vermag eine Erhöhung des Blutdrucks nach sich zu ziehen. Resultiert daraus eine Reaktion des renalen Barorezeptors im Sinne einer Verringerung der Reninproduktion? Welche Rolle spielen die Endothelinrezeptoren in diesem Kontext? Wie Kohan et al. (2011) konstatieren, könnten physiologische Veränderungen die Expression der Endothelinrezeptoren im renalen Gefäßsystem beeinflussen. Dies eröffnet die Möglichkeit neuer regulatorischer und kompensatorischer Einflüsse der Endotheline, deren Bedeutung für die Nierenfunktion vor diesem Hintergrund weiter wachsen könnte. Welche Veränderungen zieht eine Blockade der verschiedenen Endothelinrezeptoren nach sich? Welche Ergebnisse fördert der reninzellspezifische Knockout eines Endothelinrezeptors zu Tage? Gerade im Hinblick

auf das Wechselspiel zwischen Renin und Blutdruckregulation stellt sich die Frage nach einem Einfluss der Endothelinrezeptoren unter Stimulation des Reninsystems. Existiert ein solcher? Um den dargelegten komplexen und vielschichtigen Zusammenhängen auf den Grund zu gehen, stellt sich zunächst die fundamentalere Frage: Wo exakt sind welche Endothelinrezeptorsubtypen in Mäusenieren lokalisiert? Aufbauend auf der in der Einleitung skizzierten Lokalisation der Endothelinrezeptoren in Rattennieren erscheint es daher von besonderem Interesse, die Lokalisation der Endothelinrezeptoren im Gefäß-, Tubulus- und Sammelrohrsystem in der Niere von Mäusen zu präzisieren. Auf Basis dieser Kenntnis stellt sich die Frage, in welcher Art und Weise eine Blockade der Endothelinrezeptoren auf die Elektrolytkonzentrationen im Urin und die Urinosmolalität der Mäuse Einfluss nimmt. Daneben soll der Einfluss von Endothelinen auf die Reninexpression untersucht werden. Welche Bedeutung besitzt der ET_A -Rezeptor auf zellulärer Ebene für die Stimulation des Reninsystems? Dieser Frage soll abschließend nachgegangen werden, indem unter Zuhilfenahme des Cre/loxP-Systems der Einfluss eines reninzellspezifischen ET_A -Knockouts untersucht wird.

Zusammenfassend besteht das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Beantwortung der im Folgenden formulierten Fragestellungen: Wie stellt sich die Lokalisation der Endothelinrezeptoren im Gefäß-, Tubulus- und Sammelrohrsystem von Mäusenieren dar? Welche Auswirkungen besitzt die pharmakologische Blockade von Endothelinrezeptoren auf die Elektrolytkonzentration im Urin und die Urinosmolalität? Welchen Einfluss nehmen Endotheline auf die Reninexpression? Welche Bedeutung besitzt der ET_A -Rezeptor auf zellulärer Ebene für die Stimulation des Reninsystems?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets	
Cy2-Filter: Anregung 450–490 nm Emission 500–550 nm	Filter set 38, Zeiss, Jena
Cy3-Filter (TRITC): Anregung 533–558 nm Emission 570–640 nm	Filter set 43, Zeiss, Jena
Cy5-Filter: Anregung 625–655 nm Emission 665–715 nm	Filter set 50, Zeiss, Jena
Flammenphotometer	PFP7, Jenway, Dunmow, Essex, UK
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences Industrial Division, Mississauga, Canada

Geräte	Hersteller
Gefrierpunktosmometer	Osmomat 030, Gonotec, Berlin
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke und Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C , New Brunswick Scientific
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR80, Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
Reinwasseranlage	MilliQ Plus PF, Millipore, Schwalbach
PCR-Geräte	Lightcycler LC480, Roche, Mannheim Labcycler, Sensoquest, Göttingen
pH-Meter	HI 2211, Hanna Instruments
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Scantisch	motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller), Ludl Electronic Products, München
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	PowerPac Basic, Bio-Rad, München
UV-Spektrometer	BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg
Stoffwechselkäfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen

Geräte	Hersteller
Wärmeblöcke	Thermostat 5230, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	Hi 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/1
Wasserbäder	Modell W13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Hochsalzfutter 4 % NaCl	Ssniff, Soest
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Niedrigsalzfutter 0.02 % NaCl	Ssniff, Soest
Normalsalzfutter 0.4 % NaCl	Ssniff, Soest
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf	Sarstedt, Nümbrecht

Produkt	Hersteller
0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml	
Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

3.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100 bp Plus	Promega, Mannheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol p. a.	Merck, Darmstadt
First Strand Buffer, 5 ×	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/µl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green	Promega, Mannheim
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin [®] 25 000, 5 ml- Ampullen (5000 I. E./ml)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0.9 %	B. Braun, Melsungen
K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Bio-Rad, München
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/µl	Invitrogen, Karlsruhe

Produkt	Hersteller
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nukleasefreies Wasser	Promega, Mannheim
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0.5 µg/µl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Roti [®] -Safe GelStain	Roth, Karlsruhe
SYBR [®] Green PCR Kit	Roche, Mannheim
TRIzol [®] -Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.4 Primer

Die für die quantitative PCR und die Genotypisierung verwendeten Primer wurden von der Firma Biomers.net aus Ulm in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und gefriergetrocknet geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

3.1.4.1 Quantitative PCR (qPCR)

Name	Sequenz
GADPH s	5'-ATG CCA TCA CTG CCA CCC AGA AG-3'
GADPH as	5'-ACT TGG CAG GTT TCT CCA GGC GG-3'
Renin s	5'-ATG AAG GGG GTG TCT GTG GGG TC-3'

Name	Sequenz
Renin as	5'-ATG CGG GGA GGG TGG GCA CCT G-3'
ET _A s	5'-AGG AAC GGC AGC TTG CGG AT-3'
ET _A as	5'-AGC AAC AGA GGC AGG ACT GA-3'
ET _B s	5'-GAA GAG CGG TAT GCA GAT TG-3'
ET _B as	5'-TAT TGC TGG ACC GGA AGT TG-3'

3.1.4.2 Genotypisierung

Name	Sequenz
ET _B WT s	5'-CTG AGG AGA GCC TGA TTG TGC CAC-3'
ET _B WT as	5'-CGA CTC CAA GAA GCA ACA GCT CG-3'
ET _B TG s	5'-TGG AAT GTG TGC GAG GCC-3'
ET _B TG as	5'-CAG CCA GAA CCA CAG AGA CCA CCC-3'
ET _A ^{fl/fl} s	5'-CCT CAG GAA GGA AGT AGC ACT G-3'
ET _A ^{fl/fl} as	5'-ACA CAA CCA TGG TGT CGA-3'
653 Ren1d	5'-GAA GGA GAG CAA AAG GTA AGA G-3'
468 Ren1d	5'-GTA GTA GAA GGG GGA GTT GTG-3'
400 Cre	5'-TTG GTG TAC GGT CAG TAA ATT GGA C-3'

3.1.5 Antikörper

Zur Markierung spezieller Strukturen und zum Zwecke deren Nachweisbarkeit in histologischen Präparaten erfolgte die Verwendung von Antikörpern. Dabei wird zunächst die Bindung von Primärantikörpern an die jeweils zu bindende Struktur im histologischen Paraffinschnitt realisiert. Anschließend binden Sekundärantikörper gezielt an die zuvor verwendeten Primärantikörper. In Sekundärantikörpern enthaltene Fluorophore leuchten nach Anregung unter Emission von Licht bestimmter Wellenlängen auf und ermöglichen auf diese Weise die Detektion der markierten Strukturen im Lichtmikroskop.

Primärantikörper	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
ch-anti-Renin-IgG	polyklonal	Davids Biotech, Re- gensburg	1 : 400
rb-anti-ET _A -Rezeptor- IgG	polyklonal	Alomone Labs, Is- rael	1 : 100
ch-anti-Calbindin-IgG (anti-calbindin D-28k)	monoklonal	Swant, Schweiz	1 : 200
gt-anti-AQP2-IgG (c-17)	polyklonal	Santa Cruz Bio- technology, Texas	1 : 200
ms-anti-Glattmuskelak- tin-IgG	monoklonal	Abcam, UK	1 : 600

Sekundärantikörper	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
dk-anti-ms-IgG	Rhodamin- (TRITC)	Dianova, Hamburg	1 : 400
dk-anti-ms-IgG	Cy2	Dianova, Hamburg	1 : 400
dk-anti-rb-IgG	Cy2	Dianova, Hamburg	1 : 200
dk-anti-ms-IgG	Cy5	Dianova, Hamburg	1 : 400
dk-anti-ch-IgG	Rhodamin- (TRITC)	Dianova, Hamburg	1 : 400
dk-anti-ch-IgG	Cy5	Dianova, Hamburg	1 : 200

3.1.6 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien für sämtliche Puffer und Lösungen in H₂O_{bidest} gelöst.

Immunhistochemie

Fixierlösung für Perfusion

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Paraformaldehyd 3 %

Molekularbiologie

PBS-Puffer, pH 7,4

NaCl 136 mM

KCl 2.7 mM

Na₂HPO₄ × 2 H₂O 10.1 mM

KH₂PO₄ 1.8 mM

Nach einem ehemaligen Studenten namens Otto ist der folgende Puffer im Physiologischen Institut der Universität Regensburg benannt:

PBS-Otto-Puffer, pH 7,4

KH₂PO₄ × 3 H₂O 10 mM

NaCl 140 mM

KH₂PO₄ 10 mM

Waschpuffer

PBS-Otto-Puffer

BSA 1 %

Blockierlösung

PBS-Otto-Puffer

BSA 1 %

HS 10 %

Blockierlösung II

PBS-Otto-Puffer

Milchpulver

5 %

3.1.7 Software und Internetdienste

Die vorliegende Arbeit wurde mit TEXstudio, Version 2.9.4, angefertigt. Als Mikroskopiesoftware fanden *AxioVision 4.7* sowie *ZEN 2 (blue edition)* von Carl Zeiss, Jena, Verwendung. Für die Bearbeitung der Serienbilder und der histologischen Aufnahmen wurden *Vorschau*, Version 8.1, der Apple Inc. sowie das von Wayne Rasband (NIH, USA) geschriebene Java-Programm *ImageJ* verwendet. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit *Amira visualization software* (FEI, Oregon, USA). Für die Literaturrecherche im Internet fand *PubMed* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, aufrufbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Verwendung. Zudem leistete *Google Scholar*, <https://scholar.google.de/>, gute Dienste. Die Graphen wurden mit *GraphPad Prism 5* erstellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Für die durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung des Einflusses von Endothelin auf die Reninproduktion wurden ausschließlich Nieren adulter Mäuse verwendet. Alle Versuchstiere wurden dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ gemäß behandelt. Stets wurde auf für Mäuse vorgeschriebene Haltungsparmeter geachtet (Temperatur $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$, Hell-Dunkel-Intervall von 12 h, freier Zugang zu Futter und Wasser).

Folgende Tierstämme fanden in den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen Verwendung:

Tierstamm	genetischer Hintergrund	Herkunft
C57BL/6	C57BL/6	Charles River, Sulzfeld
ET _A ^{fl/fl}	Mischung: 129/S6, FVB/N und C57BL/6J	Prof. Dr. M. Yanagisawa, UT Southwestern, Medical Center, USA
Ren-1d ^{+/Cre}	Mischung: 129J und C57BL/6	Prof. R. Gomez, University of Virginia, School of medicine, USA
Ren-1d ^{+/Cre} -ET _A ^{fl/fl}	bunt	Eigenzucht

Als „Floxing“ bezeichnet man das Flankieren eines DNA-Abschnitts mit zwei loxP-Sequenzen (loxP = locus of X-over P1, eine aus 34 bp bestehende DNA-Sequenz des Bakteriophagen P1). Eine Cre-Rekombinase (Cre = causes recombination) katalysiert die Rekombination (Deletion, Translokation, Inversion) der DNA-Sequenz zwischen beiden loxP-Abschnitten. Unter Nutzung dieses sogenannten Cre/loxP-Systems erfolgt der reninzellspezifische Knockout des geflochten ET_A-Rezeptor-Gens unter Erhalt des Reningens.

ET_A^{fl/fl}-Mäuse werden der Einfachheit halber bisweilen auch als „Wildtyp“-Mäuse, Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäuse im Gegensatz dazu auch als „Knockout“-Mäuse bezeichnet. Zur deutlichen Unterscheidbarkeit tragen C57BL/6-Mäuse stets die Bezeichnung „C57BL/6“.

3.2.1.1 Stoffwechselkäfige

Zur Kontrolle des Stoffwechsels der Versuchstiere wurden die Mäuse während der Behandlung mit den Endothelinrezeptor-Blockern in Stoffwechselkäfige gesetzt. Dabei handelt es sich um eine Vorrichtung folgender Art: Der „Käfig“ selbst besteht aus durchsichtigem Plexiglas. Das Versuchstier sitzt auf einem runden Metallgitter von etwa 30 cm Durchmesser, ein Deckel verhindert die Flucht der Tiere. In jedem Stoffwechselkäfig befindet sich ein Versuchstier. Die Tiere werden mit normalem Trockenfutter gefüttert, über eine Flasche haben sie Zugang zu frischem Trinkwasser. Die besondere Konstruktion dieser Käfige besteht darin, dass Kot

und Futterreste nach unten durch das Gitter fallen, während – getrennt davon – der Urin der Versuchstiere über einen Trichter in einer dafür vorgesehenen Vorrichtung aufgesammelt wird. Dies ermöglicht die anschließende Analyse des Urins. Im vorliegenden Fall erfolgte die Untersuchung hinsichtlich der Osmolalität, der Natrium- sowie der Kalium-Konzentration. Daneben wurden die Tiere täglich gewogen und die getrunkene Menge an Wasser bestimmt, sodass der Stoffwechsel der Tiere genau nachvollzogen werden konnte.

3.2.1.2 Verabreichung der Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

Den Versuchstieren wurden nach einer Eingewöhnungsphase in die Stoffwechselkäfige über insgesamt zehn Tage die selektiven Endothelin-Rezeptor-Antagonisten BQ610 und BQ788 sowie der duale Antagonist Bosentan (jeweils 10 mg/kg KG i. p.) einmal täglich verabreicht.

3.2.1.3 Niedrigsalz-Enalapril-Behandlung

Zur Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wurden die adulten Wildtyp- und Knockout-Mäuse sieben Tage lang ausschließlich mit Niedrigsalzfutter (0.02 % NaCl) ernährt. Anschließend wurde das Trinkwasser für drei Tage durch eine Lösung des ACE-Hemmers Enalapril (0.1 mg/ml, entsprechend 10 mg/kg KG pro Tag) ersetzt und bis zum Versuchsende beibehalten. Die Nahrung der jeweiligen Kontrollgruppe wies eine normale Salzkonzentration auf.

3.2.2 Atomemissionsspektrometrie

Die Atomemissionsspektrometrie, auch als Flammenphotometrie bezeichnet, wird zur quantitativen Bestimmung der Konzentration ausgewählter Elemente in einer Materialprobe verwendet. Die Analysesubstanz wird dazu einer Flamme zugeführt. Durch die Wärmeenergie der Flamme werden die äußeren Valenzelektronen angeregt und auf ein energetisch höheres Niveau gehoben. Dabei emittieren die Atome ihr elementspezifisches Spektrum, das im Spektrometer dispergiert und analysiert wird. Das Flammenemissionsspektrum wird vom Flammenphotometer gemessen. Die Methode ist sehr empfindlich und einfach in der Durchführung. Mit Hilfe der

Atomemissionsspektrometrie wurde die Natrium- und Kalium-Konzentration des Mäuserurins bestimmt.

3.2.3 Osmometrie

Die Osmolalität (Molalität osmotisch aktiver Teilchen einer Lösung, SI-Einheit osmol/kg) wird mit Hilfe eines Osmometers bestimmt. Als Messprinzip dient die Messung der Gefrierpunktserniedrigung (Kryoskopie), worunter man ein Verfahren zur Bestimmung der molaren Masse von Substanzen durch Messung der Gefrierpunktserniedrigung versteht.

3.2.4 Histologische Methoden

Fixierung des Nierengewebes

Um eine möglichst realitätsnahe Vorstellung der vitalen Niere zu erhalten, ist eine Fixierung des Nierengewebes notwendig. Dieser Vorgang dient der Bewahrung der Zellmorphologie und dem Erhalt der Gewebestruktur durch das Unterbinden des Zersetzungsprozesses. Die Fixierung bewirkt zudem eine Härtung des Gewebes, woraus eine bessere Schneidbarkeit des Organs und somit Vorteile beim Anfertigen von Serienschnitten resultieren.

Retrograde arterielle Perfusion

Die Mäuse werden mittels Ketamin (80 mg/kg KG i. p.) und Xylazin (12 mg/kg KG i. p.) anästhesiert. Nach Eröffnung des Abdomens wird die Aorta abdominalis dargestellt. Kaudal des Abgangs der Arteriae renales erfolgt das Abklemmen der Bauchaorta, sodass die Blutversorgung der Nieren weiterhin gewährleistet ist. Distal der Klemme wird anschließend der Perfusionskatheter eingeführt und mit einer Klammer fixiert. Durch einen Schnitt in die kaudale Vena cava wird ein Ablass für die Perfusionslösung zur Reduktion des intravasalen Drucks hergestellt. Die proximale Klemme wird entfernt; über den arteriellen Perfusionskatheter werden retrograd 10 ml einer isotonen NaCl-Lösung und 10 I. E. Heparin/ml perfundiert. Bei erfolgreicher Perfusion zeigt sich eine zügige Entfärbung der Abdominalorga-

ne. In diesem Falle erfolgt die anschließende Fixierung der Organe mit Hilfe einer frisch angesetzten 3%igen Paraformaldehyd-PBS-Lösung, von welcher bei konstantem Fluss über 3 Minuten insgesamt 40 ml infundiert werden. Im Anschluss erfolgt die Entnahme der perfundierten Organe und deren Aufbewahrung in 70%igem Methanol bei 4 °C bis zur Einbettung in Paraffin.

Einbettung in Paraffin

Zur Vorbereitung auf die Paraffin-Einbettung erfolgt nach vorangegangener Fixierung eine schrittweise Dehydrierung des Nierengewebes in Gewebe-Einbettkassetten durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration:

- 1 × ü. N. 70 % Methanol (bei RT)
- 1 × 30 min 70 % Methanol (bei RT)
- 2 × 30 min 80 % Methanol (bei RT)
- 2 × 30 min 90 % Methanol (bei RT)
- 2 × 30 min 100 % Methanol (bei RT)
- 2 × 30 min 100 % Isopropanol (bei RT)
- 1 × 30 min 100 % Isopropanol (bei 45 °C)
- 1 × 30 min 1:1-Isopropanol-Paraffin-Gemisch (bei 55 °C)

Anschließend wird das Gewebe zwei Mal für mindestens 24 h in auf 60 °C temperiertes, geschmolzenes Paraffin eingebettet. Nachdem das Präparat auf diese Weise vollkommen mit flüssigem Paraffin durchtränkt ist, erfolgt die Einbettung in mit 60 °C warmem Paraffin gefüllten Silikon-Kautschuk-Einbettformen. Die Aushärtung erfolgt bei Raumtemperatur über Nacht.

Anfertigung von Paraffinschnitten

Die angefertigten Paraffinblöcke werden mittels eines erhitzten Spatels zurechtgeformt und auf einem Holzblock angebracht. Nach Fixation des Holzblocks werden

mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms vom Paraffinblock 5 µm dicke Serienschnitte (ca. 100–150 pro Präparat) angefertigt. Die einzelnen Schnitte werden in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt, um sich dort zu entfalten und zu strecken. Anschließend werden die Schnitte auf einen Objektträger (*superfrost plus*) aufgezogen und über Nacht in einem Wärmeschrank bei 40 °C zum Trocknen belassen.

Entparaffinierung

Am darauffolgenden Tag werden die Schnitte mit Hilfe einer umgekehrten Alkoholreihe nach folgendem Schema entparaffiniert und rehydriert:

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

Immunhistochemische Färbung

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis und die Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind (Mullisch and Welsch, 2015). Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zunächst der primäre, unkonjugierte Antikörper an das Antigen der Zellen im Gewebeschnitt. Anschließend werden die Schnitte mit einem zweiten, fluoreszierenden, gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichteten Sekundär-Antikörper inkubiert. Durch Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge können die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht und detektiert werden.

Protokoll:

Tag 1

- Im Falle der ET_A-/ET_B-Färbung (andernfalls entfallen diese Schritte jeweils): kurzes Waschen mit H₂O.
- Im Falle der ET_A-/ET_B-Färbung: Kochen in TRIS/EDTA für 45 min bei 97 °C im Wasserbad zur Demaskierung der Epitope.
- Waschen der Präparate in den dafür vorgesehenen Präparatekästen mit PBS-Otto-Puffer (3 × 5 min).

Blockieren

- Je Präparatkasten etwa 200 µl Blockierlösung auftragen und bei Raumtemperatur 20 min zur Blockierung unspezifischer Bindungen inkubieren (im Falle der ET_A-/ET_B-Färbung entfällt dieser Schritt).
- Im Falle der ET_A-/ET_B-Färbung: Blockieren mit Blockierlösung II zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 30–45 min bei Raumtemperatur.

Primär-Antikörper

- Verdünnen der (lichtunempfindlichen) Primär-Antikörper in Blockierlösung (wie oben angegeben).
- Aufbringen von etwa 150 µl pro Objektträger.
- Inkubation bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank.

Tag 2

- Waschen der Präparate für 3 × 10 min mit Stammlösung (PBS-Otto/1 % BSA) (im Falle der ET_A-/ET_B-Färbung entfällt dieser Schritt).
- Im Falle der ET_A-/ET_B-Färbung: Inkubation mit Blockierlösung II bei Raumtemperatur für 30–45 min.

Sekundär-Antikörper

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

- Verdünnen der (lichtempfindlichen) Sekundär-Antikörper in Blockierlösung (wie oben angegeben).
- Zentrifugation für 10 min bei 13 000 rpm.
- Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen über 90 min.
- Waschen der Präparate für 2×10 min mit jeweils 150 μ l der Stammlösung (PBS-Otto/1% BSA) pro Objektträger im Dunklen.
- Waschen der Präparate für 10 min am Schüttler in einer mit Stammlösung befüllten Küvette im Dunklen.
- Eindeckeln der Objektträger mit *Mounting Medium* und anschließendes Aufbewahren unter Lichtausschluss in einer Mappe bei 4 °C.

3.2.5 Dreidimensionale Rekonstruktion

Akquisition und Digitalisierung

Zur dreidimensionalen Rekonstruktion dienen die gegen Renin und Glattmuskelaktin doppelimmunfluoreszent gefärbten Paraffinserienschnitte. Die Fluorophore der Sekundärantikörper gegen Renin und Glattmuskelaktin besitzen spezifische Anregungswellenlängen. Durch den Einsatz geeigneter Fluoreszenzfilter kann selektiv die gewünschte Komponente zur Darstellung gebracht werden. Der Filter für Cy2 mit einer Anregungswellenlänge von 450–490 nm erlaubt die Anregung der Fluorophore der Glattmuskelzellen, die bei einer Emission von 500–550 nm grün aufleuchten. Der Rhodamin-(TRITC)-Filter ist durchlässig für Licht der Wellenlänge im Bereich von 533–558 nm. Dies ermöglicht die Anregung der Fluorophore der markierten Reninmoleküle, welche durch Emission von Licht der Wellenlänge

570–640 nm rot fluoreszieren. Mithilfe des Cy5-Filters, dessen Anregungswellenlänge 625–655 nm beträgt, besteht die Möglichkeit zur Anregung blau fluoreszierender Fluorophore, deren Emissionsspektrum im Wellenlängenbereich 665–715 nm liegt. Zur Aufnahme und Digitalisierung der fluoreszierenden Schnittbilder fand das Mikroskop Axiovert 200M mit motorisierter Objektaufgabe und angeschlossener Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) Verwendung. Bei der verwendeten Software handelte es sich um *AxioVision Rel. 4.5* und *ZEN 2 (blue edition)* von Zeiss. Die Aufnahme der Einzelbilder einer Serie erfolgte mit 100facher Vergrößerung. Zur Digitalisierung der histologischen Einzelaufnahmen wurden die Bildausschnitte 200fach bzw. 400fach vergrößert.

Axio Vision/ ZEN

Vor Beginn der mikroskopischen Aufnahmen erfolgt die Einrichtung der Kanäle für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) sowie die Einstellung der optimalen Belichtung für den jeweiligen Kanal. Anschließend wird für jeden Objektträger ein Übersichtsbild erstellt und die Bereiche für die Einzelaufnahmen markiert. Da die Aufnahme des ausgewählten Nierenausschnitts bei einer Vergrößerung um den Faktor 100 nicht als Ganzes möglich ist, werden von diesem Ausschnitt kleinere Bereiche (Kacheln) mit einer jeweils 15%igen Überlappung aufgenommen. Überlappungsunregelmäßigkeiten und -verschiebungen werden durch die Funktion „Stitching“ auszugleichen versucht. Zur Konvertierung der Kachelbilder wird ein Helligkeitsausgleich durchgeführt. Das erstellte Overlay-Bild wird im Rot-Grün-Blau-(RGB)-Farbraum als *.zvi-Datei abgespeichert.

Für die weitere Bearbeitung ist eine Konvertierung der Datei auf acht Bit nötig. Um hierbei nicht an Bildqualität einzubüßen, findet das Grafikformat TIFF Verwendung. Dieser Vorgang lässt sich wie folgt realisieren:

- Öffnen einer Bilddatei
- Datei → Exportieren → *.tif
- Stapelverarbeitung Start

Datenaufbereitung mittels ImageJ

Bildstapelgenerierung Da durch das individuelle Stitching die Bilder nicht die gleiche Größe in Länge und Breite aufweisen, müssen sie auf eine einheitliche Größe überführt werden, um die Daten in die Rekonstruktionssoftware *Amira* importieren zu können. Zu diesem Zweck wird zunächst mit *Photo Shop CS4* ein leeres Bild erzeugt, welches in Länge und Breite das größte Format aufweist, und zu den Serienbildern als TIFF-Datei gespeichert. Im folgenden Schritt werden sämtliche Bilder auf diese Größe angeglichen: Das Bild selbst wird dabei nicht verändert, es wird lediglich ein schwarzer Rand an das bestehende Bild angefügt. Durch das Bildanalyseprogramm *ImageJ* wird ein Bildstapel (Stack) erstellt. Dies geschieht auf folgende Weise:

- Öffnen aller Einzelbilder
- Plugins
- Stack
- Stack Builder

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

3D-Rekonstruktion mit Amira

Zur weiteren Bearbeitung werden die Daten in die *Amira Visualization*-Software auf einer Graphik-Workstation importiert. Um eine korrekte Skalierung der Daten zu gewährleisten, wird die Pixelgröße in μm berücksichtigt: Sie ist ein Objektiv- und Kamera-abhängiger Wert (bei Verwendung eines $10\times$ -Objektivs entspricht 1 Pixel = $1\times 1\ \mu\text{m}$). Bezogen auf die maximalen Abmessungen des Bildstapels (Länge x und Breite y), die Gesamtzahl der Schnitte und die jeweilige Schnittdicke von $5\ \mu\text{m}$ (Höhe z) wird die BOUNDINGBOX definiert, welche die maximalen Abmessungen des Datensatzes in jeder Ebene beschreibt. Da fortan mit dreidimensionalen Daten gearbeitet wird, wird das zweidimensionale Pixel durch das dreidimensionale Voxel

abgelöst, das der Geometrie des Raumes entsprechend eine quaderförmige Zelle darstellt. Ein Voxel in der vorliegenden Arbeit beträgt somit $1 \times 1 \times 5 \mu\text{m}$.

Farbkanaltrennung Im nächsten Schritt erfolgt die Auftrennung des RGB-Datensatzes in seine einzelnen monochromen Kanäle. Damit lassen sich die Fluoreszenzmarkierungen von Renin bzw. Aktin anhand der Grauwerte der Pixel eines jeden aufgenommenen Bildes separat erkennen. Zudem ermöglicht dies die Durchführung einer Datensegmentierung auf folgende Weise:

- COMPUTE
- CHANNEL WORKS
- INPUT CHANNEL 1 \rightarrow Abspeichern als Aktin-Stapel
- INPUT CHANNEL 2 \rightarrow Abspeichern als Renin-Stapel

Alignierung Da die Ausrichtung der histologischen Serienschnitte auf den Objektträgern nicht identisch ist, sondern geringfügig variiert, müssen der Aktin- und der Renin-Stapel aligniert, d. h. zur Deckung gebracht werden. Dies wird mittels Rotationen und Translationen erreicht, indem zwei jeweils aufeinanderfolgende Schnittbilder des Bildstapels so exakt wie möglich übereinander gelegt werden. Die Alignierung erfolgt anhand des Aktin-Bildstapels, da die zahlreichen und zusammenhängenden Immunreaktionen des Aktins ein besseres Ergebnis ermöglichen. Die Alignierung des gesamten Aktin-Bildstapels erzeugt eine vollständig ausgerichtete Niere. Auf diesen wird sich als Referenz zur Ausrichtung des Renin-Bildstapels bezogen. Hierdurch erreicht man Kongruenz der Renin-Färbungen und das spätere Zusammenfügen der Daten wird ermöglicht. Das genaue Vorgehen zur Alignierung der Daten erfolgt auf diese Weise:

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

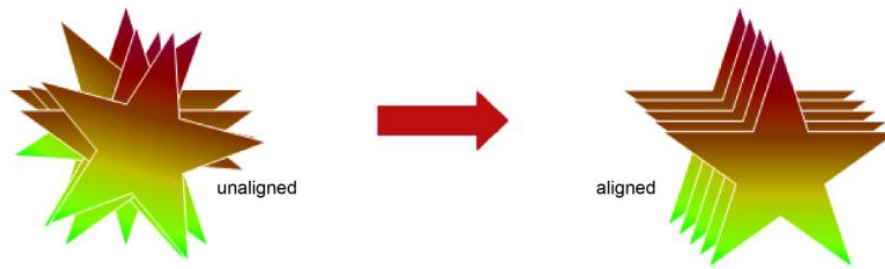


Abbildung 3.1: Prinzip der Alignierung. Nach Machura (2008).

- RESAMPLE

Datensegmentierung Bei der Datensegmentierung, auch als Labelling bezeichnet, handelt es sich um den zeit- und arbeitsintensivsten Teil der dreidimensionalen Rekonstruktion. Hierbei werden ausgewählte Strukturen durch verschiedene Verfahren markiert und einem definierten Material zugeordnet. Später kann aus der Gesamtheit der markierten Strukturen die Oberfläche dieses Objekts berechnet werden. Mit folgenden Programmfunktionen wird die Datensegmentierung eingeleitet:

- LABELLING
- LABEL FIELD

Für das Labeling der immunhistochemisch markierten Strukturen stehen verschiedene Segmentierungstools zur Verfügung:

- BRUSH: Fluoreszenzsignale können im Freihandmodus umfahren werden.
- MAGIC WAND: Basierend auf der Verteilung der Grauwerte (0 = Schwarz, 255 = Weiß) können Immunfluoreszenzsignale durch Festlegen einer Grauwert-Schwelle markiert werden.
- FILL HOLES: Füllt vollständig mit Markierung umrandete Strukturen auf.
- REMOVE ISLANDS: Kleine Material-Inseln (Artefakte) werden automatisch entfernt.

- SMOOTH LABELS: Zur Glättung der Ränder der Materialien.
- THRESHOLD: Ermöglicht ähnlich dem Befehl MAGIC WAND eine Selektion aller Voxel in einem definierten Grauwertbereich. Hierbei wirkt THRESHOLD auf den gesamten Schnitt, während MAGIC WAND sich nur auf den mit dem ausgewählten Pixel/Voxel verbundenen Bereich auswirkt.
- INTERPOLATE: Eine fehlende Struktur lässt sich durch Markierung des vorangehenden und nachfolgenden Schnittes durch eine Interpolation berechnen und ergänzen.
- WRAP: Durch Markierung von Anfang, Mitte und Ende einer Zielstruktur können die Zwischenschnitte zu einer annähernd kugeligen Gestalt ergänzt werden.

Sämtliche Segmentierungsfunktionen können entweder auf den aktuellen Schnitt (current slice) oder alle Schnitte zugleich (all slices) angewendet werden. Das Ziel der Datensegmentierung besteht darin, mit Hilfe der Markierungen eine dreidimensionale Oberfläche zu generieren. Anhand der Fluoreszenzsignale der Aktin-gefärbten Strukturen erfolgt die Darstellung der Nierengefäße. Der Bildstapel Renin-gefärbter Strukturen erlaubt die Darstellung reninpositiver Zellen sowie die Bestimmung deren Anzahl und Lokalisation. Kapsel und Glomeruli können aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz erkannt und markiert werden.

Oberflächengenerierung Mit Hilfe der erstellten Labels kann für jedes Material eine separate Oberfläche berechnet und im 3D-Modell räumlich dargestellt werden:

- SURFACE GEN
- SURFACE VIEW zur Darstellung der Oberfläche

Die dreidimensionalen Modelle können im Anschluss mit dem Befehl PROPERTIES bearbeitet und optimiert werden:

- SURFACE EDITOR dient der Entfernung überflüssiger Ausschnitte.

- SIMPLIFIER als Mittel zur Reduktion der Polygonzahl und damit der Datenmenge.
- PARAMETER EDITOR ermöglicht die Änderung der Farbeinstellung oder der Skalierung.
- Die Befehlsabfolge COMPUTE → SURFACE erlaubt eine Glättung der Oberfläche.

Es besteht die Möglichkeit, die erzeugten Objekte einzeln oder gemeinsam zu betrachten und zu bearbeiten. Die dreidimensionalen Objekte können rotiert und räumlich analysiert werden. Mit Hilfe des Befehls SURFACE VIEW kann die Darstellungsform geändert werden, um beispielsweise Objekte transparent erscheinen zu lassen. Man hat die Option, Strecken und Winkel zu messen und daraus Flächen und Volumina zu errechnen.

3.2.6 Molekularbiologische Methoden

Isolierung von Total-RNA aus Mäusenieren

Die Isolierung von RNA erfolgt mit dem TRIzol-Reagenz nach dem zugehörigen Protokoll des Herstellers. Die zugrundeliegende Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski and Sacchi (1987). Das TRIzol-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinisothiozyanat. Das Chloroform trennt das Homogenisat in drei Phasen. Die Fällung der RNA aus der wässrigen Phase vollzieht sich durch das Isopropanol. Zur Vermeidung von Kontaminationen durch RNasen werden bei sämtlichen Vorgängen Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Geräte und Einmalartikel verwendet. Benötigte Puffer und Lösungen werden mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.

Kurzprotokoll zur RNA-Isolation mit TRIzol-Reagenz

- Vorlegen von 1 ml TRIzol-Reagenz in Sarstedt-Tubes auf Eis für eine halbierte adulte Mausniere.

- Überführen der gekühlten Nieren aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen. Homogenisierung für ca. 30 s.
- Umfüllen des Gemisches in Eppendorf-Cups mit einem Fassungsvermögen von 2 ml. Zur Denaturierung der Proteine (diese lösen sich in Phenol) 5 min bei RT stehen lassen.
- Zugabe von 200 µl Chloroform. Schütteln, nicht vortexen.
- Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 12 000 rpm zur Auftrennung des Homogenisats in drei Phasen (wässriger Überstand, Interphase mit hydrophilen Proteinen, rote Phenolphase).
- Überführen von etwa 500 µl des wässrigen Überstandes (nicht der Interphase) in Eppendorf-Cups mit einem Fassungsvermögen von 1.5 ml.
- Mischen der wässrigen Phase mit 500 µl Isopropanol im Verhältnis 1:1. Kräftig schütteln.
- Ausfällen der RNA über 10 min bei RT.
- Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 12 000 rpm, Verwerfen des Überstands.
- Überführung des Pellets in 1 ml 75 %igen Ethanol.
- Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 7500 rpm. Verwerfen des Überstandes.
- Trocknen des Pellets für 10 min bei RT. Lösen des Pellets in Abhängigkeit der Größe in 50–300 µl RNase-freiem Wasser.
- Resuspension des Pellets im Schüttler bei 65 °C für maximal 2 min.
- Lagerung bei –80 °C.

Quantifizierung der RNA Die Konzentration der isolierten RNA wird mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm erfolgt die Bestimmung der Quantität und der Reinheit der isolierten RNA.

Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Mittels reverser Transkription wird die isolierte RNA in copy DNA (cDNA) übersetzt. Durch Übersetzung in cDNA sind die Informationen der RNA stabiler konserviert. Die cDNA dient als Template für die spätere Analyse durch die quantitative PCR. Als Primer werden Oligo-(dT)₁₅-Ketten verwendet, um so ausschließlich mRNA mit Poly-A-Schwanz zu transkribieren.

10 µl	Reaktionsansatz
1 µg	Gesamt-RNA
1 µl	Oligo-(dT) ₁₅ -Primer
add	DEPC-H ₂ O

Das Reaktionsgemisch (10 µl) wird für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Im Anschluss wird folgender Mix zugegeben:

Mix	
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase
4 µl	dNTPs (2.5 mM)
4 µl	Puffer (5× first strand buffer)
3 µl	DEPC-H ₂ O

Die cDNA-Synthese erfolgt im Anschluss über 1 h bei 37 °C. Zur Inaktivierung der Enzyme wird der Reaktionsansatz am Ende für 2 min auf 94 °C erhitzt. Für die quantitative PCR wird die synthetisierte cDNA mit 20 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei –20 °C gelagert.

Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-PCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde mit dem Gerät *Lightcycler 480* und dem *SYBR Green Master PCR*-Kit der Firma Roche durchgeführt. Bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion wird die entstandene DNA-Menge

nach jedem PCR-Zyklus photometrisch ermittelt. Dies ermöglicht, den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green. Dieser weist eine hohe Affinität zur doppelsträngigen DNA im Bereich der kleinen Furche auf. In diesem Abschnitt bindet er an die DNA und leuchtet 1000-fach stärker als ungebundenes SYBR Green. Die Intensität der Fluoreszenzsignale ist proportional zur Menge der entstehenden DNA.

Reaktionsansatz

10 µl	Reaktionsansatz
5 µl	Lightcycler 480® SYBR Green Master
0.5 µl	sense Primer (10 pmol/µl)
0.5 µl	antisense Primer (10 pmol/µl)
3 µl	ddH ₂ O
1 µl	cDNA

Amplifizierungsprotokoll

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

Primer

Am Ende eines jeden Zyklus erfolgt die Fluoreszenzmessung. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wird das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Zu diesem Zweck wird die DNA langsam (0.1 °C/s) von 60 °C auf 95 °C erhitzt und währenddessen die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Housekeeper diente GADPH.

Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgt zur Determination der vorliegenden DNA-Sequenz zur Selektion der gewünschten Mausspezies. Zu diesem Zweck erfolgt im Rahmen einer Polymerasekettenreaktion die Amplifizierung spezieller DNA-Sequenzen und die anschließende Auswertung. Die Extraktion der DNA erfolgte nach der NaOH-Methode.

Protokoll der DNA-Extraktion

- Abschneiden von etwa 2 mm des distalen Endes des Mausschwanzes.
- Versetzen mit 100 μl NaOH (25 mM).
- Inkubation bei 96 °C für 1 h im Thermocycler.
- Vortexen zur Auflösung des Mausschwanzes unter Zugabe von 10 μl Tris–HCl, pH 8.
- Zentrifugation für 6 min bei 10 000 rpm.
- Einbringen von 2 μl des Überstands (gDNA) in die Genotypisierungs-PCR.

20 μl	PCR-Reaktionsansatz
1 μl	sense-Primer (10 pmol/ μl)
1 μl	antisense-Primer (10 pmol/ μl)
2.5 μl	dNTPs (2.5 mM)
4 μl	Puffer (GoTaq buffer green)
0.3 μl	GoTaq
9.2 μl	ddH ₂ O
2 μl	gDNA

Amplifizierungsprotokolle

Amplifizierungsprotokoll für ET_A lox:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	5 min	Aktivierung
35	94 °C	30 s	Denaturierung
	65 °C	30 s	Annealing
	45 °C	45 s	Elongation
1	72 °C	5 min	Elongation

Amplifizierungsprotokoll für RenCre:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	5 min	Aktivierung
40	94 °C	30 s	Denaturierung
	56 °C	60 s	Annealing
	72 °C	50 s	Elongation
1	72 °C	5 min	Elongation

Die Polymerasekettenreaktion zur Genotypisierung wurde mit dem Gerät *Lab-cycler* der Firma Sensoquest durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden anschließend auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen, die DNA-Fragmente durch horizontale Gelelektrophorese bei 120 V der Größe nach aufgetrennt. Anhand der auftretenden Banden lässt sich der vorliegende Genotyp bestimmen.

Mutation	Banden Wildtyp	Banden modifiziert
ET _A lox	610	650
RenCre	600	400

3.2.7 Statistische Methoden

Untersuchungen hinsichtlich der Signifikanz erhobener Daten im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden mit dem t -Test durchgeführt. Ausreißer wurden mit dem Test nach Grubbs detektiert und exkludiert. Das den statistischen Auswertungen zugrundeliegende Signifikanzniveau beträgt $\alpha = 0.05$ (signifikant). In Balkendiagrammen aufgetragene Graphen sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

4 Ergebnisse

4.1 Lokalisation der Endothelinrezeptoren

4.1.1 Lokalisation der Endothelinrezeptoren im Gefäßsystem der Mausniere

Für die Lokalisation der Endothelin-Rezeptoren im Gefäßsystem der Mausniere erfolgte die Anfertigung histologischer Aufnahmen von Paraffinschnitten der Mäusenieren nach immunhistochemischer Färbung der Strukturen Renin, Glattmuskelaktin sowie des ET_A - bzw. des ET_B -Rezeptors. Die Lokalisationen der ET_A - und ET_B -Rezeptoren im arteriellen Gefäßsystem der Nieren von $ET_A^{fl/fl}$ -Mäusen sind im Folgenden in Abbildung 4.1 dargestellt.

In Abbildung 4.1 erkennt man das blau gefärbte Glattmuskelaktin sowie das rot fluoreszierende Renin im juxtaglomerulären Abschnitt des Vas afferens. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei den grün gefärbten Strukturen zu: Spangenartig ist die Verteilung des ET_A -Rezeptors in den glatten Muskelzellen über die gesamte Länge der afferenten Arteriole erkennbar. Wie man der Kolo-kalisation dieser Abbildung entnehmen kann, exprimieren auch Reninzellen ET_A -Rezeptoren. Im Mesangium ist eine schwache Expression von ET_A -Rezeptoren erkennbar (siehe Abbildung 4.1). Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analysen konnte im Gefäßsystem der Mausniere keine Expression des ET_B -Rezeptors festgestellt werden.

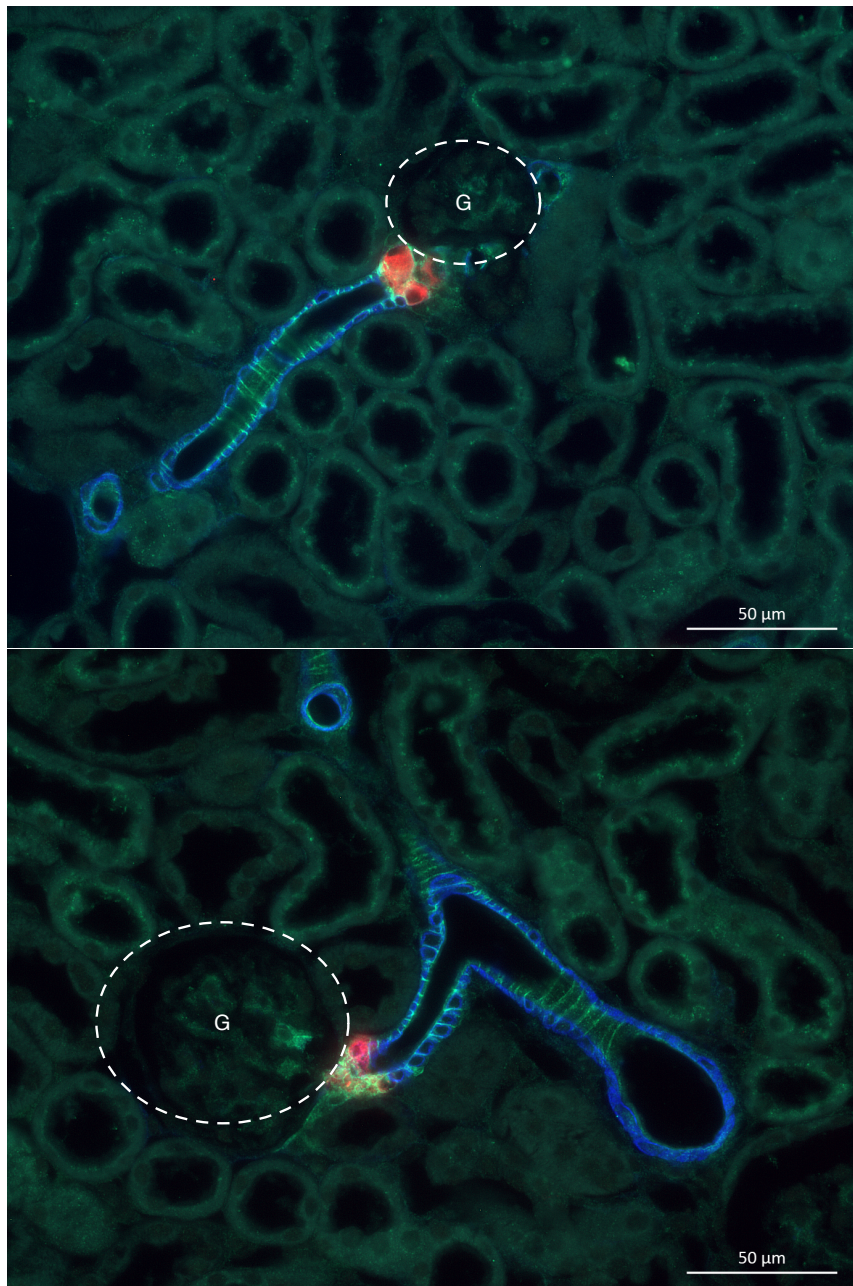


Abbildung 4.1: **Oben:** Lokalisation von ET_A -Rezeptoren in der afferenten Arteriole der Niere einer Wildtyp-Maus. **Unten:** Expression von ET_A -Rezeptoren zusätzlich in der A. interlobularis. Es ist die typische spangenartige Anordnung der ET_A -Rezeptoren zu erkennen. Färbung: Aktin blau, Renin rot, ET_A -Rezeptoren grün. Vergrößerung 400fach.

4.1.2 Lokalisation der Endothelinrezeptoren im Tubulus- und Sammelrohrsystem

Neben der Lokalisation der Endothelin-Rezeptoren im Gefäßsystem der Niere ist die Verteilung dieser Rezeptoren im Tubulus- und Sammelrohrsystem von Interesse. Wie bereits in der Einleitung skizziert, ist in der Literatur eine hohe Dichte an Endothelin-Rezeptoren im Tubulus- und im Sammelrohrsystem von Rattennieren beschrieben. Wie aber ist es um die Expression und die Lokalisation dieser Rezeptoren in Mäusenieren bestellt? Zu diesem Zwecke wurden die nachstehenden Färbungen histologischer Schnitte angefertigt. In Abbildung 4.2 ist die Lokalisation von ET_B -Rezeptoren im Sammelrohrsystem der Niere einer Wildtyp-Maus zu erkennen. Es erfolgte die Färbung des ET_B -Rezeptors (grün) und von Aquaporin 2 (AQP2, rot). AQP2 fungiert hierbei als spezifischer Marker für das Sammelrohr. Kollokationen erscheinen gelb und weisen auf ein gleichzeitiges Vorliegen des ET_B -Rezeptors und von AQP2 hin. Abbildung 4.2 kann man eine dichte Lokalisation des ET_B -Rezeptors in großen Teilen des Sammelrohrsystems entnehmen.

Abbildung 4.3 zeigt die Verteilung von ET_B -Rezeptoren im Tubulussystem der Niere einer Wildtyp-Maus nach Stimulation mit Lowsalt-Diät und Enalapril. Der ET_B -Rezeptor ist grün dargestellt, blau fluoreszierendes Calbindin fungiert als Marker für den distalen Tubulus. Daraus lässt sich auf die Expression des ET_B -Rezeptors in einigen Abschnitten des distalen Tubulus schließen. Allerdings ist die Rezeptordichte im Tubulussystem deutlich geringer als im Sammelrohrsystem. Abbildung 4.4 zeigt die Lokalisation des ET_A -Rezeptors im proximalen Tubulus der Niere einer Maus. Blaue Strukturen weisen auf den für den proximalen Tubulus charakteristischen Marker Megalin hin, grünlich imponierende Elemente im proximalen Tubulus lassen die ET_A -Rezeptoren erkennen. Kollokationen beider Strukturen treten optisch deutlich hervor. Abbildung 4.4 belegt damit das Vorhandensein des ET_A -Rezeptors im proximalen Tubulus einer Mäuseniere.

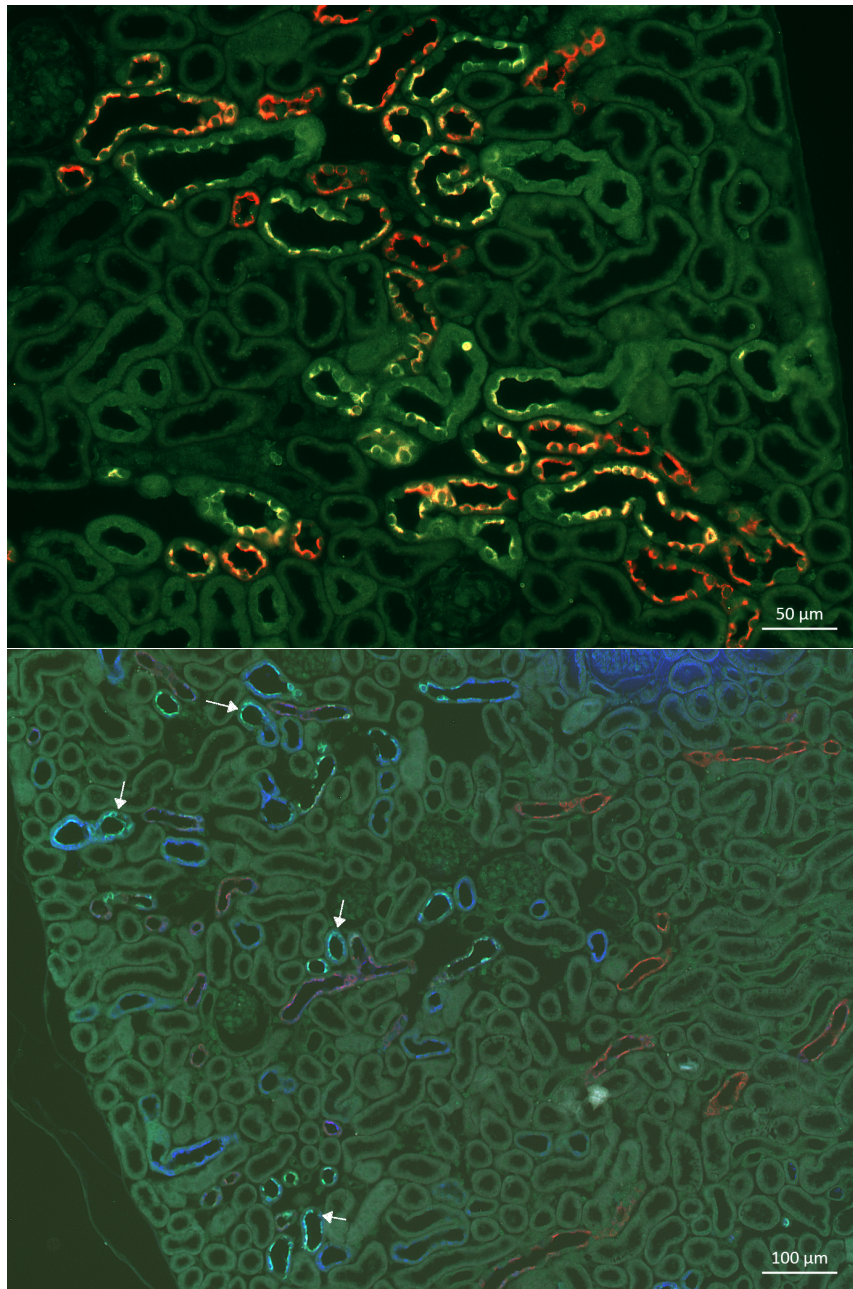


Abbildung 4.2: **Oben:** Lokalisation von ET_B -Rezeptoren im Sammelrohr der Niere einer Wildtyp-Maus. Färbung des ET_B -Rezeptors (grün) und von Aquaporin 2 (AQP2, rot). Kolokalisationen erscheinen gelb. Vergrößerung 200fach.

Abbildung 4.3: **Unten:** Lokalisation des ET_B -Rezeptors im distalen Tubulus der Niere einer Wildtyp-Maus (Pfeile). Färbung: ET_B -Rezeptor (grün), Calbindin (blau) als Marker für den distalen Tubulus, Aktin (rot). Vergrößerung 100fach.

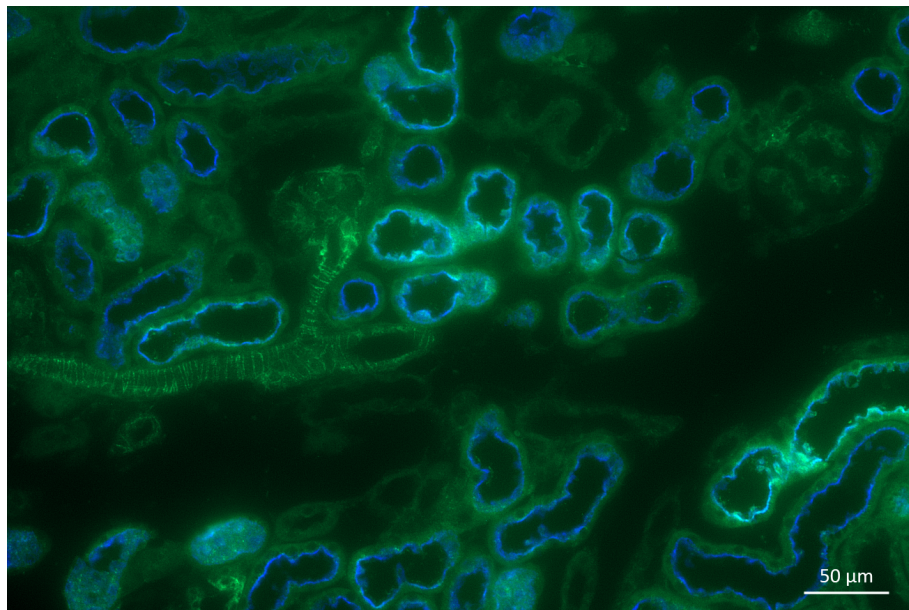


Abbildung 4.4: Lokalisation von ET_A-Rezeptoren im proximalen Tubulus der Niere einer Wildtyp-Maus. Färbung des ET_A-Rezeptors (grün) und von Megalin (blau). Vergrößerung 200fach.

4.2 Elektrolyt- und Osmolalitätsmessungen

Anhand der oben dargestellten histologischen Aufnahmen ist die Lokalisation der beiden Endothelin-Rezeptorsubtypen in Gefäß- und Tubulussystem einer Mäuseriere ersichtlich. Hinsichtlich einer deutlichen Expression dieser Rezeptoren in für die Harnbildung relevanten Strukturen, insbesondere im Vas afferens sowie im Tubulus- und Sammelrohrsystem, drängt sich die Frage auf, ob eine Blockade der Endothelinrezeptoren Auswirkungen auf die Urinkonzentrationen von Elektrolyten oder der Urinosmolalität nach sich zieht. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6-Mäusen über einen Zeitraum von zehn Tagen intraperitoneal Endothelinrezeptor-Antagonisten injiziert. Bei einer ersten Versuchsgruppe erfolgte die Blockade der ET_A-Rezeptoren mit Hilfe von BQ610, bei einer weiteren die Blockade der ET_B-Rezeptoren durch Verabreichung von BQ788, bei einer dritten wurde die Blockade beider Endothelin-Rezeptoren durch Injektion von Bosentan vollzogen. Mäusen der Kontrollgruppe wurde stattdessen jeweils über denselben Zeitraum intraperitoneal in Wasser gelöstes NaCl (Vehikel) verabreicht. Die Ergebnisse dieser Versuche im Hinblick auf die Urinkonzentration von Natrium und Kalium sowie die Urinosmolalität seien in den nachstehenden Balkendiagrammen wiedergegeben.

4.2.1 Elektrolyte

4.2.1.1 Kalium

Im Falle der BQ610-Versuchsgruppe zeigte sich eine erniedrigte Kalium-Konzentration im Urin der Tiere (369.7 (Mittelwert) ± 6.982 mmol/l (SEM)) im Vergleich zur Kontrollgruppe (434.9 ± 11.2 mmol/l), siehe Abbildung 4.5. Im durchgeführten *t*-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied der beiden Werte ($P < 0.0001$). Die Urin-Kalium-Konzentration der BQ-788-Versuchsgruppe zeigte sich im Vergleich zum Vehikel nicht signifikant erniedrigt (446.7 ± 6.982 mmol/l gegenüber 477.6 ± 13.51 mmol/l). In der Bosentan-Versuchsgruppe war die Kalium-Konzentration des Urins in der Versuchsgruppe nicht signifikant verändert (473.9 ± 22.12 mmol/l gegenüber 456.3 ± 10.21 mmol/l), wie Abbildung 4.5 zu entnehmen ist.

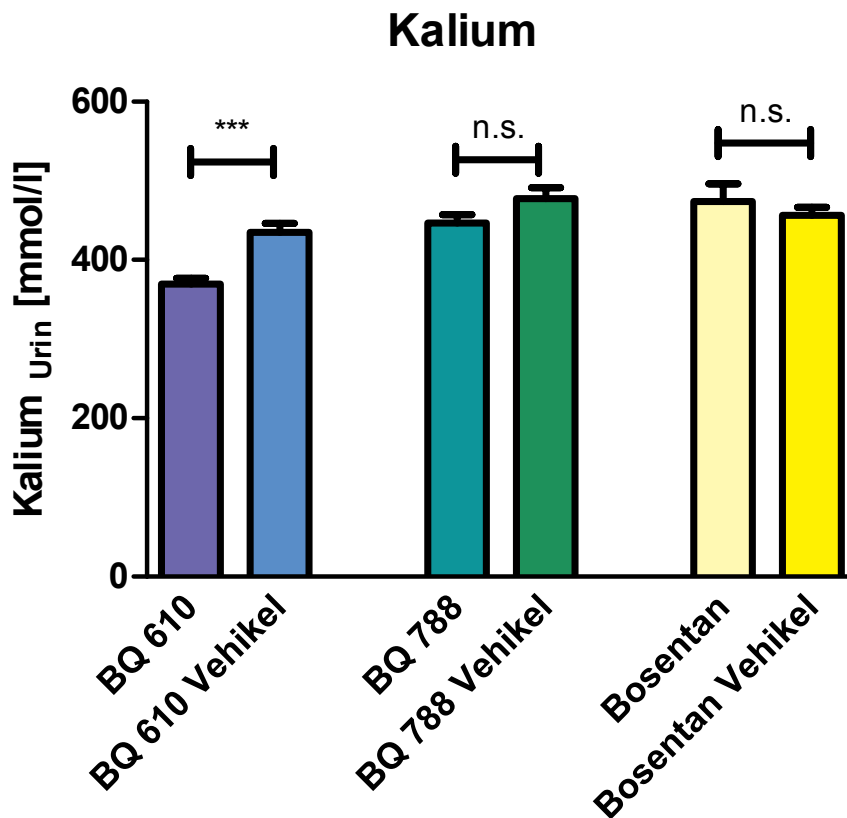


Abbildung 4.5: Graphische Gegenüberstellung der Kalium-Konzentrationen im Urin der C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit den Endothelin-Rezeptor-Antagonisten BQ610, BQ788 sowie Bosentan und des unbehandelten Wildtyps als Kontrollgruppe (Vehikel). ***: $P < 0.0001$ (signifikant).

4.2.1.2 Natrium

Bei der Untersuchung des Natriumgehalts ergab sich folgendes Bild: Im Falle der BQ610-Versuchsgruppe (Abbildung 4.6) imponiert eine signifikant erniedrigte Natrium-Konzentration (119.6 ± 4.892 mmol/l) im Urin der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (132.4 ± 5.284 mmol/l, $P = 0.0141$). Die Urin-Natrium-Konzentration der BQ-788-Versuchsgruppe (119.8 ± 5.227 mmol/l) war im Vergleich zum Vehikel (135.5 ± 6.504 mmol/l) nicht signifikant erniedrigt. Die Natrium-Konzentration des Urins war im Falle der Bosentan-Versuchsgruppe deutlich reduziert

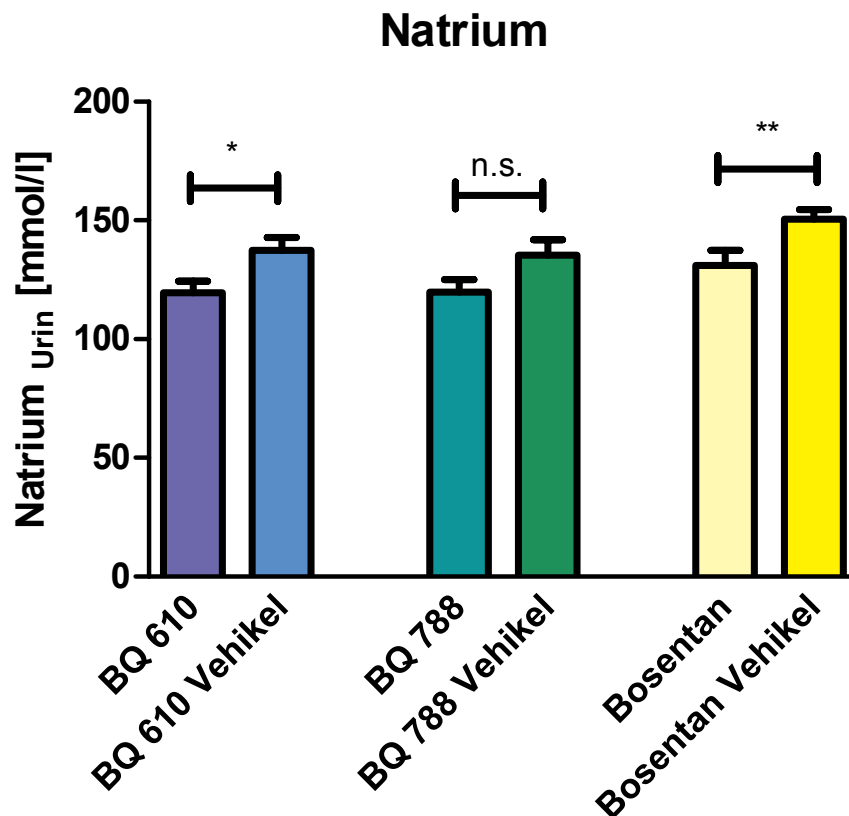


Abbildung 4.6: Graphische Gegenüberstellung der Natrium-Konzentrationen im Urin der C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit den Endothelin-Rezeptor-Antagonisten BQ610, BQ788 sowie Bosentan und des unbehandelten Wildtyps als Kontrollgruppe (Vehikel). *: $P = 0.0141$ (signifikant); **: $P = 0.009$ (signifikant).

(131.2 ± 6.192 mmol/l gegenüber 150.6 ± 3.996 mmol/l), im t -Test konnte ein signifikanter Unterschied ($P = 0.009$) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.6). Bei Blockade des ET_A -Rezeptors zeigt sich somit eine signifikante, wenngleich geringfügige Abnahme der Natrium-Konzentration.

4.2.2 Osmolalität

Bei der Untersuchung der Urin-Osmolalität ergibt sich ein inhomogeneres Bild: Während die Osmolalität im Falle der BQ-610-Versuchsgruppe (siehe Abbildung 4.7) signifikant erniedrigt ist (2.766 ± 0.073 mmol/l gegenüber 3.195 ± 0.101 mmol/l,

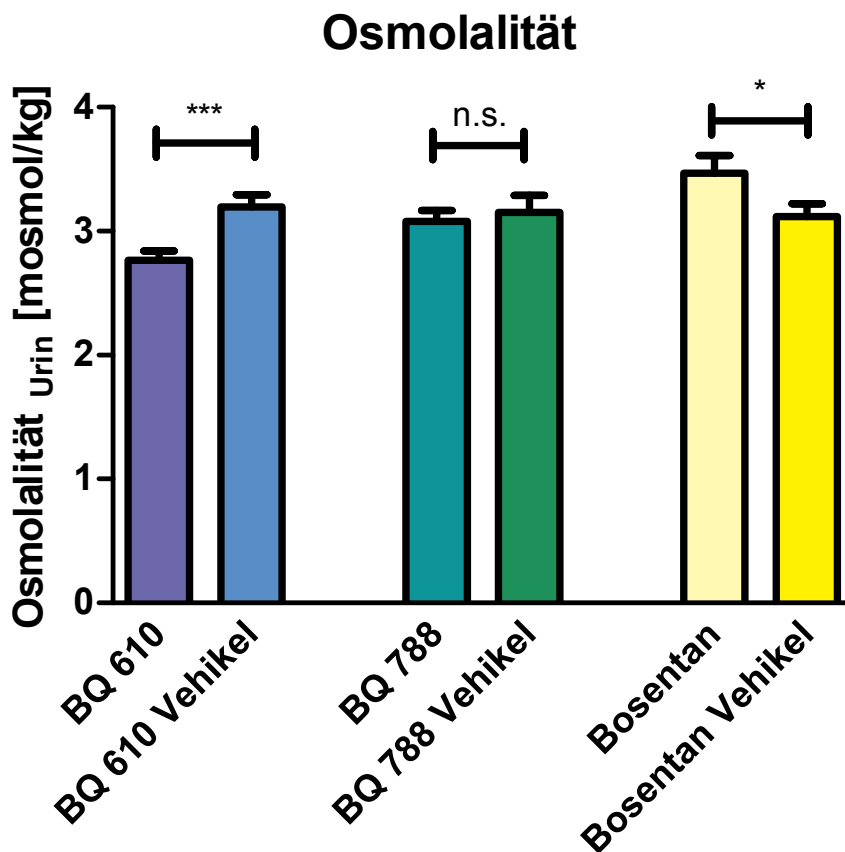


Abbildung 4.7: Graphische Gegenüberstellung der Urin-Osmolalität der C57BL/6-Mäuse nach Behandlung mit dem jeweiligen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und des unbehandelten Wildtyps als Kontrollgruppe (Vehikel). ***: $P = 0.0008$ (signifikant); *: $P = 0.0444$ (signifikant).

$P = 0.0008$), zeigt sich im Falle der BQ-788-Versuchsgruppe (3.078 ± 0.089 mmol/l) kein Unterschied der Urinosmolalität im Vergleich zum Vehikel (3.151 ± 0.139 mmol/l). Im t -Test wurde die Nicht-Signifikanz des Ergebnisses bestätigt, wie in Abbildung 4.7 wiedergegeben ist. Hingegen präsentiert sich die Osmolalität im Falle der Bosentan-Versuchsgruppe (3.470 ± 0.141 mmol/l), verglichen mit dem Vehikel (3.117 ± 0.104 mmol/l), erhöht. Im t -Test zeigte sich eine signifikante Differenz der Messwerte ($P = 0.0444$). Insgesamt zeigen sich geringe Veränderungen der Osmolalität.

4.3 Einfluss von Endothelin auf die Reninexpression – Qualitative und quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters

Von zentraler Bedeutung in der vorliegenden Arbeit ist die Frage nach dem Einfluss von Endothelin auf die Reninexpression. Zur Beleuchtung dieses Aspekts erfolgt die Auswertung der Renin-mRNA-Level der pharmakologisch behandelten Mäuse nach Blockade der Endothelinrezeptoren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüber hinaus erscheint es relevant, den Einfluss der Blockade der Endothelinrezeptoren direkt auf die Expression dieser Rezeptorsubtypen zu erforschen. Aus diesem Grund schließt sich die Analyse der mRNA-Abundanz von ET_A und ET_B an. Die erhobenen Ergebnisse bezüglich der pharmakologischen Blockade der Endothelinrezeptoren werden um Untersuchungen an $ET_A^{fl/fl}$ - und genetisch veränderten $Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}$ -Mäusen ergänzt mit dem Ziel, Aussagen über die Einflussnahme des reninzellspezifischen ET_A -Rezeptors auf die Steuerung des Reninsystems treffen zu können. Daran schließt sich die Analyse histologischer Aufnahmen von Nierenschnitten bezüglich des Reninexpressionsmusters der jeweiligen Versuchstiere an. Zur Vervollständigung dieses Abschnitts werden die Ergebnisse der dreidimensionalen Rekonstruktionen präsentiert. Um das Reninexpressionsmuster sowie das renale Gefäßsystem möglichst realitätsnah darzustellen, wurde mit Hilfe des 3D-Rekonstruktionsprogramms Amira eine räumliche Rekonstruktion der Renin- und Glattmuskelaktinimmunfluoreszenzsignale erstellt. Somit liegt der Fokus zugrundeliegender Untersuchungen sowohl auf einer quantitativen als auch qualitativen Analyse des Reninexpressionsmusters, um Aussagen über den Einfluss von Endothelinen auf die Reninexpression treffen zu können.

4.3.1 mRNA-Analyse

4.3.1.1 Renin-mRNA-Analyse

Bei der Auswertung der Renin-mRNA-Level der Versuchstiere nach pharmakologischer Blockade der Endothelin-Rezeptoren mit den hier verwendeten Substanzen

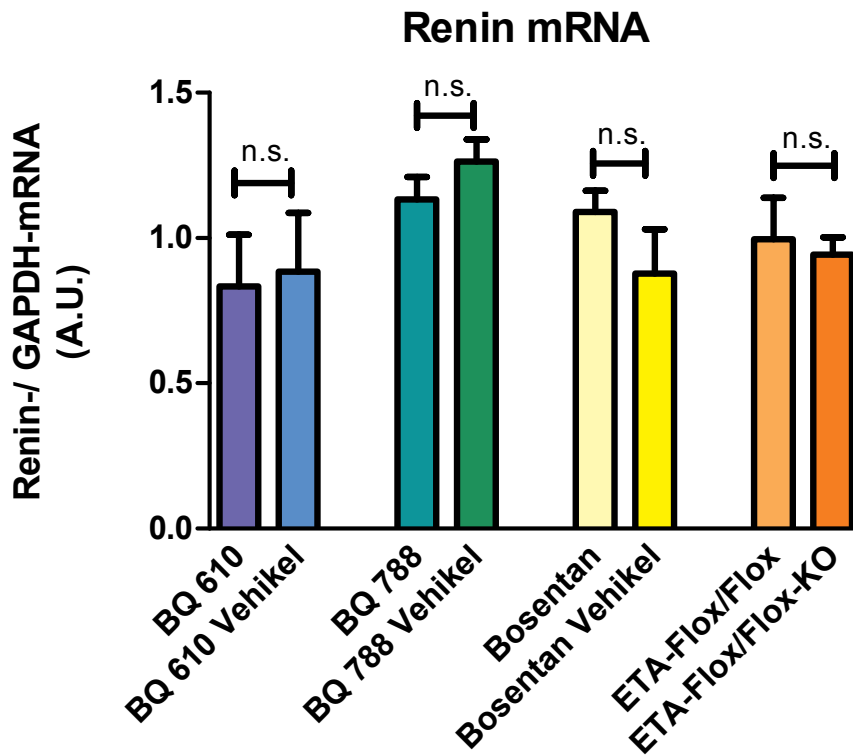


Abbildung 4.8: Überblick über die Renin-mRNA-Abundanz der oben dargelegten Versuchsanordnungen.

präsentiert sich folgendes Bild: Im Falle der BQ-610- und BQ-788-Versuchsgruppen ist die Renin-mRNA-Abundanz im Vergleich zum Vehikel nahezu unverändert (0.833 ± 0.179 mmol/l gegenüber 0.884 ± 0.203 mmol/l und 1.133 ± 0.078 mmol/l gegenüber 1.263 ± 0.076 mmol/l), siehe Abbildung 4.8. Dieses Verhältnis ist bei der Bosentan-Versuchsgruppe (1.089 ± 0.074 mmol/l) zum dazugehörigen Vehikel (0.878 ± 0.152 mmol/l) ebenfalls ohne signifikante Abweichung, wie Abbildung 4.8 zu entnehmen ist. Die statistische Untersuchung weist auf die Geringfügigkeit der jeweiligen Differenzen hin: Weder in der BQ-610-, noch in der BQ-788- oder in der Bosentan-Versuchsgruppe zeigten sich signifikante Unterschiede der Renin-mRNA-Expression im Vergleich zum jeweiligen Vehikel. Die Untersuchung des Renin-/GAPDH-mRNA-Verhältnisses zwischen $ET_A^{fl/fl}$ - und $Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}$ -Mäusen weist ein nicht signifikant verändertes Verhältnis bei den Wildtyp-Mäusen auf (0.995 ± 0.143 mmol/l gegenüber 0.943 ± 0.064 mmol/l), siehe Abbildung 4.8.

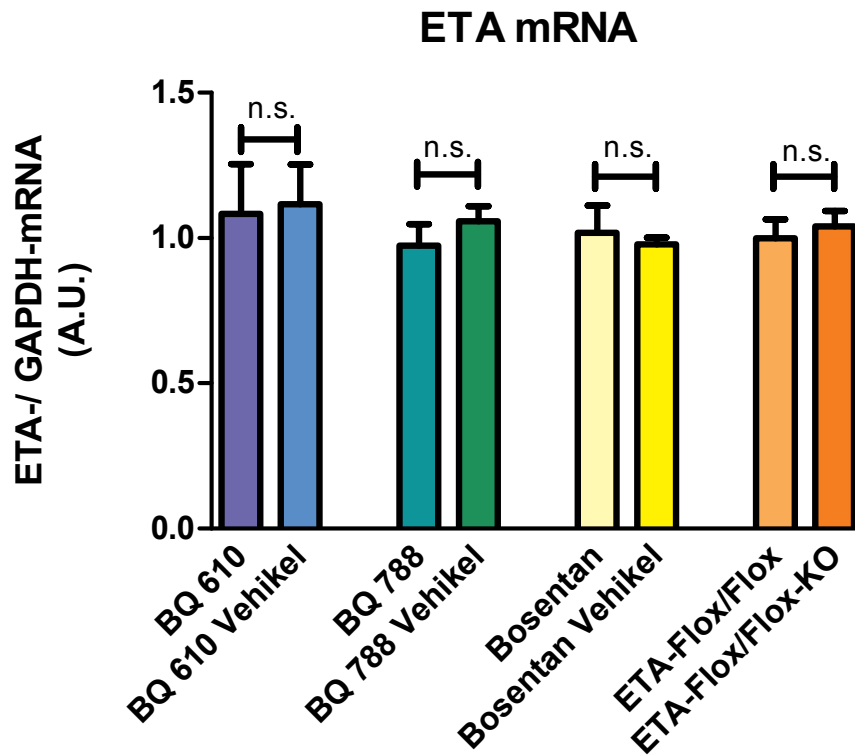


Abbildung 4.9: Überblick über die ET_A -mRNA-Abundanz der oben dargelegten Versuchsanordnungen.

Eine Zusammenstellung der Renin-mRNA-Daten in einem gemeinsamen Balkendiagramm findet sich in Abbildung 4.8. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu entnehmen, weder bei pharmakologischer Blockade noch bei genetischer Deletion.

4.3.1.2 ET_A -mRNA-Analyse

Die Untersuchung der ET_A -mRNA-Level förderte folgende Ergebnisse zu Tage: Sowohl in der BQ-610- als auch in der BQ-788-Versuchsgruppe war die ET_A -mRNA-Expression im Vergleich zum jeweiligen Vehikel nicht signifikant reduziert (1.084 ± 0.171 mmol/l gegenüber 1.116 ± 0.137 mmol/l und 0.974 ± 0.074 mmol/l gegenüber 1.058 ± 0.051 mmol/l), ein signifikanter Unterschied konnte im *t*-Test aber nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.9). Im Falle der Bosentan-Versuchsgruppe (1.019 ± 0.094 mmol/l) war die ET_A -mRNA-Abundanz, verglichen mit dem Vehikel (0.978 ± 0.025 mmol/l), ebenfalls nicht signifikant verändert (Abbildung

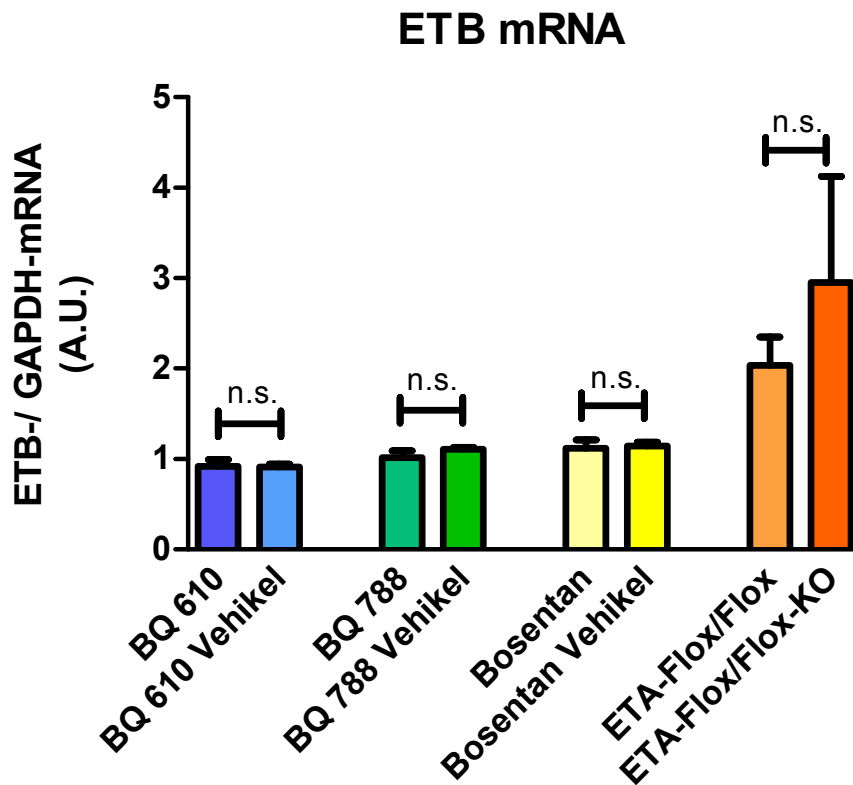


Abbildung 4.10: Überblick über die ET_B-mRNA-Abundanz der oben dargelegten Versuchsanordnungen.

4.9). Die Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäuse zeigten keine Abweichung der ET_A-mRNA-Expression im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (0.999 ± 0.065 mmol/l gegenüber 1.040 ± 0.053 mmol/l). Entsprechend war im *t*-Test kein signifikanter Unterschied feststellbar. Eine Zusammenschau der Balkendiagramme ist in Abbildung 4.9 auf Seite 82 dargestellt.

4.3.1.3 ET_B-mRNA-Analyse

Bei der Auswertung der ET_B-mRNA-Level zeigt sich folgendes Bild: In der BQ-610-Versuchsgruppe präsentiert sich eine kaum nennenswerte Erhöhung der ET_B-mRNA-Expression zugunsten der Versuchsgruppe (0.920 ± 0.072 mmol/l gegenüber 0.901 ± 0.036 mmol/l). Eine statistische Überprüfung der zugrundeliegenden Daten ergibt folgerichtig einen nicht-signifikanten Unterschied (siehe Abbil-

dung 4.10). Die ET_B -mRNA-Abundanz der BQ-788-Versuchsgruppe (1.014 ± 0.076 mmol/l) ist gegenüber der Kontrollgruppe (1.108 ± 0.020 mmol/l) nicht signifikant verringert (Abbildung 4.10). Im Falle der Bosentan-Versuchsgruppe (1.120 ± 0.090 mmol/l) zeigt sich nahezu keinerlei Unterschied der ET_B -mRNA-Expression im Vergleich zum Vehikel (1.142 ± 0.043 mmol/l). Der *t*-Test bestätigt die Nicht-Signifikanz, siehe Abbildung 4.10.

Eine deutlichere Differenz der ET_B -mRNA-Abundanz offenbart sich im Vergleich der $ET_A^{fl/fl}$ -Mäuse (2.037 ± 0.312 mmol/l) mit den $Ren-1d^{+/Cre}$ - $ET_A^{fl/fl}$ -Mäusen (2.850 ± 1.176 mmol/l). Nichtsdestoweniger ist dieser Unterschied nicht signifikant (siehe Abbildung 4.10). Ein vergleichender Überblick über die ET_B -mRNA-Expression ist in Abbildung 4.10 auf Seite 83 gegeben. Es zeigen sich keine Veränderungen der ET_B -Abundanz, im Falle der Knockout-Mäuse ist lediglich eine tendenzielle Erhöhung zu entnehmen.

4.3.2 Histologische Darstellung des Reninexpressionsmusters

Neben der rein statistischen Auswertung der Einflussnahme der Endothelinrezeptorblockade auf die Renin-, ET_A - und ET_B -mRNA-Level stellt sich auch die Frage, in welcher Hinsicht mögliche morphologische Veränderungen in den Nieren der pharmakologisch behandelten Tiere auf mikroskopischer Ebene zu erkennen sind. Zu diesem Zweck wurden histologische Aufnahmen von Paraffinschnitten von Nieren der Versuchstiere angefertigt und immunhistochemisch auf Glattmuskelaktin und Renin gefärbt.

4.3.2.1 C57BL/6-Maus – unbehandelt

Die mikroskopischen Aufnahmen der Kontrollgruppe fungieren als Referenz zur Beurteilung der weiteren histologischen Aufnahmen im Hinblick auf das Reninexpressionsmuster. In der histologischen Aufnahme der Niere einer unbehandelten C57BL/6-Maus (siehe Abbildung 4.11) ist die typische Lokalisation und Quantität reninbildender Zellen zu erkennen. Letztere befinden sich vornehmlich juxtaglomerulär am Ende der afferenten Arteriole.

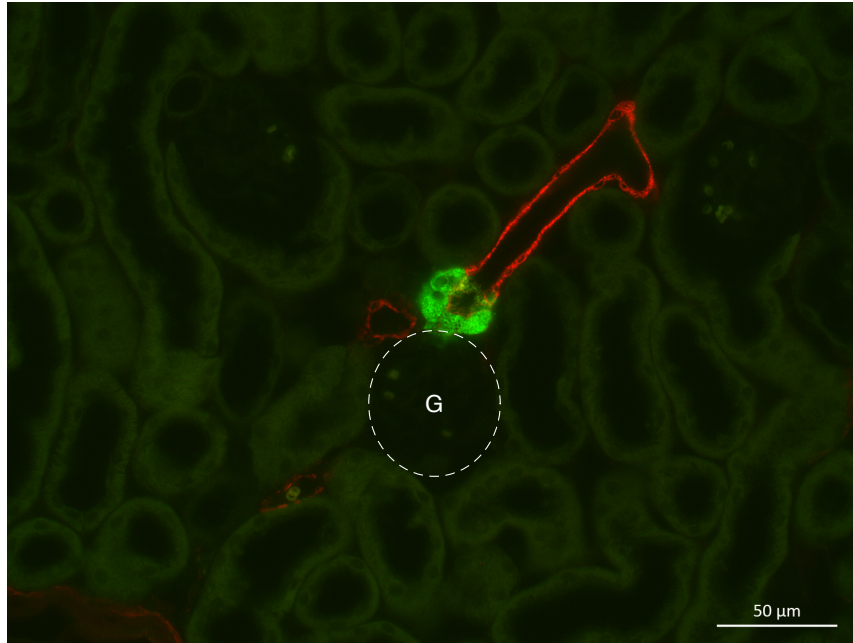


Abbildung 4.11: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer unbehandelten C57BL/6-Maus der Kontrollgruppe. Färbung der Immunreaktionen mit Glattmuskelaktin rot, Färbung der Immunreaktionen mit Renin grün. Typische juxtaglomeruläre Reninexpression im Bereich der afferenten Arteriole in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus (G). 400fache Vergrößerung.

4.3.2.2 C57BL/6-Maus – BQ610-Behandlung

Die Verabreichung des ET_A -Rezeptor-Antagonisten BQ 610 lässt in den histologischen Aufnahmen keinen augenscheinlichen Unterschied zur Kontrollgruppe erkennen. Die reninbildenden Zellen sind regelrecht ausschließlich juxtaglomerulär am terminalen Ende der afferenten Arteriole lokalisiert (siehe Abbildung 4.12).

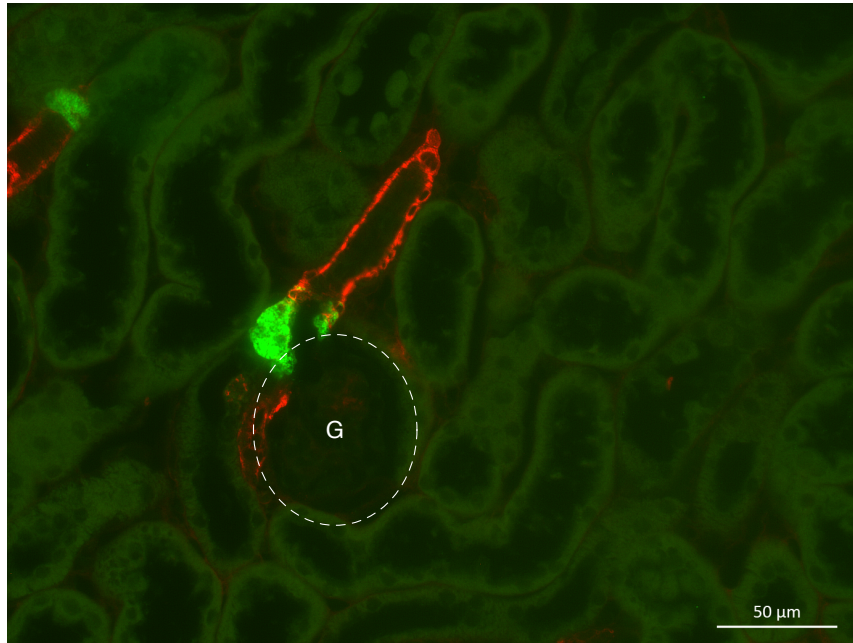


Abbildung 4.12: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer C57BL/6-Maus nach 10-tägiger Behandlung mit dem ET_A -Rezeptor-Antagonisten BQ 610. Färbung der Immunreaktion mit Glattmuskelaktin rot, Färbung der Immunreaktion mit Renin grün. Ausnahmslos typische juxtaglomeruläre Reninexpression im Bereich der afferenten Arteriole in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus (G). 400fache Vergrößerung.

4.3.2.3 C57BL/6-Maus – BQ788-Behandlung

Die Auswertung der histologischen Aufnahmen der Nierenschnitte der mit BQ 788 behandelten Tiere ergibt folgendes Bild: Die Darstellung ähnelt exakt dem des unbehandelten Wildtyps, die Lokalisation findet sich ausnahmslos juxtaglomerulär im terminalen Abschnitt des Vas afferens. Alle weiteren Anteile des Gefäßsystems weisen keine juxtaglomerulären Zellen auf. Sowohl die Lokalisation als auch die Menge des fluoreszierenden Renins erscheinen vollkommen normal. Die kubische Form der juxtaglomerulären reninbildenden Zellen ist gut zu erkennen (siehe Abbildung 4.13).

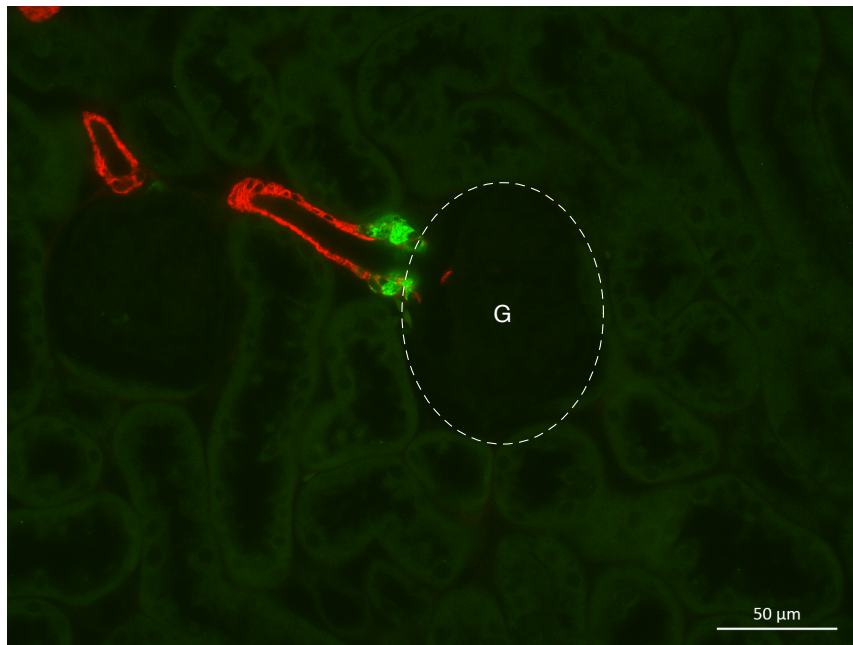


Abbildung 4.13: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer C57BL/6-Maus nach 10-tägiger Behandlung mit dem ET_B -Rezeptor-Antagonisten BQ 788. Färbung: Glattmuskelaktin rot, Renin grün. Ausnahmslos typische juxtaglomeruläre Reninexpression im Bereich der afferenten Arteriole in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus (G). 400fache Vergrößerung.

4.3.2.4 Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Maus – unbehandelt

Auch im Falle von Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäusen zeigen sich keine nennenswerten Abweichungen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die immunhistochemische Färbung auf Renin zeigt das Vorhandensein von reninproduzierenden Zellen ausschließlich juxtaglomerulär in der terminalen afferenten Arteriole (siehe Abbildung 4.14).

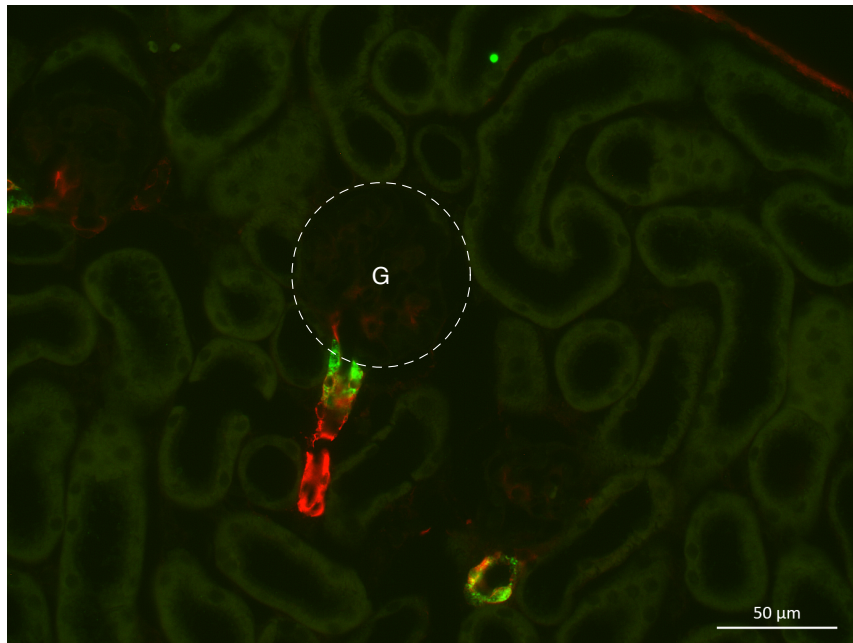


Abbildung 4.14: Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Maus nach Normalsalzdiät. Färbung der Immunreaktionen mit Glattmuskelaktin rot, Färbung der Immunreaktionen mit Renin grün. Typische juxtaglomeruläre Reninexpression im Bereich der afferenten Arteriole in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus (G). 400fache Vergrößerung.

4.3.3 Dreidimensionale Darstellung des Reninexpressionsmusters

Während eine rein zweidimensionale Aufnahme der Nierenschnitte nur einen ersten Eindruck der vorliegenden Gegebenheiten liefert, ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung einen plastischeren und transparenteren Zugang zu möglichen Veränderungen der Reninverteilung in der Niere der behandelten Tiere. Aus diesem Grund erfolgte im Anschluss an die Aufnahme der histologischen Serienschnitte eine dreidimensionale Rekonstruktion derselben. Auf sämtlichen Rekonstruktionen wurde der Ausschnitt so gewählt, dass jeweils ein arcuater Seitenast mit mehreren Arteriae interlobulares und den afferenten Arteriolen zu sehen ist. Die efferenten Arteriolen wurden bei der Rekonstruktion nur exemplarisch dargestellt.

4.3.3.1 C57BL/6-Maus – unbehandelt

Der rekonstruierte Gefäßbaum der unbehandelten C57BL/6-Maus (siehe Abbildung 4.15) dient als Referenz für die Beurteilung der weiteren Rekonstruktionen. Dieser Darstellung kann man die charakteristischerweise vorhandene Menge und Lokalisation reninbildender Zellen in der Niere entnehmen. Die reninproduzierenden Zellen befinden sich juxtaglomerulär am terminalen Abschnitt der afferenten Arteriole. An nahezu jedem Glomerulus findet Reninexpression statt. Im Bereich der Interlobulararterien sowie der arcuaten Seitenäste ist kein Renin lokalisiert.

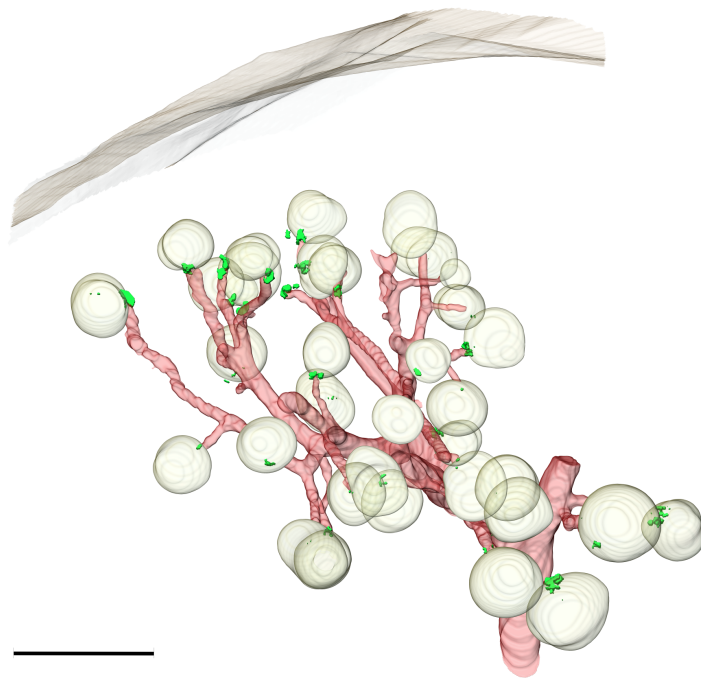


Abbildung 4.15: Gefäßbaumabschnitt einer adulten unbehandelten C57BL/6-Maus. 3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot), Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Maßstabsbalken 200 μm .

4.3.3.2 C57BL/6-Maus – BQ610-Behandlung

Die reninproduzierenden Zellen sind ausschließlich juxtaglomerulär am Ende der afferenten Arteriole lokalisiert. Interlobulararterie und arcuater Seitenast sind frei von Reninzellen. Das Reninexpressionsmuster präsentiert sich unverändert (siehe Abbildung 4.16).

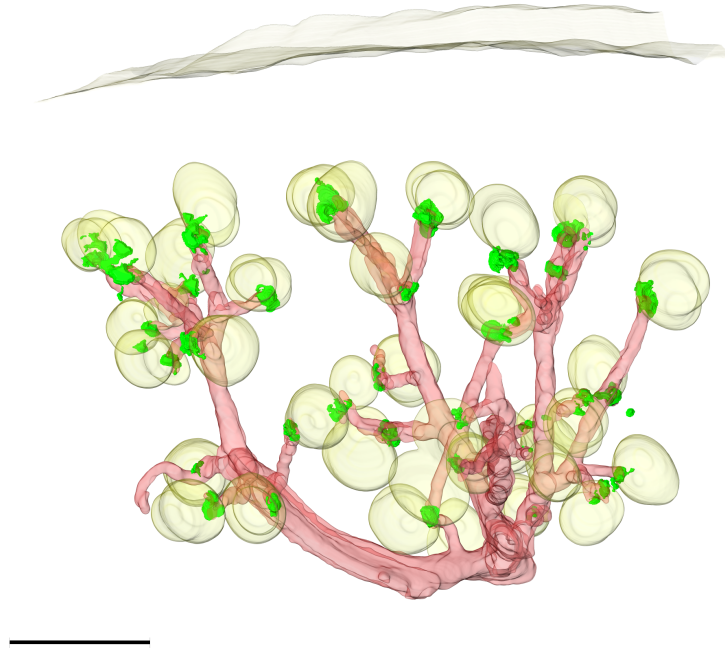


Abbildung 4.16: Gefäßbaumabschnitt einer adulten C57BL/6-Maus nach 10tägiger Behandlung mit dem ET_A -Rezeptor-Antagonisten BQ610. 3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot), Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Maßstabsbalken 200 μm .

4.3.3.3 C57BL/6-Maus – BQ788-Behandlung

Die histologischen Aufnahmen der mit BQ 788 behandelten Mäuse zeigen ebenfalls nur eine Reninexpression im Bereich der afferenten Arteriole. Die 3D-Rekonstruktion bestätigt die histologischen Aufnahmen in dieser Hinsicht vollständig. Im terminalen Abschnitt einer jeden afferenten Arteriole findet sich die Lokalisation reninproduzierender Zellen, deren Anzahl keinen offensichtlichen Unterschied im Vergleich mit dem unbehandelten Wildtyp aufweist. Die Interlobulararterien sind frei von reninbildenden Zellen. Das Reninexpressionsmuster stellt sich unverändert dar und beschränkt sich auf die juxtaglomerulären Abschnitte aller Glomeruli (siehe Abbildung 4.17).

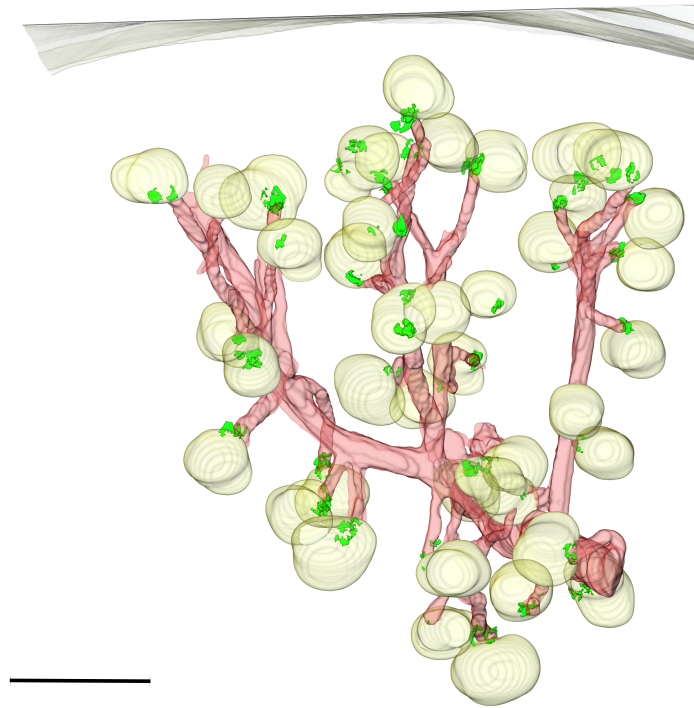


Abbildung 4.17: Gefäßbaumabschnitt einer adulten C57BL/6-Maus nach 10tägiger Behandlung mit dem ET_B-Rezeptor-Antagonisten BQ788. 3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot), Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Maßstabsbalken 200 µm.

4.3.3.4 Ren-1d^{+/-Cre}-ET_A^{fl/fl}-Maus – unbehandelt

Die dreidimensionale Rekonstruktion des arteriellen Gefäßbaums der Niere bestätigt im Falle der Ren-1d^{+/-Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäuse mit reninzellspezifischem ET_A-Knockout eine regelrechte Lokalisation der reninbildenden Zellen in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus am Ende der afferenten Arteriole.

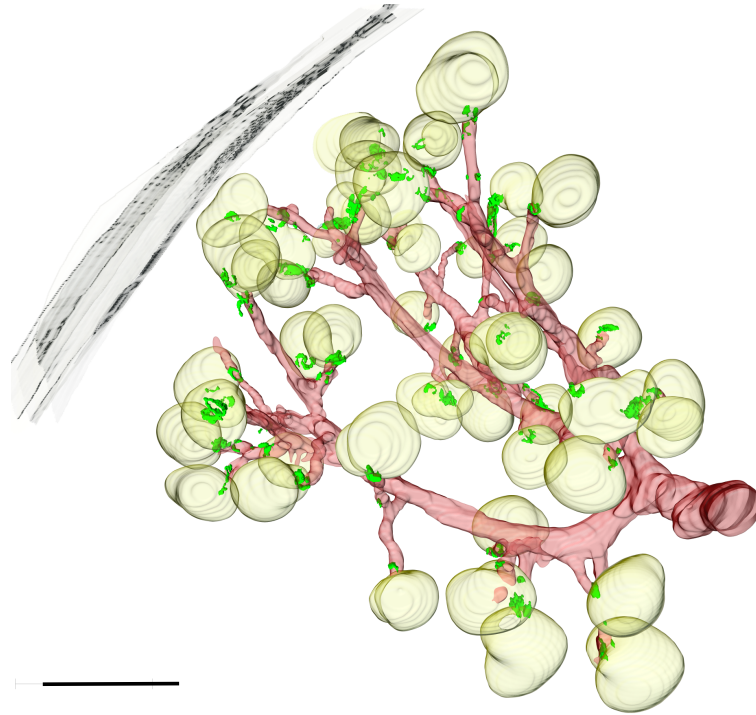


Abbildung 4.18: Gefäßbaumabschnitt einer adulten Ren-1d^{+/-Cre}-ET_A^{fl/fl}-Maus nach salzindifferenter Diät. 3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot), Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Maßstabsbalken 200 µm.

4.4 Bedeutung des ET_A-Rezeptors für die Stimulierbarkeit des Reninsystems

Die pharmakologische Blockade der Endothelinrezeptorsubtypen beleuchtet nur einen Aspekt in der Frage nach der Einflussnahme von Endothelinen auf die Expression von Renin in der Niere der Versuchstiere. Wie ändern sich die Ergebnisse, wenn wir nicht die Endothelinrezeptoren adulter Tiere durch Verabreichung von Pharmaka modulieren, sondern stattdessen einen Endothelinrezeptorsubtypen a priori auf genetischer Ebene via Knockout des in Reninzellen exprimierten Rezeptors ausschalten? Präziser formuliert: Welche Bedeutung besitzt der ET_A-Rezeptor für die Stimulation des Reninsystems? Zur Klärung dieser Frage betrachten wir Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäuse. Als Kontrollgruppe fungieren in diesem Fall gewöhnliche ET_A^{fl/fl}-Mäuse mit intaktem ET_A-Rezeptor. Dabei wollen wir uns in der vorliegenden Arbeit nicht allein auf die Gegenüberstellung von Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäusen mit solchen der Kontrollgruppe beschränken: Die Versuchsanordnung soll zudem um die Stimulation des RAAS dieser Tiere durch eine Niedrigsalzdiät und Enalapril-haltiges Trinkwasser ergänzt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse bezüglich der qualitativen sowie quantitativen Analyse des Reninexpressionsmusters im Hinblick auf den Einfluss von Endothelin auf die Reninexpression dargestellt. Zunächst erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der Auswertung der mRNA-Analyse von Renin, des ET_A- und des ET_B-Rezeptors. Daran schließt sich die Analyse histologischer Aufnahmen von Nierenschnitten hinsichtlich des Reninexpressionsmusters an. Zur Vervollständigung dieses Abschnitts werden die Ergebnisse der dreidimensionalen Rekonstruktionen, wiederum unter dem Aspekt der Reninexpression, präsentiert.

4.4.1 mRNA-Analyse

4.4.1.1 Renin-mRNA-Analyse

Die Renin-mRNA-Expression ist bei salzindifferentener Ernährung bei ET_A^{fl/fl}-Mäusen im Vergleich zu den Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäusen nicht signifikant gesteigert

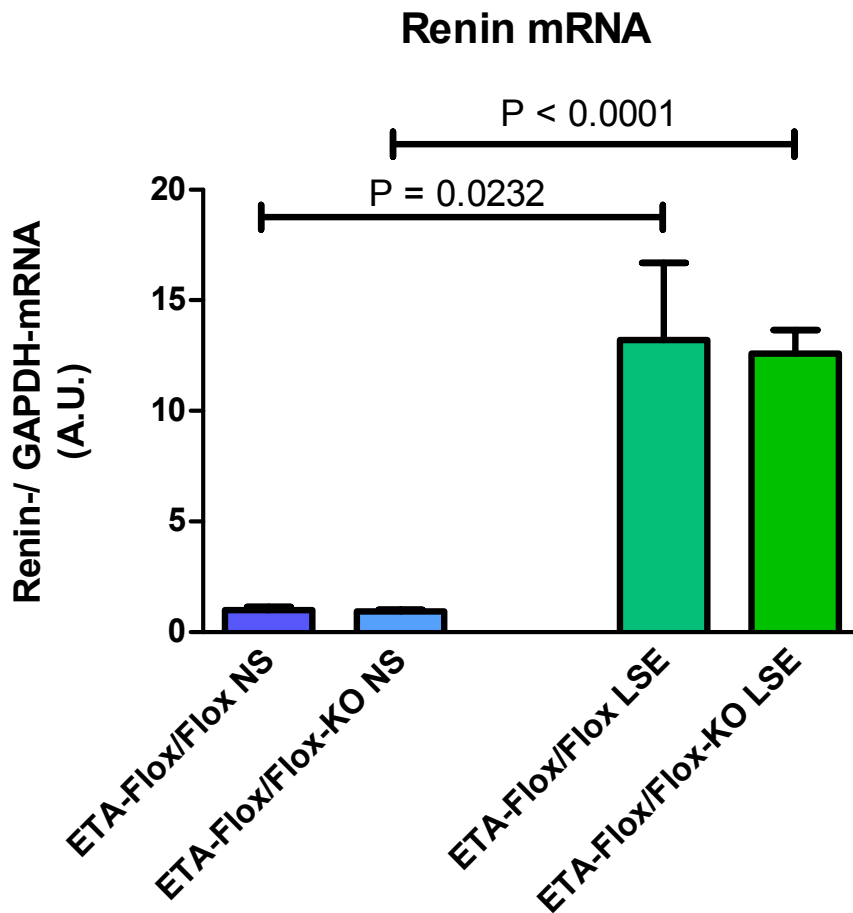


Abbildung 4.19: Überblick über die Renin-mRNA-Expression der $ET_A^{fl/fl}$ - und $Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}$ -Mäuse unter Normalsalz-Ernährung und Stimulation.

(0.995 ± 0.143 mmol/l gegenüber 0.943 ± 0.060 mmol/l), vergleiche Abbildung 4.19. Auch im Falle stimulierter Tiere ist das Renin-/GAPDH-mRNA-Verhältnis der $ET_A^{fl/fl}$ -Mäuse unverändert (13.21 ± 3.489 mmol/l gegenüber 12.60 ± 1.066 mmol/l), es besteht kein signifikanter Unterschied (Abbildung 4.19). Aus Abbildung 4.19 ist ersichtlich, dass die Renin-mRNA-Abundanz der stimulierten Tiere deutlich höher ist als das der Tiere mit Normalsalz-Diät. Der *t*-Test ergibt eine signifikante Abweichung sowohl im Falle der $ET_A^{fl/fl}$ -Mäuse ($P = 0.0232$) als auch im Falle der $Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}$ -Mäuse ($P < 0.0001$). Zwischen den Genotypen allerdings liegt keine signifikante Veränderung der Reninexpression vor.

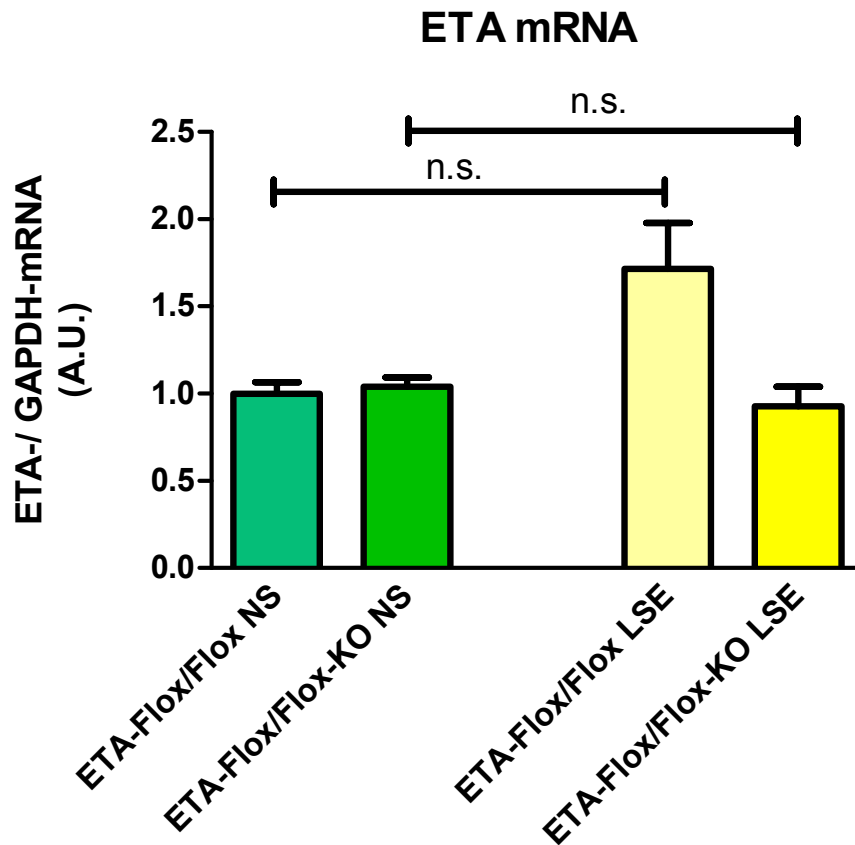


Abbildung 4.20: Überblick über die ET_A -mRNA-Expression der $ET_A^{fl/fl}$ - und $Ren-1d^{+/Cre}$ - $ET_A^{fl/fl}$ -Mäuse unter Normalsalz-Ernährung und Stimulation.

4.4.1.2 ET_A -mRNA-Analyse

Wie aber stellt sich die ET_A -mRNA-Abundanz unter stimulierten Bedingungen dar? Wie aus Abbildung 4.20 hervorgeht, ist das ET_A -Verhältnis bei $Ren-1d^{+/Cre}$ - $ET_A^{fl/fl}$ -Mäusen nahezu unverändert zu den $ET_A^{fl/fl}$ -Mäusen (0.999 ± 0.065 mmol/l gegenüber 1.040 ± 0.053 mmol/l). Unter stimulierten Bedingungen hingegen ergibt sich folgendes Bild: Die ET_A -mRNA-Expression liegt bei den stimulierten $ET_A^{fl/fl}$ -Mäusen (1.715 ± 0.264 mmol/l gegenüber 0.928 ± 0.113 mmol/l) signifikant höher als bei stimulierten Knockout-Mäusen ($P = 0.0205$, siehe Abbildung 4.20). Allerdings besteht bezüglich der ET_A -mRNA-Abundanz kein signifikanter Unterschied hinsichtlich stimulierter und nicht-stimulierter Versuchstiere. Die Stimulation des

Wildtyps zieht einen Anstieg der ET_A-mRNA-Abundanz nach sich, eine Stimulation der Knockout-Mäuse hingegen nicht (siehe Abbildung 4.20).

4.4.1.3 ET_B-mRNA-Analyse

Die Auswertung der ET_B-mRNA-Expression komplettiert den Abschnitt über die quantitative mRNA-Analyse. Das ET_B-/GAPDH-mRNA-Verhältnis ist unter Normalsalz-Bedingungen zugunsten der Ren-1d^{+Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäuse nicht signifikant erhöht (2.037 ± 0.312 mmol/l gegenüber 2.950 ± 1.176 mmol/l), wie Abbildung 4.21 zu entnehmen ist. Im Falle stimulierter Tiere ist dieser Unterschied zwar noch ausgeprägter (1.477 ± 0.464 mmol/l gegenüber 5.688 ± 3.305 mmol/l), siehe Abbildung 4.21, aber ebenfalls nicht signifikant. In der Zusammenschau der Diagramme besteht zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Versuchstieren kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 4.21 auf Seite 98).

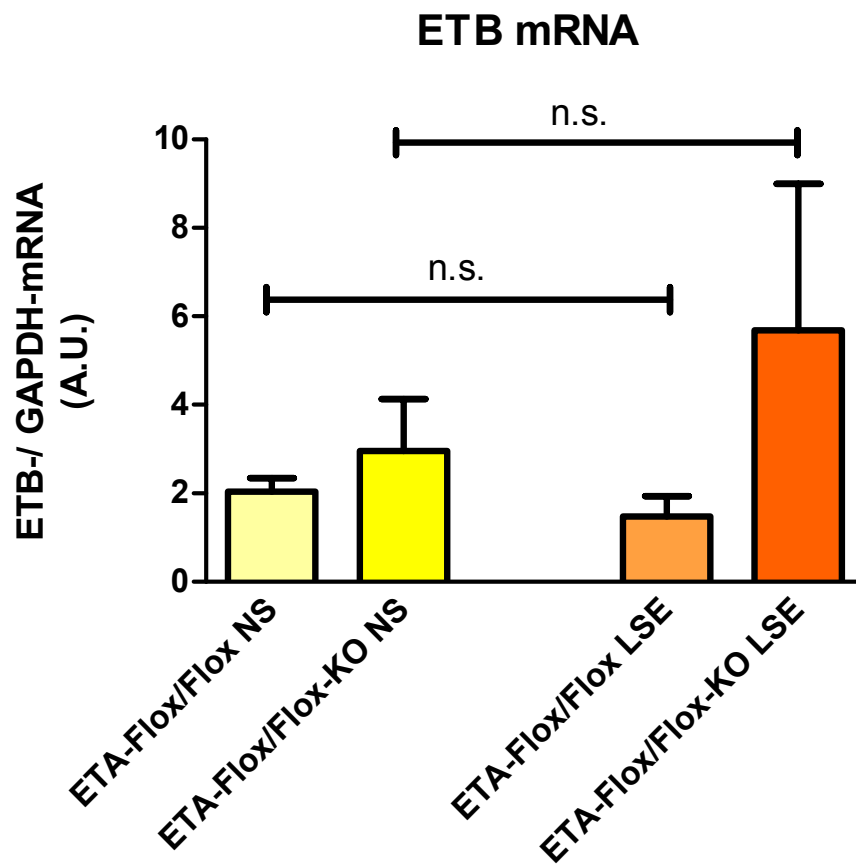


Abbildung 4.21: Überblick über die ET_B -mRNA-Expression der $ET_A^{fl/fl}$ - und $Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}$ -Mäuse unter Normalsalzbehandlung und Stimulation.

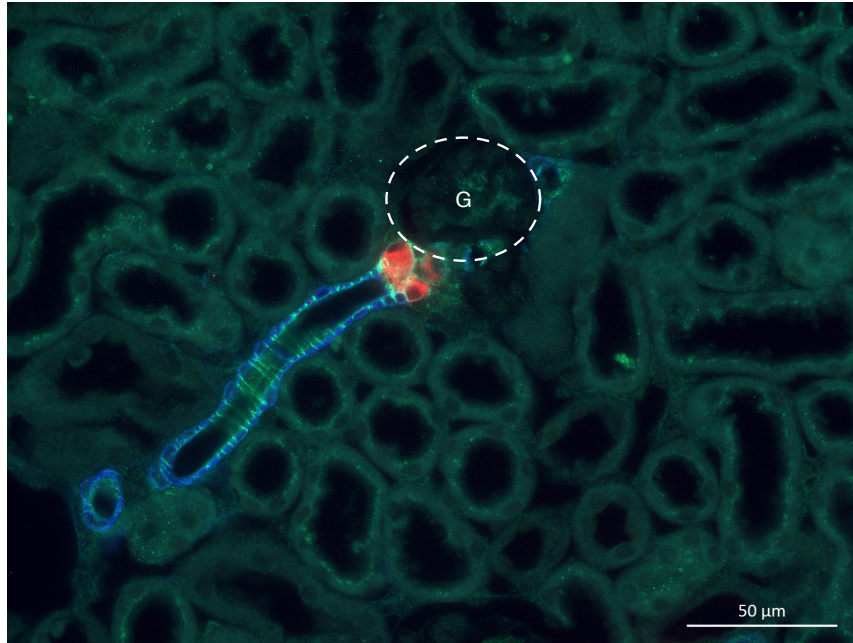


Abbildung 4.22: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer unbehandelten Wildtyp-Maus. Färbung: Aktin blau, Renin rot, ET_A-Rezeptoren grün. Vergrößerung 400fach.

4.4.2 Histologische Darstellung des Reninexpressionsmusters

Der Fokus des restlichen Kapitels liegt auf histologischen Aufnahmen und der dreidimensionalen Rekonstruktion. Zunächst seien die histologischen Aufnahmen nach immunhistochemischer Färbung der Strukturen Glattmuskelaktin und Renin dargestellt.

4.4.2.1 Wildtyp-Maus – unbehandelt

Auch hier dienen die mikroskopischen Aufnahmen der Kontrollgruppe als Referenz zur Beurteilung der weiteren histologischen Aufnahmen im Hinblick auf das Reninexpressionsmuster.

In der histologischen Aufnahme einer unbehandelten Wildtyp-Maus (siehe Abbildung 4.22) ist die typische Lokalisation reninbildender Zellen zu erkennen. Letztere befinden sich ausschließlich juxtaglomerulär am Ende der afferenten Arteriole. Die

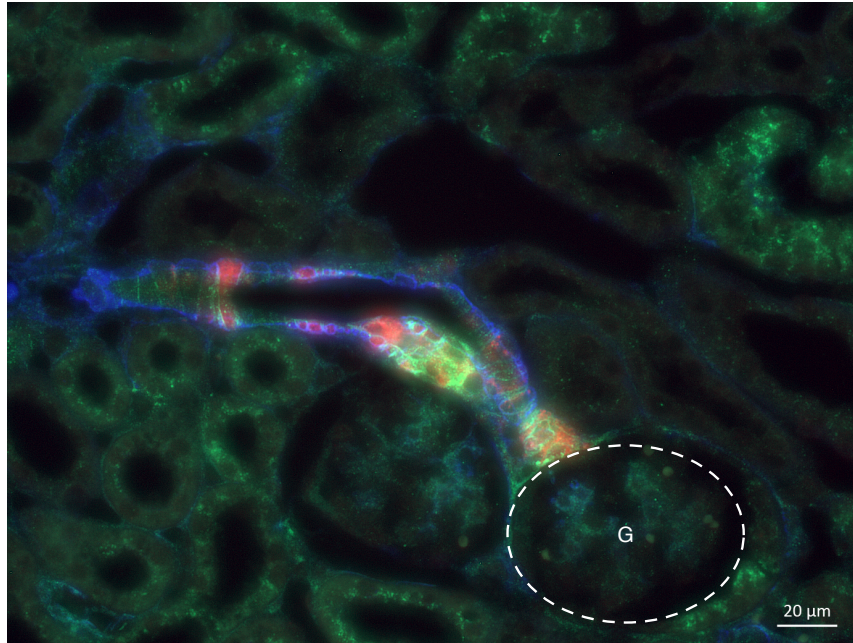


Abbildung 4.23: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus nach Stimulation mit Lowsalt-Diät und Enalapril. Färbung: Glattmuskulaktin blau, Renin rot, ET_A -Rezeptoren grün. Juxtaglomeruläre Reninexpression im Bereich der afferenten Arteriole in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus (G), retrograde Rekrutierung von Reninzellen entlang der afferenten Arteriole. 400fache Vergrößerung.

Färbung der ET_A -Rezeptoren kann sowohl in den glatten Muskelzellen der afferenten Arteriola als auch in den juxtaglomerulären Reninzellen beobachtet werden.

4.4.2.2 Wildtyp-Maus – Lowsalt-Enalapril-Behandlung

Im Falle der stimulierten $ET_A^{fl/fl}$ -Maus weicht das Bild deutlich vom nicht-stimulierten Wildtypen ab: Neben unmittelbar juxtaglomerulär lokalisiertem Renin finden sich über das gesamte Vas afferens die kubischen Reninzellen verstreut. Nach Stimulation des RAAS-Systems der Versuchstiere tritt eine retrograde Rekrutierung zutage (siehe Abbildung 4.23).

4.4.2.3 Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Maus – unbehandelt

Im Falle von Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäusen zeigen sich keine nennenswerten Abweichungen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die immunhistochemische Färbung auf Renin zeigt das Vorhandensein von reninproduzierenden Zellen ausschließlich juxtaglomerulär in der terminalen afferenten Arteriole, siehe Abbildung 4.24. Wie das untere Bild in Abbildung 4.24 demonstriert, liegt ein reninzellspezifischer Knockout der ET_A-Rezeptoren vor, während im Vas afferens noch ET_A-Rezeptoren exprimiert werden. Dies bestätigt die Funktionstüchtigkeit des vorliegenden genetischen Modells.

4.4.2.4 Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Maus – Lowsalt-Enalapril-Behandlung

Folgende Ergebnisse resultieren aus der Stimulation der Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäuse mittels Nidrigsalz-Diät und Verabreichung von Enalapril: Hierunter zeigt sich zunächst die übliche Lokalisation kubischer, reninproduzierender Zellen im Bereich der terminalen afferenten Arteriole. Neben dieser juxtaglomerulären Lage ist eine deutliche retrograde Rekrutierung erkennbar. Diese ist einerseits im präterminalen Abschnitt der afferenten Arteriole zu finden, darüber hinaus auch in weiter proximal gelegenen Anteilen des Vas afferens. Die Intensität der Färbung im juxtaglomerulären Abschnitt imponiert verstärkt. In den Reninzellen können keine ET_A-Rezeptoren nachgewiesen werden, es erscheinen keine Kolo-kalisationen. In der afferenten Arteriole allerdings sind ET_A-Rezeptoren nachweisbar, woraus sich schließen lässt, dass das genetische Modell insofern funktioniert, als tatsächlich die reninzellspezifische Expression von ET_A-Rezeptoren unterbunden wird (siehe Abbildung 4.25). Damit zeigt sich im Falle der Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Mäuse dasselbe Rekrutierungsmuster wie im Wildtyp.

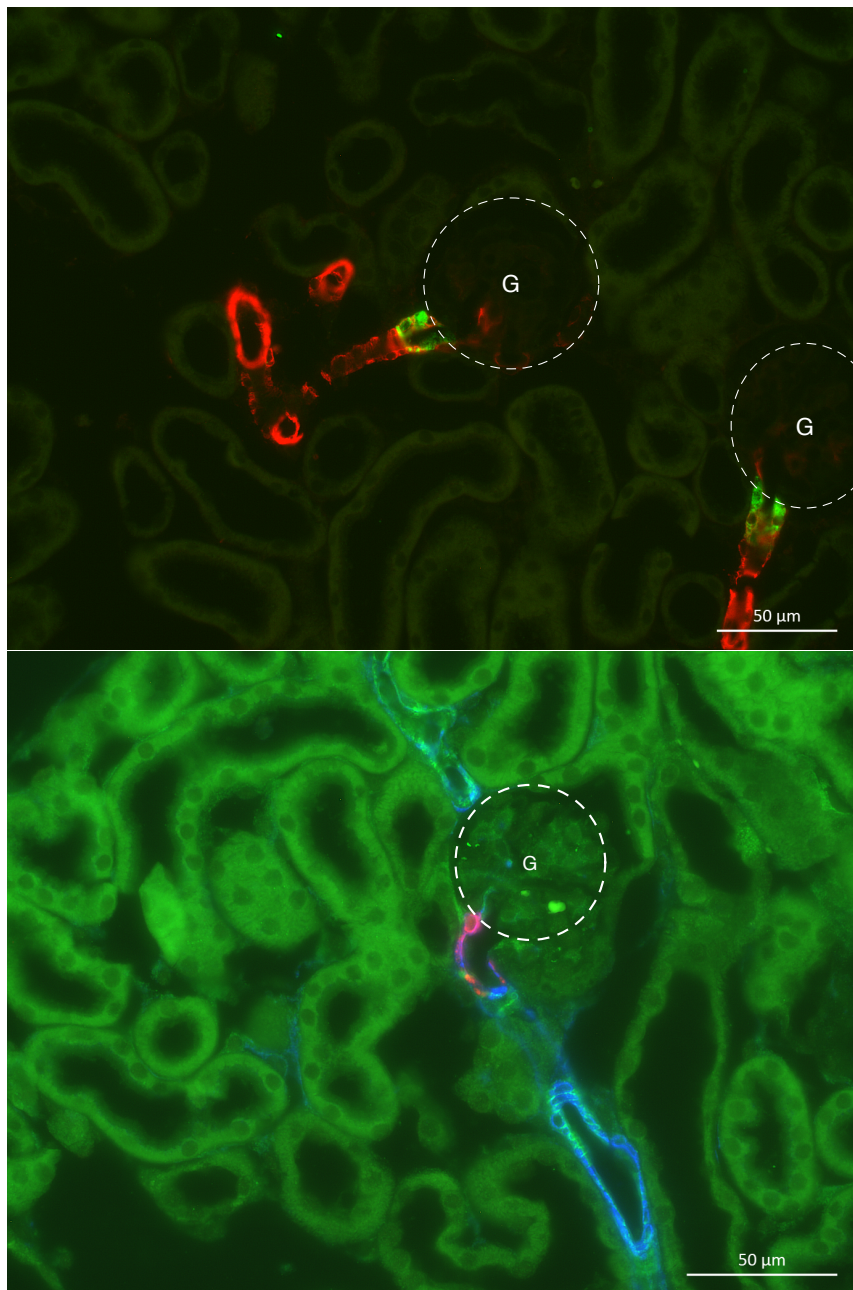


Abbildung 4.24: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer unbehandelten $\text{Ren-1d}^{+/Cre}\text{-ET}_A^{\text{fl/fl}}$ -Maus. **Oben:** Glattmuskelaktin rot, Renin grün gefärbt. Typische juxtaglomeruläre Reninexpression im Bereich der afferenten Arteriole in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus (G). 400fache Vergrößerung. **Unten:** Aktin blau, Renin rot, ET_A -Rezeptoren grün. Keine Färbung von ET_A -Rezeptoren in Reninzellen erkennbar. Vergrößerung 400fach.

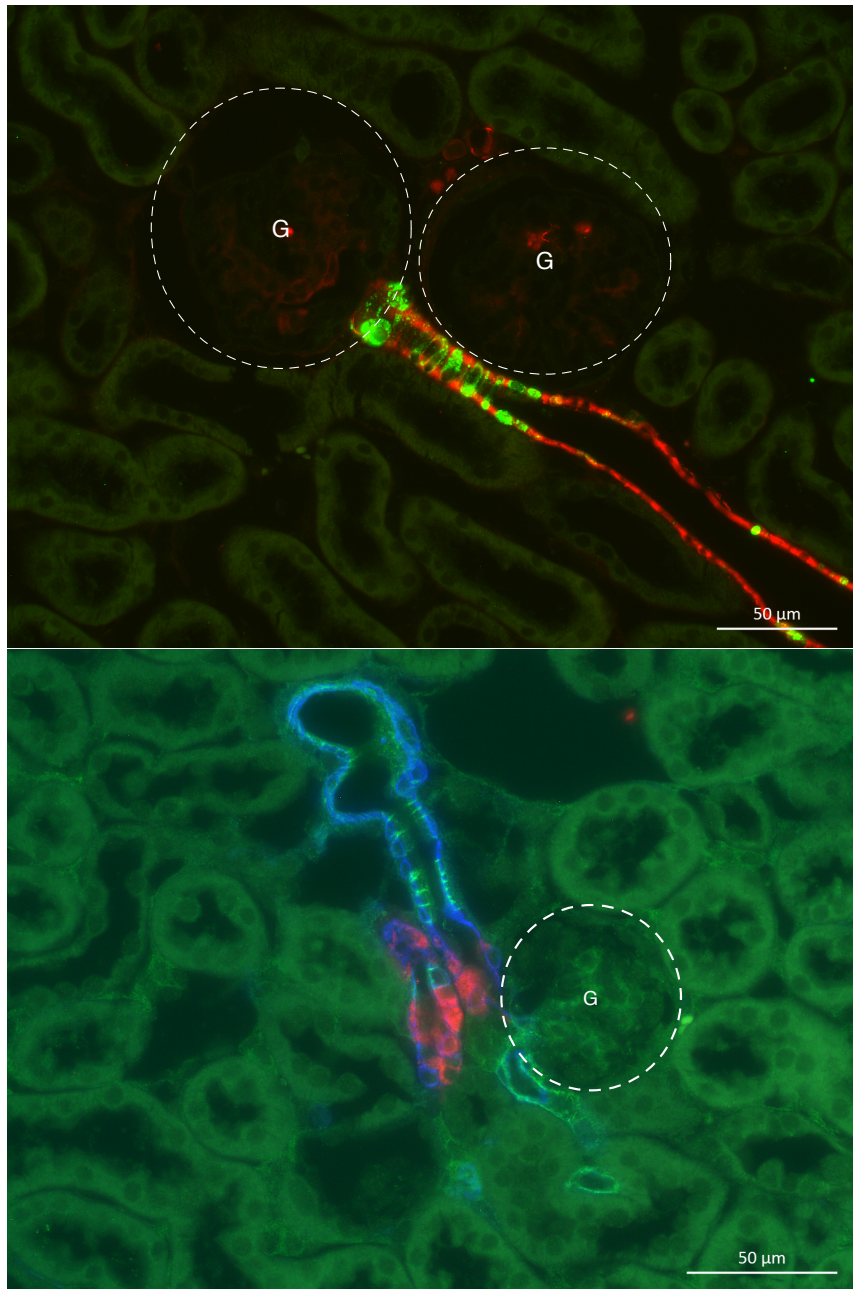


Abbildung 4.25: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Ren-1d^{+/Cre}-ET_A^{fl/fl}-Maus nach Stimulation durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. **Oben:** Aktin rot, Renin grün gefärbt. Typische juxtaglomeruläre Reninexpression im Bereich der afferenten Arteriole. Reninzellen im Sinne einer retrograden Rekrutierung erkennbar. 400fache Vergrößerung. **Unten:** Aktin blau, Renin rot, ET_A-Rezeptoren grün. Keine Färbung von ET_A-Rezeptoren in Reninzellen erkennbar. Vergrößerung 400fach.

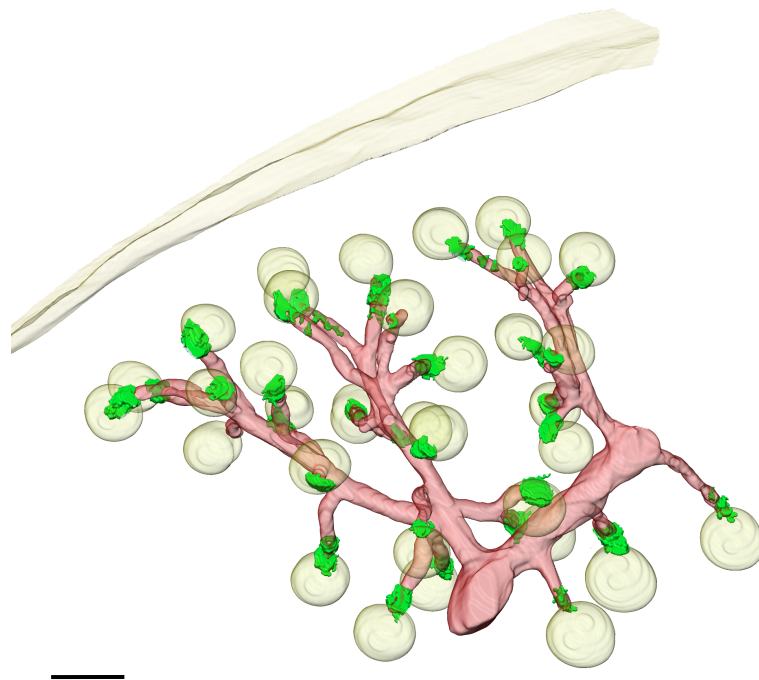


Abbildung 4.26: Gefäßbaumabschnitt einer adulten Wildtyp-Maus nach Stimulation mit Nidrigsalzdiät und Enalapril. 3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot), Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Maßstabsbalken 100 μm .

4.4.3 Dreidimensionale Darstellung des Reninexpressionsmusters

4.4.3.1 Wildtyp-Maus – Lowsalt-Enalapril-Behandlung

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigt sich bei Wildtyp-Mäusen nach Stimulation mit Enalapril und Nidrigsalzdiät ein verstärktes Vorliegen reninproduzierender Zellen. Die Lage dieser Zellen indes ist primär im Bereich der terminalen afferenten Arteriole angesiedelt. Es ist aber sowohl eine Rekrutierung reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen zu erkennen als auch eine deutliche Zunahme der Reninmenge als solcher. Interlobulararterien und arcuater Seitenast weisen keine reninproduzierenden Zellen auf (siehe Abbildung 4.26).

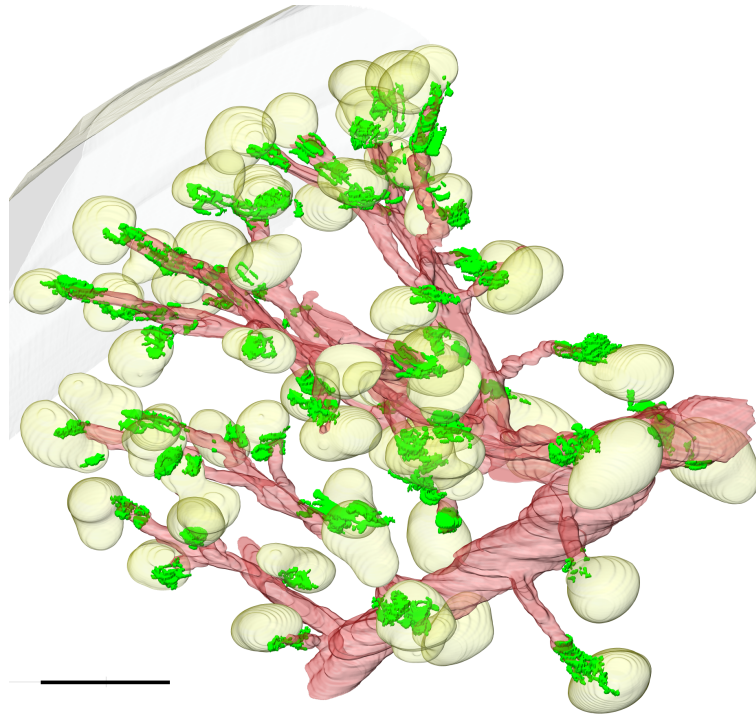


Abbildung 4.27: Gefäßbaumabschnitt einer adulten $\text{Ren-1d}^{+/Cre}\text{-ET}_A^{\text{fl/fl}}$ -Maus nach Stimulation mit Nidrigsalzdiät und Enalapril. 3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot), Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Maßstabsbalken 200 μm .

4.4.3.2 $\text{Ren-1d}^{+/Cre}\text{-ET}_A^{\text{fl/fl}}$ -Maus – Lowsalt-Enalapril-Behandlung

In der dreidimensionalen Rekonstruktion des arteriellen Gefäßbaumes der Niere von Mäusen mit reninzellspezifischem ET_A -Rezeptor-Knockout nach Stimulation mit Enalapril und Nidrigsalzdiät offenbart sich eine deutliche Zunahme reninproduzierender Zellen. Die Lokalisation derselben ist nicht mehr allein auf den juxtaglomerulären Abschnitt der afferenten Arteriole beschränkt, sondern im Sinne einer retrograden Rekrutierung auf präterminale Abschnitte erweitert. Gleichwohl weisen Interlobulararterien und arcuater Seitenast keine reninbildenden Zellen auf. Insbesondere die quantitative Steigerung des exprimierten Renins imponiert in dieser Darstellung (siehe Abbildung 4.27).

5 Diskussion

5.1 Lokalisation der Endothelinrezeptoren

Seit der Entdeckung der Endotheline durch Yanagisawa et al. (1988) im Jahre 1988 erschienen zahlreiche Publikationen, die sich intensiv mit dem Einfluss der Endotheline auf die Nierenfunktion beschäftigten. Es zeigte sich, dass die Niere von besonderer Bedeutung für das Endothelinsystem ist: Die Niere besitzt zahlreiche Endothelinrezeptoren, und es ist wenig überraschend, dass das Endothelinsystem zahlreiche funktionelle Parameter der Nierenfunktion zu regulieren vermag. Verschiedene Forscher beschäftigten sich in den darauffolgenden Jahren mit der Untersuchung der Verteilung der Endothelinrezeptoren in der Niere von Säugetieren (Terada et al., 1992; Takemoto et al., 1993; Chow et al., 1995; Kohan et al., 1992; Ong et al., 1995). Edwards and Trizna (1995) beschrieben für die Verteilung von ET_A/ET_B -Rezeptoren im Gefäßsystem von Ratte und Kaninchen ein Verhältnis von 40 : 60. Über 80 % aller ET_B -Rezeptoren befinden sich im Sammelrohr des inneren Nierenmarks (IMCD) (Edwards and Trizna, 1995). Wie Karet et al. (1993) nachwiesen, sind ET_B -Rezeptoren auch in menschlichen Nieren quantitativ stärker vertreten, die Expression der ET_B -Rezeptoren im Sammelrohr ist Gegenstand mehrerer Publikationen (Terada et al., 1992; Takemoto et al., 1993; Karet et al., 1993; Kohan et al., 1992). Um eine exaktere Lokalisation der Endothelinrezeptoren in menschlichen Nieren bemühten sich Davenport et al. (1994), wohingegen Wendel et al. (2006) die Verteilung dieser Rezeptoren an Rattennieren untersuchten. Eine genauere Beschreibung der Lokalisation von Endothelinrezeptoren in Mäusen findet sich in der Literatur nicht, weshalb der Fokus der vorliegenden Arbeit zunächst auf diesem Sachverhalt liegen soll. Als Referenz mögen vornehmlich die Ergebnisse von Davenport et al. (1994) und Wendel et al. (2006) dienen.

Die Analyse der histologischen Aufnahmen zur Bestimmung der Lokalisation der Endothelin-Rezeptoren in einer Mäuseniere ergibt das folgende Bild: Über die gesamte Länge des Vas afferens wird der ET_A-Rezeptor dicht in der Media exprimiert. Spangenartig flankieren die Rezeptoren das Lumen der zuführenden Arteriole, bis in den präterminalen juxtaglomerulären Abschnitt reninproduzierender Zellen hineinragend wird dieser Rezeptorsubtyp exprimiert. Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Erkenntnissen von Wendel et al. (2006) und Davenport et al. (1994), welche ebenfalls das Auftreten von ET_A-Rezeptoren im Bereich der afferenten Arteriole beschreiben. Allerdings belegen die Ergebnisse von Wendel et al. (2006) auch das Vorliegen von ET_B-Rezeptoren in afferenter sowie efferenter Arteriole. Die oben dargestellten Abbildungen an Mäusenieren können die Expression von ET_B-Rezeptoren weder in der afferenten noch in der efferenten Arteriole bestätigen. In den Interlobulararterien konnten ebenfalls ET_A-Rezeptoren nachgewiesen werden. ET_B-Rezeptoren allerdings konnten in diesen Gefäßen nicht detektiert werden. Damit ist Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wendel et al. (2006) gegeben, wonach in diesen Gefäßästen ausschließlich ET_A-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Auch Davenport et al. (1994) verzeichnen das Vorliegen von ET_A-Rezeptoren in renalen Blutgefäßen, einschließlich der Aa. interlobares et arcuatae (Davenport et al., 1994).

Wendel et al. (2006) beschreiben die Lokalisation von ET_B-Rezeptoren in Epithelzellen des proximalen Tubulus und dem Sammelrohr des inneren Marks, die Lokalisation von ET_A-Rezeptoren dagegen im distalen Tubulus sowie in kortikalen Sammelrohrabschnitten. Die Bestimmung der Expression der ET_B-Rezeptoren in der Mäuseniere indes weicht hinsichtlich dieses Aspekts partiell von der Rattenniere ab: Während auch im Sammelrohr zahlreiche Kolo-kalisationen des ET_B-Rezeptors mit dem für das Sammelrohr charakteristischen Marker Aquaporin 2 aufscheinen und damit das Vorhandensein des ET_B-Rezeptors belegen, zeigt sich im distalen Tubulus der Mausnieren nur die Expression des ET_B-Rezeptors. In weit geringerer Ausprägung als im Sammelrohr ist der ET_B-Rezeptor im distalen Tubulus vertreten, der ET_A-Rezeptor wird nicht exprimiert. Dieser Befund weicht deutlich von der an Rattennieren beschriebenen Verteilung der Rezeptorsubtypen ab, wie von Wendel et al. (2006) dargestellt, welche eine Lokalisation von ET_A-

Rezeptoren im distalen Tubulus beschreiben. Die Expression des ET_B -Rezeptors im Sammelrohr aber steht im Einklang mit der Literatur (Terada et al., 1992; Takemoto et al., 1993; Karet et al., 1993; Kohan et al., 1992). Untersuchungen von Kohan et al. (1992) belegen an Rattennieren die Expression beider Rezeptorsubtypen im Sammelrohr. Insofern ergibt sich auch in diesem Punkt eine Abweichung von Mäusenieren. Im proximalen Tubulus zeigt sich vornehmlich die Expression des ET_A -Rezeptors. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Ong et al. (1995) überein, die die Expression beider Rezeptorsubtypen im proximalen Tubulus humaner Nieren nachweisen konnten (Ong et al., 1995).

Die Ergebnisse korrelieren in weiten Teilen mit denen von Davenport et al. (1994) und Wendel et al. (2006). Differenzen ergeben sich insofern, als sich im Vas afferens von Mäusenieren keine ET_B -Rezeptoren, im distalen Tubulus keine ET_A -Rezeptoren und im proximalen Tubulus sowie im Sammelrohr keine ET_B -Rezeptoren nachweisen lassen konnten. Die Ursachen für die unterschiedliche Expression der Endothelinrezeptoren könnten wohl in der Verschiedenheit der untersuchten Spezies begründet liegen, eine zu geringe Empfindlichkeit der verwendeten Antikörper oder unterschiedliche Nachweismethoden mögen ein Übriges dazu beitragen.

5.2 Analyse der Elektrolyt- und Osmolalitätsmessungen

Die Lokalisation der Endothelinrezeptoren im Vas afferens und im Sammelrohrsystem suggeriert einen Einfluss dieser Rezeptoren auf die Elektrolytbalance und die Zusammensetzung des Urins. Es stellt sich die Frage, ob eine Blockade dieser Rezeptoren Veränderungen der Elektrolytkonzentrationen und der Osmolalität des Urins nach sich zieht. In Kapitel 4 sind die Ergebnisse der pharmakologischen Blockade der verschiedenen Endothelinrezeptorsubtypen mit den Antagonisten BQ610, BQ788 und Bosentan dargestellt. Die hinsichtlich dieses Aspekts erhobenen Daten sollen im Folgenden diskutiert werden.

Die Kalium-Konzentration im Urin zeigt sich im Falle der selektiven ET_A -Rezeptor-Blockade signifikant verringert, im Falle der selektiven ET_B - sowie der dualen

Rezeptorblockade präsentiert sie sich unverändert. Legt dies schon die Vermutung nahe, dass die Aktivierung von ET_A -Rezeptoren eine Exkretion von Kalium fördert? Hinsichtlich der Urin-Kalium-Konzentration erschöpft sich die zugehörige Literatur rasch: Sowohl Goetz et al. (1988) als auch Pollock and Opgenorth (1993) beschreiben eine signifikante Reduktion der Kalium-Exkretion im Urin bei Infusion von Endothelinen. Allerdings führen sie diese Beobachtung auf eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate unter der vasokonstriktorischen Wirkung des Endothelins zurück und folgern daraus keinen direkten Einfluss von Endothelin auf eine tubuläre Regulation der Kalium-Homöostase. Pollock and Opgenorth (1993) stellen in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass die Endothelin-induzierte renale Vasokonstriktion nicht von einer Aktivierung der ET_A -Rezeptoren vermittelt wird. Darin könnte die signifikant verringerte Kaliumkonzentration im Falle des selektiven ET_A -Rezeptor-Antagonismus begründet liegen: Unabhängig von dieser Blockade könnte eine renale Vasokonstriktion erfolgen, welche über eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate eine Reduktion der urinären Kalium-Konzentration zur Folge haben könnte. Linas and Dickmann (1982) etwa stellten fest, dass bei Hypokaliämie zur Wiederherstellung eines ausgeglichenen Kalium-Haushalts ein Angiotensin-II-vermittelter Anstieg des renalen Gefäßwiderstandes sowie eine Abnahme des renalen Blutflusses resultierten (Linas and Dickmann, 1982). Möglicherweise besitzen Vorgänge dieser Art auch im vorliegenden Fall Einfluss auf die Regulation der urinären Kaliumkonzentration. Damit lässt sich weder für den ET_A - noch für den ET_B -Rezeptor eine direkte Einflussnahme auf die Regulation der Kalium-Homöostase postulieren.

Hinsichtlich der Natriumkonzentration im Urin ergibt sich ein komplizierteres Bild: Während ein selektiver ET_B -Rezeptor-Antagonismus keine signifikanten Auswirkungen zeigte, reduzierte sowohl die selektive Blockade des ET_A -Rezeptors mit BQ610 als auch die duale ET_A -/ ET_B -Rezeptor-Blockade mit Bosentan signifikant die Natriumkonzentration im Urin. Was lässt sich damit über die Einflussnahme der Endothelinrezeptoren auf den Natriumgehalt des Urins aussagen? Wie Guo and Yang (2006) beschreiben, führt eine Blockade des ET_B -Rezeptors an Ratten zu einer verringerten Natrium-Exkretion, was sich in einer reduzierten Urin-Natrium-Konzentration widerspiegeln könnte, womit Übereinstimmung im Falle des

dualen Rezeptorantagonismus gegeben wäre. Die fehlende Auswirkung einer selektiven ET_B -Rezeptor-Blockade lässt sich damit jedoch nicht zufriedenstellend begründen. Des Weiteren wird in der Literatur eine Endothelin-vermittelte Natriuresis beschrieben (Kohan et al., 2011), welche vermuten ließe, dass eine Blockade der Endothelin-Rezeptoren eine verstärkte Natrium-Retention nach sich zöge. Die Ergebnisse einiger Forscher jedoch vermitteln ein gegensätzliches Bild: So beschreiben Clavell et al. (1995) an Hunden eine ET_A -vermittelte antinatriuretische Wirkung im Bereich des proximalen Tubulus, wohingegen ET_B -Rezeptoren an der Natrium-Exkretion nicht beteiligt zu sein scheinen. Dies liefert insofern Übereinstimmung mit den dargestellten Ergebnissen, als dies eine Erklärung für den fehlenden Einfluss des ET_B -Rezeptor-Antagonismus liefern könnte. Die reduzierte Natrium-Urinkonzentration bei Blockade der ET_A -Rezeptoren, welche nachweislich im proximalen Tubulus lokalisiert sind, steht indessen im Widerspruch zu den von Clavell et al. (1995) dargelegten Untersuchungen. Ein spezifischer Knockout von ET_B -Rezeptoren im Sammelrohr verursacht ebenso eine Natrium-Retention (Ge et al., 2006) wie ein spezifischer Knockout von ET-1 im Sammelrohr (Ahn et al., 2004). Ein spezifischer Knockout des ET_A -Rezeptors im Sammelrohr dahingegen lässt die Natrium-Exkretion unverändert (Ge et al., 2005). Diese Ergebnisse ließen eine ET_B -vermittelte Natriumretention im Sammelrohr plausibel erscheinen. Offenbar besteht eine inverse Korrelation zwischen Endothelin-Konzentration und Natrium-Exkretion: Cavero et al. (1990) belegen eine reduzierte Natrium-Exkretion nach Verabreichung von Endothelinen, wohingegen niedrige Plasmakonzentrationen von ET-1 die Natrium-Exkretion erhöhen (Cavero et al., 1990). Eine Reduktion der Natrium-Exkretion unter dem Einfluss von Endothelinen findet in verschiedenen Publikationen Erwähnung (Lerman et al., 1991; Goetz et al., 1988; Sandgaard and Bie, 1996). Allerdings konnten etwa Freed et al. (1996) zeigen, dass ein Endothelin-Antagonismus bei Menschen die Natrium-Exkretion im Urin nicht beeinflusst. Mehrere Publikationen schreiben Endothelinen eine Natriuresis-fördernde Wirkung zu (Harris et al., 1991; Hoffman et al., 2000; Schramek et al., 1992), führen diese Beobachtungen aber auf eine renale Vasodilatation mit einhergehender Natriuresis aufgrund eines reduzierten Natriumtransports in geringen Dosen zurück (Harris et al., 1991) oder vertreten die Ansicht, Endothelin-assoziierte Diuresis und Natri-

urese würden hauptsächlich über eine an ET_B -Rezeptoren gekoppelte Stimulation der NO-Produktion vermittelt (Hoffman et al., 2000). Uzuner and Banks (1993) deuten die ET-induzierte Natriurese und Diurese als blutdruckabhängige Phänomene (Uzuner and Banks, 1993). Claria et al. (1991) kommen zu dem Ergebnis, dass Endothelin in niedrigen Dosen zwar den renalen Blutfluss reduziert, auf die glomeruläre Filtrationsrate und Natriumexkretion aber keinen Einfluss nimmt. In hohen Dosen hingegen zieht Endothelin eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate, des renalen Blutflusses und der Natriumexkretion nach sich. Die Abnahme der Natriumexkretion beruhe dabei nicht auf direkten Effekten des Endothelins auf den tubulären Natriumtransport, vielmehr sei die Beeinträchtigung der Nierendurchblutung verantwortlich für den antinatriuretischen Effekt von Endothelin (Claria et al., 1991).

Auch Kohan et al. (2011) erkannten diese offenkundigen Inkonsistenzen hinsichtlich der Natriumexkretion. Eine Begründung dafür ist ihrer Meinung nach zumindest teilweise in einer unterschiedlichen Aktivierung der Endothelinrezeptorsubtypen zu suchen. Gleichwohl ziehen Kohan et al. (2011) den folgenden Schluss: Die Rolle des renalen Endothelinsystems in der Kontrolle der Urin-Natriumexkretion kann nicht durch Maßnahmen bestimmt werden, welche generalisierte renale Effekte nach sich ziehen. Somit kann man im vorliegenden Fall keine Einflussnahme der Endothelinrezeptorblockade auf die renale Regulation der Natrium-Homöostase postulieren.

Bei der Analyse der Ergebnisse hinsichtlich der Urinosmolalität ergibt sich folgendes Bild: Während eine Blockade der ET_A -Rezeptoren mit BQ610 eine signifikante Verringerung der Osmolalität nach sich zieht, zeigt sich im Falle der ET_B -Rezeptorblockade mit BQ 788 keine signifikante Veränderung. Ein dualer Rezeptorantagonismus mit Bosentan hingegen ergibt eine signifikante Zunahme der Urinosmolalität. Es stellt sich die Frage, was von diesen Ergebnissen mit Blick auf die Literatur zu halten ist. Wie Studien belegen, fördern Endotheline ET_B -Rezeptor-vermittelt die Diurese (Clavell et al., 1995; Sandgaard and Bie, 1996). Bei einer Blockade der ET_A -Rezeptoren ist von einer verstärkten Bindung des vorhandenen Endothelins an die nicht-blockierten ET_B -Rezeptoren auszugehen. Damit ist eine gesteigerte Diurese mit assoziierter Reduktion der Urinosmolalität plausibel erklärbar. Dies ist konkordant mit Untersuchungen von Yukimura et al. (1994), welche eine Reduk-

tion der Urinosmolalität nach Stimulation des ET_B -Rezeptors postulieren. Auch für den signifikanten Anstieg der Urinosmolalität im Falle eines dualen Rezeptorantagonismus lassen sich in der Literatur Belege finden: Durch die Blockade der ET_B -Rezeptoren entfällt die auf diese Weise vermittelte Stimulation der Diurese, woraus ein Anstieg der Urinosmolalität resultiert. Zahlreiche Autoren belegen eine diuretische Wirkung von Endothelinen (Yamashita et al., 1991; Schnermann et al., 1992; Goetz et al., 1988; Clavell et al., 1995; Ge et al., 2008). Entsprechend ist dies mit einer Zunahme der Urinosmolalität bei Blockade der Endothelinrezeptoren kompatibel. Wie Yukimura et al. (1994) spezifizierten, führt eine Stimulation des ET_B -Rezeptors – unabhängig von der Bildung von NO oder Prostaglandinen – in der Niere zu einer signifikanten Verringerung der Urinosmolalität. Aus den zitierten Studien erklärt sich der fehlende Einfluss einer selektiven ET_B -Rezeptor-Blockade auf die Urinosmolalität zwar nicht, möglicherweise erfolgt hierbei aber ein kompensatorischer Effekt über näher zu bestimmende Mechanismen: Wie Yamashita et al. (1991) eruierten, fungiert ET-3 über eine Stimulation der NO- und Prostaglandinsynthese als renaler Vasodilatator mit diuretischer Wirkung (Yamashita et al., 1991). So steht zumindest die Vermutung im Raum, dass NO und Prostaglandine die fehlende diuretische Wirkung des ET_B -Rezeptors kompensieren, womöglich auf einer verstärkten Stimulation der ET_A -Rezeptoren beruhend. Damit decken sich die dargestellten Ergebnisse hinsichtlich der Osmolalität weitgehend mit der Literatur.

Eine direkte Einflussnahme der Endothelinrezeptorblockade kann weder auf die Regulation des Kalium-Haushalts noch auf die Kontrolle der Natrium-Homöostase gefolgert werden. Die Ergebnisse hinsichtlich der Osmolalität stimmen weitgehend mit der Literatur überein und erzeugen das Bild einer ET_B -Rezeptor-vermittelten Stimulation der Diurese. Möglicherweise nehmen NO oder Prostaglandine zusätzlichen kompensatorischen Einfluss auf die Urinosmolalität.

5.3 Einfluss von Endothelin auf die Reninexpression – Qualitative und quantitative Analyse des Reninexpressionsmusters

Wie bereits im Rahmen der Lokalisation der Endothelinrezeptoren im Gefäßsystem gesehen, erfolgt in der Media des Vas afferens einer Mäuseniere die Expression von ET_A -Rezeptoren. Aus diesem Grund ist es naheliegend, den Einfluss des Endothelinsystems auf die Reninexpression eingehender zu beleuchten: Ziel dieses Abschnitts ist die Diskussion eines solchen Einflusses. Hinweise auf eine derartige Einflussnahme können in der Literatur zahlreichen Publikationen entnommen werden: Wie Rossi et al. (1999) aufzeigen, stellt neben dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System das Endothelinsystem das stärkste Vasopressorsystem des Körpers dar. Zwischen beiden Systemen bestehen zahlreiche Interaktionen (Rossi et al., 1999; Berthold et al., 1999). Im vorliegenden Falle liegt der Fokus der Untersuchungen neben der pharmakologischen Blockade der Endothelinrezeptoren auf dem reninzellspezifischen Knockout des ET_A -Rezeptors. Während bei einem systemischen Knockout dieses Rezeptorsubtyps seiner vasokonstriktorischen Wirkung wegen von einer hypotonen hämodynamischen Situation mit konsekutiver Aktivierung des RAAS auszugehen wäre, ist es auf diese Weise möglich, die Regulation des Reninsystems über Endotheline auf zellulärer Ebene exakter zu erfassen. Bereits kurz nach Entdeckung des Endothelins deuteten Ergebnisse von Matsumura et al. (1989a) auf eine Hemmung der Reninfreisetzung durch Endotheline hin. Endothelin inhibiere demnach die Reninfreisetzung über einen Calcium-Einstrom-Mechanismus, erhöhe das intrazelluläre Calcium (Rakugi et al., 1988) und hemme ET_B -vermittelt, vermutlich über die Aktivierung einer PKC, die cAMP-induzierte Reninexpression in juxtaglomerulären Zellen (Ritthaler et al., 1996). Dabei gehe die Calcium-abhängige Inhibition der Reninfreisetzung mit einem Calcium-Einstrom über Dihydropyridin-insensitive Calcium-Kanäle einher (Matsumura et al., 1989b). Während Krämer et al. (1996) festhalten, dass Endotheline zwar selektiv die cAMP-stimulierte Reninsekretion und die Reningenexpression hemmten, aber keinen Einfluss auf die basale Reninsekretion nähmen, kommen Moe et al. (1991) zu der Ansicht, dass Endothe-

lin signifikant sowohl die basale als auch die stimulierte Freisetzung von Renin inhibiere. Auch die Ergebnisse von Ryan et al. (2002) legen nahe, dass ET-1 die Reningentranskription direkt modifiziere (eine posttranslationale Modifikation sei demnach nicht in Betracht zu ziehen) und die Reningenexpression deutlich abschwäche. Wie Ryan et al. (2002) betonen, könnte dabei das Gefäßendothel der präglomerulären Arteriole eine entscheidende Rolle in der Regulation von Renin spielen. Insbesondere über cAMP-induzierte Signalwege vermögen Endotheline das Reninsystem zu inhibieren. Dieser inhibitorische Einfluss werde vermutlich über die intrazelluläre Calcium-Konzentration vermittelt und mache Endothelin zu einem wichtigen lokalen Inhibitor der Reninfreisetzung in der Niere (Wagner et al., 1998). Dazu aber sei eine ausreichende Konzentration notwendig (Takagi et al., 1988). All diese Publikationen zeigen, dass Endotheline einen erheblichen regulatorischen Einfluss auf das Reninsystem nehmen können. Gerade im Hinblick auf die dichte Verteilung von ET_A-Rezeptoren im Vas afferens stellt sich die Frage, inwieweit ein Eingriff in das Endothelinsystem Auswirkungen auf das RAAS, insbesondere auf die Reninexpression, besitzt.

Unter Berücksichtigung der obigen Erkenntnisse erscheinen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse insofern geradezu überraschend, als weder der reninzellspezifische Knockout des ET_A-Rezeptors noch ein selektiver oder gar ein dualer pharmakologischer Antagonismus der Endothelinrezeptoren keinerlei Auswirkungen zu besitzen scheinen: Weder die Blockade der Endothelin-Rezeptoren mit BQ610, BQ788 oder Bosentan noch der ET_A-Knockout ziehen einen signifikanten Einfluss auf die Renin-, die ET_A- oder die ET_B-mRNA-Produktion nach sich. Ebenso zeigen sich keine nennenswerten histologischen Veränderungen an immunhistochemisch gefärbten Nierenschnitten. Mit Ausnahme der BQ610-behandelten Mäuse stellen sich auch in der 3D-Rekonstruktion keine Abweichungen vom Normalbefund dar. Eine von der Regel abweichende Lokalisation reninhaltiger Zellen ist bei der pharmakologischen Behandlung der Versuchstiere mit BQ610 nicht nachzuweisen. Auch in diesem Falle ist somit keine relevante Auswirkung des Rezeptorantagonismus auf die Reninexpression assoziiert. Es wäre nicht zwangsläufig zu erwarten, dass eine temporäre Blockade des ET_A-Rezeptors die gleichen Auswirkungen nach sich zöge wie ein angeborenes reninzellspezifisches Fehlen des ET_A-Rezeptors im

Falle der Knockout-Mäuse. Im ersteren Fall erfordert dieses vergleichsweise akute Ereignis eine kurzfristige Reaktion des Organismus, wohingegen im letzteren Falle von der Embryonalzeit der Versuchstiere an auf Kompensationsmechanismen ausgewichen werden kann. So könnten kompensatorisch etwa das RAAS oder das sympathische Nervensystem zur Aufrechterhaltung eines ausreichend hohen Blutdrucks beitragen. Nichtsdestominder: Jedweder durchgeführte Eingriff in das Endothelinsystem war mit keinerlei essentiellen Veränderungen des Reninsystems assoziiert. Es stellt sich die Frage, was man anhand obiger Forschungsergebnisse hätte erwarten können und wie sich dieses scheinbar überraschende Resultat erklärt. Die inhibitorische Wirkung von Endothelinen auf die renalen juxtaglomerulären Zellen erfolgt über eine selektive Hemmung des cAMP-aktivierten Signalwegs (Ackermann et al., 1995; Ritthaler et al., 1995). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass dieser Vorgang über ET_B -Rezeptoren vermittelt zu werden scheint (Ritthaler et al., 1995). Möglicherweise ist hierin eine Erklärung dafür zu suchen, dass weder der Knockout des ET_A -Rezeptors noch dessen Antagonismus signifikante Unterschiede zutage fördert. Worin aber ist die Ursache für fehlende Veränderungen bei selektivem ET_B - sowie dualem ET_A/ET_B -Antagonismus zu suchen? Wie erklärt sich die fehlende Einflussnahme in diesem Kontext? Ritthaler et al. (1995) führten ihre Untersuchungen an isolierten juxtaglomerulären Zellen aus Mäusenieren durch – in vivo können sich aber durchaus widersprüchliche Ergebnisse dazu ergeben, wie Rossi et al. (1999) einräumen. Insofern stehen die von Ritthaler et al. (1995) in vitro erhobenen Befunde nicht zwangsläufig im Widerspruch mit den an lebenden Versuchsmäusen erhobenen Daten. Wenn das Endothelinsystem in vitro starke Auswirkungen auf das Reninsystem besitzt, eine Einflussnahme auf das Endothelinsystem in vivo aber keine substantiellen Unterschiede hervorruft, stellt sich offenkundig die Frage nach suffizienten Kompensationsmechanismen. In der Literatur finden sich darauf zahlreiche Hinweise: Ryan et al. (2002) kommen zu dem Schluss, dass das Gefäßendothel der präglomerulären Arteriole eine entscheidende Rolle in der Regulation von Renin spielt, da sowohl ET-1 als auch NO in die Reninregulation involviert sind. Aufgrund der Vermittlung des Einflusses von Endothelinen auf die Reninexpression über ET_B -Rezeptoren könnte präglomerulär – in der Arteriola afferens sind nachweislich überwiegend ET_A -Rezeptoren lokalisiert –

insbesondere NO eine Schlüsselrolle in der Regulation des Reninsystems zukommen. Zu dieser Einsicht kommen auch Wagner et al. (1998): Neben Endothelinen können lokale Faktoren wie Prostaglandine und NO, die in der unmittelbaren Umgebung der juxtaglomerulären Zellen gebildet werden, einen signifikanten Einfluss auf die Reninsekretion und die Reningenexpression ausüben. Der Effekt von NO in vivo scheint die Stimulation des RAAS zu beinhalten: Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass sowohl NO als auch Prostaglandine in die physiologische Regulation des Reninsystems beteiligt sind (Wagner et al., 1998). Wie Jensen et al. (1996) aufzeigen, stimulieren Prostaglandine die Reninfreisetzung und die Renin-mRNA-Expression in juxtaglomerulären Zellen von Mäusen. Über Prostaglandin E₂ erfolgt diese Stimulation vermittels des im Nierengewebe exprimierten Prostaglandinrezeptors EP4 unter Beteiligung der COX-2 (Pöschke et al., 2012; Facemire et al., 2011). Als Transmitter scheinen Prostaglandine zudem besonders geeignet: Bildung, Freisetzung, Wirkung und Metabolismus erfolgen rasch (Jensen et al., 1996). Augenscheinlich gibt es mehrere Signalwege, die die Reninsekretion beeinflussen und die nicht zuletzt über Prostaglandine und NO vermittelt werden. Zu weiteren interessanten Erkenntnissen kommen Chou et al. (1990): Direkt in die Nierenarterie verabreichtes Endothelin führt zwar zu einer deutlichen Steigerung der renalen Prostaglandinsynthese, stimuliert die renale Reninfreisetzung aber nicht. Eine Inhibition der Prostaglandinsynthese indes verhindert teilweise eine endothelininduzierte renale Vasokonstriktion. Bei Unterdrückung der Prostaglandinsynthese wird ein inhibitorischer Effekt von Endothelin auf die Reninfreisetzung beobachtet. Der vasokonstriktorische Effekt von Endothelin auf die Hämodynamik der Niere beruht somit entscheidend auf der Fähigkeit, die Produktion von Vasodilatoren (einschließlich Prostazyklin) zu verstärken. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Prins et al. (1994): Prostaglandine inhibieren Transkription, Translation, Sekretion und Wirkung von ET-1, die vasodilatatorische Wirkung von Prostaglandinen beruht zum Teil auf einer Hemmung der Endothelinproduktion. Die Inhibition der Prostaglandinsynthese hingegen zieht eine andauernde endothelinvermittelte renale Vasokonstriktion nach sich, während die Verabreichung von Endothelinrezeptor-Antagonisten diesen Effekt aufhebt (Cantley et al., 1993). Diesen balancierenden Effekt zwischen vasokonstriktorisches Endothelinen und vasodilatatorischen Pros-

taglandinen beschreiben auch Schulz et al. (1995). Darüber hinaus stimulieren Endotheline die renale Produktion von PGE₂ und PGI₂, eine Beteiligung von Prostaglandinen an der renalen Wirkung der Endotheline wird vermutet (Miura et al., 1989). PGI₂ wiederum stimuliert die Reninproduktion (Beierwaltes and Carretero, 1992). Auch die Beeinflussung der renalen Hämodynamik durch mentalen Stress umfasst eine komplexe Reaktion, an der ET-1, Prostaglandine sowie NO beteiligt sind (Castellani et al., 1997). Die Inhibition der renalen NO-Synthese reduziert den basalen renalen Blutfluss sowie die renale Reninfreisetzung. Somit beeinflusst NO sowohl den renalen Blutfluss als auch die renale Reninfreisetzung in vivo (Naess et al., 1993). Dies liefert zahlreiche Hinweise auf ein komplexes Wechselspiel zwischen Endothelinen, Prostaglandinen und NO, worin eine Erklärung für die fehlende Einflussnahme der oben geschilderten Eingriffe in das Endothelinsystem in vivo zu suchen sein könnte. Die Blockade der NO-Synthase nach Verabreichung NO-Synthesehemmers L-NAME etwa reduziert die Freisetzung von Renin (Gardes et al., 1992). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Komponenten der Blutdruckregulation in vivo, neben dem RAAS und dem Endothelinsystem nehmen ferner das sympathische Nervensystem oder das NO-System Einfluss darauf. Jede Veränderung des Blutdrucks vermag indirekt Einfluss auf das Reninsystem zu nehmen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der fehlende Einfluss bzw. die fehlende Einflussnahmemöglichkeit der Endotheline weder Auswirkungen auf die Reningenexpression, noch auf die Endothelinrezeptorgenexpression, auf die morphologische Darstellung der Reninzellverteilung in der afferenten Arteriole oder auf eine retrograde Rekrutierung von Reninzellen besitzt. Es liegt der Verdacht nahe, dass in vivo weitere Mechanismen die fehlenden Effekte des Endothelinsystems kompensieren. In Betracht kommen etwa das sympathische Nervensystem, Prostaglandin- bzw. NO-assoziierte Signalwege oder weitere zu charakterisierende Transmittersubstanzen.

5.4 Bedeutung des ET_A-Rezeptors für die Stimulierbarkeit des Reninsystems

Schneider et al. (2007) kommen in einer Studie zu dem Ergebnis, dass während einer Hochsalzdiät die vasokonstriktorische Antwort der afferenten Arteriole reduziert ist. Dieser Sachverhalt beruht auf einer gesteigerten vasodilatatorischen Funktion des endothelialen ET_B-Rezeptors. Unter Aufrechterhaltung des renalen Blutflusses kann dies einen wichtigen Mechanismus darstellen, einen ausgeglichenen Natrium-Haushalt unter einer Hochsalzdiät wiederherzustellen. Während die Expression von ET_B-Rezeptoren unter einer Hochsalzdiät zunimmt, bleibt die ET_A-Rezeptor-Expression unverändert (Schneider et al., 2007).

Wie wir im Abschnitt über die Lokalisation der Endothelinrezeptoren gesehen haben, wurde in den zuführenden Arteriolen von Ratten neben ET_A-Rezeptoren auch das Vorkommen von ET_B-Rezeptoren nachgewiesen (Wendel et al., 2006), wohingegen in der afferenten Arteriole von Mäusen nahezu ausschließlich ET_A-Rezeptoren exprimiert werden. Damit stellt sich gerade im Hinblick auf die von Schneider et al. (2007) an Ratten erzielten Erkenntnisse die Frage, welchen Einfluss der ET_A-Rezeptor auf die Regulation des Reninsystems nimmt und welche Veränderungen eine Hochsalzdiät im Sinne einer RAAS-Suppression auf die Expression des ET_A-Rezeptors nach sich zieht. Aus der bisherigen Diskussion liegt die Vermutung nahe, dass ein Fehlen von Endothelin-Rezeptoren in vivo keine Auswirkungen auf die basale Reninexpression besitzt. Ändert sich dieser Sachverhalt unter Stimulation des Reninsystems?

Im Vergleich zum Wildtyp ergeben sich beim ET_A-Knockout unter Normalsalzbedingungen weder hinsichtlich der Renin-, noch der ET_A- oder der ET_B-mRNA-Produktion signifikante Veränderungen. Auch in der Histologie zeigen sich unter Normalsalzbedingungen keine qualitativen oder quantitativen Veränderungen der Reninmenge, in der 3D-Rekonstruktion ist eine allenfalls geringfügige Zunahme der Reninmenge zu beobachten, retrograd gelegene Reninzellen aber werden nicht vorgefunden. Die reninhaltigen Zellen befinden sich, wie in der Literatur beschrieben, juxtaglomerulär in der Wand der afferenten Arteriole (Barajas, 1979). Eine

retrograde Rekrutierung granulierter Zellen in der Media der afferenten Arteriole (Hackenthal et al., 1990) zeigt sich nicht. Unter Kontrollbedingungen scheint der Knockout demnach keinen Einfluss auf das Reninsystem zu besitzen. Unter stimulatorischen Bedingungen ergibt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen auf die Renin- und die ET_B-mRNA-Produktion, allerdings ist ein signifikanter Anstieg der ET_A-mRNA-Produktion bei Stimulation des Wildtyps gegenüber dem stimulierten Knockout nachzuweisen. Gleichwohl ist in der Histologie sowohl bei stimulierten Wildtyp- als auch bei stimulierten Knockout-Mäusen eine starke Zunahme der Reninmenge mit einhergehender retrograder Rekrutierung von Reninzellen im Bereich der Arteriola afferens zu beobachten. Das sich in der 3D-Rekonstruktion präsentierende Bild steht in Übereinstimmung mit den histologischen Befunden. Eine Stimulation von Knockout-Mäusen führt zu der stärksten Zunahme der Reninmenge und ebenfalls im Vas afferens befindlichen Reninzellen im Sinne einer retrograden Rekrutierung. Dass eine Stimulation des Reninsystems eine Zunahme der Reninmenge nach sich zieht, ist in zahlreichen Publikationen diskutiert und belegt worden (Hodsman et al., 1984; Hackenthal et al., 1990; Castrop et al., 2010). Die vordringliche Frage ist, ob man anhand der erhobenen Ergebnisse eine Aussage über die Einflussnahme des ET_A-Rezeptors treffen kann. Damit kommen wir zur Interpretation und der Diskussion der dargestellten Ergebnisse. Die Zunahme der ET_A-mRNA-Konzentration unter Stimulation bei Wildtyp-Mäusen lässt auf eine Zunahme der ET_A-Rezeptoren schließen. Dass eine solche bei einem reninzellspezifischen ET_A-Knockout geringer ausfällt, ist nicht weiter überraschend. Wie erklärt sich der starke Anstieg der Expression von ET_A-Rezeptoren bei den Wildtyp-Mäusen? Kann man hier Parallelen zu der Studie von Schneider et al. (2007) in dem Sinne ziehen, dass anstelle der im Vas afferens nicht exprimierten ET_B-Rezeptoren die Expression der ET_A-Rezeptoren ansteigt? Ein inhibitorischer Einfluss von Endothelinen auf das Reninsystem ist in der Literatur vielfach beschrieben (Wagner et al., 1998; Moe et al., 1991; Matsumura et al., 1989a; Ritthaler et al., 1995; Takagi et al., 1989; Ritthaler et al., 1996). Allerdings scheint diese inhibitorische Wirkung der Endotheline über ET_B-Rezeptoren vermittelt zu werden (Ritthaler et al., 1995). Dies würde im vorliegenden Fall nicht plausibel erklären, worin die Sinnhaftigkeit einer verstärkten ET_A-Expression bei

gleichzeitig unveränderter ET_B -Rezeptor-Expression zu suchen wäre, zumal die Erkenntnisse der genannten Publikationen aus in-vitro-Untersuchungen stammen. Spielen in vivo möglicherweise noch weitere Mechanismen eine Rolle? Schrickler et al. (1995) kommen zu der Ansicht, dass endogene Endotheline in der Kontrolle der Reninsekretion und der Reningenexpression keine relevante Rolle spielen. Die Betrachtung des Einflusses des ET_A -Rezeptors im Falle der Knockout-Mäuse scheint diese Erkenntnis von Schrickler et al. (1995) zu bekräftigen: Bei Stimulation der Knockout-Tiere liegt weder ein signifikanter Anstieg der ET_A -mRNA noch der ET_B -mRNA vor, folglich resultiert kein signifikanter Unterschied in der Expression von Renin. Damit scheinen die zusätzlich exprimierten ET_A -Rezeptoren im Falle der Wildtyp-Mäuse bzw. die fehlende Expression zusätzlicher ET_A -Rezeptoren im Falle der Knockout-Mäuse keinen gravierenden Einfluss auf das Reninsystem zu nehmen. Es bleibt zwar weiterhin der signifikante Anstieg der ET_A -mRNA schleierhaft, ein Einfluss des ET_A -Rezeptors auf das Reninsystem unter Stimulation lässt sich auf dieser Grundlage jedoch nicht postulieren.

Wie aber erklärt sich der signifikante Anstieg der Expression von ET_A -Rezeptoren im Falle stimulierter Wildtyp-Mäuse? Es stellt sich die Frage, ob in der Literatur ein Einfluss von Endothelinen auf den Salz- und Wasserhaushalt beschrieben ist. Im Sammelrohr scheint Endothelin als autokriner Inhibitor der Vasopressin-vermittelten renalen Wasserreabsorption zu fungieren. Ein sammelrohrspezifischer Knockout des ET_B -Rezeptors verursacht eine Natrium-Retention (Ge et al., 2006), ein ET_B -Antagonismus reduziert die Natrium-Exkretion (Guo and Yang, 2006). Der Knockout des ET_A -Rezeptors im Sammelrohr nimmt zwar Einfluss auf die Vasopressin-vermittelte Wasserreabsorption, nicht aber auf die Natrium-Exkretion (Ge et al., 2005). Untersuchungen von Caverio et al. (1990) belegen eine inverse Korrelation zwischen der Endothelin-Konzentration und der natriuretischen Endothelin-Wirkung (Caverio et al., 1990). Entsprechend wurde eine Reduktion der Natriumexkretion durch Endotheline beschrieben (Goetz et al., 1988; Miller et al., 1989). Wenngleich Endotheline eine natriuresefördernde Wirkung besitzen können (Harris et al., 1991; Hoffman et al., 2000; Schramek et al., 1992), wird diese Eigenschaft einer assoziierten Vasodilatation zugeschrieben (Harris et al., 1991) oder über eine an ET_B -Rezeptoren gekoppelte Stimulation der NO-Synthese vermittelt

(Hoffman et al., 2000). Einerseits bleibt die Expression von ET_B -Rezeptoren unter den vorliegenden Niedrigsalzbedingungen unverändert, während diejenige der ET_A -Rezeptoren signifikant ansteigt. Andererseits vermitteln die verstärkt exprimierten ET_A -Rezeptoren, welche nachweislich im Vas afferens von Mäusenieren vorgefunden werden, eine Vasokonstriktion. Der von Harris et al. (1991) beschriebene natriuresefördernde Effekt scheint an eine Vasodilatation gekoppelt, weshalb die gesteigerte Expression von ET_A -Rezeptoren unter Niedrigsalzbedingungen einer weiteren Natriurese entgegen wirken könnte: Unter der Annahme einer gleichbleibenden Endothelin-Konzentration würde eine verstärkte Expression von ET_A -Rezeptoren bei unveränderter Expression der ET_B -Rezeptoren eine Zunahme der renalen Vasokonstriktion nach sich ziehen (Clavell et al., 1995) und auf diese Weise einer ET_B -vermittelten Natriumretention mutmaßlich entgegen wirken. Damit ergänzen die erzielten Ergebnisse in gewisser Weise die Schlussfolgerungen von Schneider et al. (2007): Es ist gerade die vasodilatatorische Funktion der ET_B -Rezeptoren, die einer erhöhten Natriumlast zu begegnen versucht. Während die ET_A -vermittelte vasokonstriktorische Antwort unter einer Hochsalzdiät reduziert ist, kommt es unter einer Niedrigsalzdiät zu einer verstärkten ET_A -assoziierten Vasokonstriktion bei gleichbleibender Expression von ET_B -Rezeptoren. Untersuchungen von Herrera and Garvin (2005) zeigen, dass unter einer Hochsalzdiät, basierend auf einer Zunahme der Osmolalität im Nierenmark, die Expression von eNOS im dicken aufsteigenden Schenkel stimuliert und die Freisetzung von ET-1 gesteigert wird. Die Freisetzung von NO erfolgt ET_B -vermittelt (Plato et al., 2000). Da eine signifikante Veränderung der ET_B -mRNA unter Stimulation der Versuchstiere nicht gegeben ist, erscheint eine kompensatorische Einflussnahme des ET_B -Rezeptors weder bei Wildtyp- noch bei Knockout-Mäusen wahrscheinlich. Kurzum: Im Sinne von Kohan et al. (2011) sind die endothelialen Einflüsse auf die renale Regulation des Natriumhaushalts zu komplex, um anhand der obigen Beobachtung eine stringente Begründung für den zu erklärenden Sachverhalt finden zu können. Gleichwohl scheinen Erkenntnisse von Berthold et al. (1999) Licht ins Dunkel bringen zu können: Der Antagonismus des ET_A -Rezeptors vermag eine Stimulation des RAAS zu bedingen. In diesem Sinne läge eine gesteigerte Expression von ET_A -Rezeptoren im Falle eines stimulierten Reninsystems nahe, um einen kompensatorischen Effekt

auf das RAAS auszuüben.

Ergebnisse von Wagner et al. (1998) liefern Hinweise darauf, dass neben NO auch Prostaglandine in die physiologische Regulation des Reninsystems hinsichtlich der Salzaufnahme involviert sind: Die Stimulation der Reninfreisetzung über den Macula-densa-Mechanismus wird via Prostaglandin E_2 über einen Signalweg vermittelt, an welchem sowohl COX-2 als auch der Prostaglandinrezeptor EP4 beteiligt sind (Facemire et al., 2011). Möglicherweise kommt diesen beiden Signalwegen, wie bereits oben angedeutet, in der Regulation der Reninexpression eine größere Bedeutung zu als den Endothelinen. Eine Inhibition des Reninsystems durch Endotheline sowohl in vitro als auch in vivo, wie Wagner et al. (1998) suggerieren, kann anhand der obigen Daten nicht bestätigt werden. Die Bedeutung des ET_A -Rezeptors für die Stimulation des Reninsystems ist allenfalls in der Vermutung zu suchen, dass eine stärkere Expression von ET_A -Rezeptoren als Kompensationsmechanismus im Falle einer reduzierten Natriumlast dient, und steht im Einklang mit Schneider et al. (2007). Eine Einflussnahme anderer Art ist aus den oben dargelegten Ergebnissen nicht zu folgern, insbesondere schließen wir auch hier auf einen fehlenden Einfluss des ET_A -Rezeptors auf die Stimulation des Reninsystems.

Die funktionelle oder faktische reninzellspezifische Abwesenheit des ET_A -Rezeptors zieht somit keine signifikanten Veränderungen nach sich, eine zelluläre Einflussnahme auf das Reninsystem unter Stimulation muss negiert werden.

5.5 Schlussfolgerungen

Aus den oben dargelegten Ergebnissen lassen sich nachstehende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die Lokalisation der renalen Endothelinrezeptoren bei Mäusen mit Hilfe immunhistochemischer Analysen stimmt im Wesentlichen mit der in der Literatur beschriebenen Lokalisation dieser Rezeptoren bei Ratten überein. Es lassen sich anhand obiger Darstellungen folgende Differenzen konstatieren: Keine Expression von ET_B -Rezeptoren im Vas afferens, im distalem Tubulus und im Sammelrohr, fehlende Expression von ET_A -Rezeptoren im distalen Tubulus von Mäusenieren.

- Fehlende Nachweisbarkeit eines signifikanten Einflusses von Endothelinen auf die Elektrolythomöostase. Weitgehende Bestätigung des in der Literatur dargestellten Einflusses von Endothelin auf die Urinosmolalität.
- Der reninzellspezifische Knockout des ET_A -Rezeptors bedingt keine signifikanten Veränderungen des Reninsystems. Mögliche Einflüsse von Endothelinen auf das Reninsystem werden mutmaßlich von anderen Mechanismen kompensiert.
- Eine Einflussnahme des ET_A -Rezeptors auf die Regulation des Reninsystems kann ebenfalls nicht geschlussfolgert werden.
- In Anbetracht der zahlreich in der Niere vertretenen Endothelinrezeptoren stellen diese Schlussfolgerungen ein erstaunliches Resultat dar. Obgleich Endotheline durchaus zahlreiche Einflüsse auf die Regulation der Nierenfunktion sowie der Reninfreisetzung besitzen, resultieren bei funktioneller oder faktischer Abwesenheit der vermittelnden Endothelinrezeptoren keine signifikanten Auswirkungen auf die Nierenfunktion. Vermutlich liegt diese Tatsache in der Vielzahl effizienter regulatorischer Systeme auf das RAAS begründet.

5.6 Ausblick

Die dargelegten Ergebnisse bilden somit den Ausgangspunkt für darauf aufbauende Untersuchungen, um dem komplexen Einfluss des Endothelinsystems auf das Reninsystem weiter auf den Grund zu gehen. Von vorrangiger Bedeutung erscheinen folgende Fragestellungen:

- In der Literatur finden sich Hinweise auf ein komplexes Zusammenspiel von Endothelinen, Prostaglandinen und NO. Könnte über Signalwege dieser Art die fehlende Einflussnahme des Endothelinsystems kompensiert werden?
- Beeinflusst die Einschränkung des renalen Blutflusses über einen indirekten Effekt das Endothelinsystem?
- Welche Rolle spielt der ET_B -Rezeptor in der Regulation des Reninsystems? Welche Bedeutung kommt den Endothelinsubtypen ET_2 und ET_3 zu?

- Besteht eine Interaktion des Endothelinsystems mit weiteren vasokonstriktorisches Systemen der Niere, wie etwa dem Angiotensin-II- oder dem Vasopressinsystem?

Abkürzungsverzeichnis

Chemische und biologische Größen und Einheiten

bp	Basenpaare (base pairs)
Da	Dalton (1 Da = 1 Atommasseneinheit) ¹
I. E.	Internationale Einheit
M	Mol/Liter
pH	pH-Wert, Abk. des lat. Ausdrucks <i>pondus Hydrogenii</i>
U	enzymatische Einheit (Unit)

Physikalische Größen und Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung (engl. gravity)
g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
min	Minute(n)
s	Sekunde(n)
d	Tag(e)
V	Volt

Dezimale Vielfache von Einheiten

k	kilo (1×10^3)
---	--------------------------

¹Siehe auch Mortimer and Müller (2010).

Dezimale Vielfache von Einheiten

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

Sonstige Abkürzungen

3D	dreidimensional
%	Prozent
α -SMA	α -Glattmuskelaktin (α -smooth muscle actin)
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon (=Vasopressin)
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor, Subtyp 1
AT ₂	Angiotensin-II-Rezeptor, Subtyp 2
Anm.	Anmerkung
ATP	Adenosintriphosphat
A. U.	arbitrary unit (willkürliche Einheit)
BSA	bovine serum albumine (bovines Serum-Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	(ionisiertes) Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy desoxyribonucleic acid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CD	collecting duct (Sammelrohr)

Sonstige Abkürzungen

ch	chicken
COX	Cyclooxygenase
Cy2	Cyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy3	Indodicarbocyanin
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dk	donkey
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET	Endothelin
ET _A	Endothelin A
ET _B	Endothelin B
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
gt	goat
H ₂ O _{bidest}	zweifach entionisiertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HS	Pferdeserum (horse serum)
Ig	Immunglobulin
IMCD	Inner medullary collecting duct
i. p.	intraperitoneal
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat

Sonstige Abkürzungen

KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
L-NAME	L-N ^G -Nitroargininmethylester
LS	Lowsalt (Niedrigsalzdiät)
MD	Macula Densa
mRNA	messenger ribonucleic acid
ms	mouse
N_2	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	di-Natriumhydrogenphosphat
n. s.	nicht signifikant
NS	Normalsalt (Normalsalzdiät)
NOS	NO-Synthase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PGE_2	Prostaglandin E ₂
PGI_2	Prostaglandin I ₂
PIP2	Phosphatidyl-Inositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PTH	Parathormon (engl. parathyroid hormon)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rb	rabbit
RBF	renaler Blutfluss
resp.	respektive
RGB	Rot-Grün-Blau
RNA	Ribonukleinsäure

Sonstige Abkürzungen

RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts) ²
SI	Système international d'unités (Internationales Einheitensystem)
s. u.	siehe unten
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
ü. N.	über Nacht
V.	Vena
Vv.	Venae
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

²Der Standardfehler des arithmetischen Mittelwerts ist gegeben als

$$\sigma(\bar{X}) = \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

wobei σ die Standardabweichung einer einzelnen Messung und n die Anzahl der Stichproben bezeichnet.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung eines Glomerulus. Abbildung nach Junqueira et al. (2005).	6
1.2	Schematische Darstellung des Blutgefäßsystems der Niere. Abbildung nach Gray (2000).	10
1.3	Schematische Darstellung des juxtaglomerulären Apparates. Abbildung nach Davis and Freeman (1976).	11
1.4	Schematische Darstellung der Signalkaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.	14
1.5	Schematische Darstellung der Reninsynthese und -sekretion. Abbildung nach Schweda et al. (2007).	17
1.6	Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege. Abbildung nach Castrop et al. (2010).	23
1.7	Schematische Darstellung der Endothelinsynthese. Abbildung nach Kohan et al. (2011).	28
1.8	Schematische Darstellung der ET-1-Expression nach Kohan et al. (2011).	31
1.9	Schematische Darstellung der Verteilung der renalen Endothelin-Rezeptoren. Abbildung nach Kohan et al. (2011).	33
3.1	Prinzip der Alignierung. Nach Machura (2008).	62
4.1	Lokalisation von ET _A -Rezeptoren in der afferenten Arteriole der Niere einer Wildtyp-Maus.	72
4.2	Lokalisation von ET _B -Rezeptoren im Sammelrohrsystem der Niere einer Wildtyp-Maus.	74

4.3	Lokalisation von ET_B -Rezeptoren im Tubulussystem der Niere einer Wildtyp-Maus.	74
4.4	Lokalisation von ET_A -Rezeptoren im Sammelrohrsystem der Niere einer Wildtyp-Maus.	75
4.5	Graphische Gegenüberstellung der Kalium-Konzentrationen.	77
4.6	Graphische Gegenüberstellung der Natrium-Konzentrationen.	78
4.7	Graphische Gegenüberstellung der Urinosmolalität.	79
4.8	Überblick über die Renin-mRNA-Abundanz der oben dargelegten Versuchsanordnungen.	81
4.9	Überblick über die ET_A -mRNA-Abundanz der oben dargelegten Versuchsanordnungen.	82
4.10	Überblick über die ET_B -mRNA-Abundanz der oben dargelegten Versuchsanordnungen.	83
4.11	Immunfluoreszenzdoppelfärbung am Paraffinschnitt einer unbehandelten C57BL/6-Maus der Kontrollgruppe.	85
4.12	Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer C57BL/6-Maus nach Behandlung mit dem ET_A -Rezeptor-Antagonisten BQ 610.	86
4.13	Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer C57BL/6-Maus nach Behandlung mit dem ET_B -Rezeptor-Antagonisten BQ 788.	87
4.14	Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer unbehandelten Ren-1d ^{+ / Cre} - $ET_A^{fl/fl}$ -Maus.	88
4.15	3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin und Glattmuskelaktin in einem repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten unbehandelten C57BL/6-Maus.	90
4.16	3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin und Glattmuskelaktin in einem repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten C57BL/6-Maus nach Behandlung mit BQ 610.	91
4.17	3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin und Glattmuskelaktin in einem repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten C57BL/6-Maus nach Behandlung mit BQ 788.	92

4.18	3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin und Glattmuskelaktin in einem repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten Ren-1d ^{+/Cre} -ET _A ^{fl/fl} -Maus nach Normalsalz-Diät.	93
4.19	Renin-mRNA-Expression der ET _A ^{fl/fl} - und Ren-1d ^{+/Cre} -ET _A ^{fl/fl} -Mäuse unter Normalsalz-Ernährung und Stimulation.	95
4.20	ET _A -mRNA-Expression der ET _A ^{fl/fl} - und Ren-1d ^{+/Cre} -ET _A ^{fl/fl} -Mäuse unter Normalsalz-Ernährung und Stimulation.	96
4.21	ET _B -mRNA-Expression der ET _A ^{fl/fl} - und Ren-1d ^{+/Cre} -ET _A ^{fl/fl} -Mäuse unter Normalsalzbehandlung und Stimulation.	98
4.22	Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer unbehandelten Wildtyp-Maus.	99
4.23	Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus nach Stimulation mit Lowsalt-Diät und Enalapril.	100
4.24	Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer unbehandelten Ren-1d ^{+/Cre} -ET _A ^{fl/fl} -Maus.	102
4.25	Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Ren-1d ^{+/Cre} -ET _A ^{fl/fl} -Maus nach Stimulation durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	103
4.26	3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin und Glattmuskelaktin in einem repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten Wildtyp-Maus nach Stimulation mit Niedrigsalzdiät und Enalapril.	104
4.27	3D-Rekonstruktion der Immunreaktivität von Renin und Glattmuskelaktin in einem repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer adulten Ren-1d ^{+/Cre} -ET _A ^{fl/fl} -Maus nach Stimulation mit Niedrigsalzdiät und Enalapril.	105

Literaturverzeichnis

- Abrahamson, D. R., B. Robert, D. P. Hyink, P. L. S. John, and T. O. Daniel
1998. Origins and formation of microvasculature in the developing kidney. *Kidney International*, 54:S7–S11.
- Ackermann, M., T. Ritthaler, G. Riegger, A. Kurtz, and B. K. Krämer
1995. Endothelin inhibits camp-induced renin release from isolated renal juxtaglomerular cells. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 26:S135–137.
- Ahn, D., Y. Ge, P. K. Stricklett, P. Gill, D. Taylor, A. K. Hughes, M. Yanagisawa, L. Miller, R. D. Nelson, and D. E. Kohan
2004. Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 causes hypertension and sodium retention. *The Journal of clinical investigation*, 114(4):504–511.
- Antonipillai, I. and R. Horton
1985. Role of extra-and intracellular calcium and calmodulin in renin release from rat kidney. *Endocrinology*, 117(2):601–606.
- Arai, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo, and S. Nakanishi
1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor.
- Bader, M. and D. Ganten
2000. Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *Journal of Molecular Medicine*, 78(3):130–139.
- Badr, K., J. Murray, M. Breyer, K. Takahashi, T. Inagami, and R. Harris
1989. Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. elucidation of signal transduction pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 83(1):336.

- Barajas, L.
1979. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 237(5):F333–F343.
- Barton, M., C. C. Haudenschild, L. V. d’Uscio, S. Shaw, K. Münter, and T. F. Lüscher
1998. Endothelin eta receptor blockade restores no-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24):14367–14372.
- Beavo, J. A. et al.
1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiological reviews*, 75(4):725–748.
- Beierwaltes, W. H.
2006. cgmp stimulates renin secretion in vivo by inhibiting phosphodiesterase-3. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(6):F1376–F1381.
- Beierwaltes, W. H. and O. A. Carretero
1992. Nonprostanoid endothelium-derived factors inhibit renin release. *Hypertension*, 19(2 Suppl):II68.
- Berthold, H., K. Münter, A. Just, H. R. Kirchheim, and H. Ehmke
1999. Stimulation of the renin-angiotensin system by endothelin subtype a receptor blockade in conscious dogs. *Hypertension*, 33(6):1420–1424.
- Bock, H. A., M. Hermle, F. P. Brunner, and G. Thiel
1992. Pressure dependent modulation of renin release in isolated perfused glomeruli. *Kidney Int*, 41(2):275–280.
- Bremnes, T., J. D. Paasche, A. Mehlum, C. Sandberg, B. Bremnes, and H. Attramadal
2000. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23):17596–17604.

- Calo, G., J.-P. Gratton, S. Telemaque, P. D'Orléans-Juste, and D. Regoli
 1996. Pharmacology of endothelins: vascular preparations for studying eta and etb receptors. *Molecular and cellular biochemistry*, 154(1):31–37.
- Cantley, L. G., K. Spokes, B. Clark, E. G. McMahon, J. Carter, and F. H. Epstein
 1993. Role of endothelin and prostaglandins in radiocontrast-induced renal artery constriction. *Kidney international*, 44(6):1217–1223.
- Carey, R. M., H. E. McGrath, E. S. Pentz, R. A. Gomez, and P. Q. Barrett
 1997. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *Journal of Clinical Investigation*, 100(6):1566.
- Casellas, D., M. Dupont, N. Bouriquet, L. C. Moore, A. Artuso, and A. Mimran
 1994. Anatomic pairing of afferent arterioles and renin cell distribution in rat kidneys. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 267(6):F931–F936.
- Castellani, S., A. Ungar, G. L. Cava, C. Cantini, C. Stefanile, A. Camaiti, G. Messeri, M. Coppo, B. Vallotti, C. Di Serio, et al.
 1997. Renal adaptation to stress: a possible role of endothelin release and prostaglandin modulation in the human subject. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 129(4):462–469.
- Castrop, H., K. Höcherl, A. Kurtz, F. Schweda, V. Todorov, and C. Wagner
 2010. Physiology of kidney renin. *Physiological Reviews*, 90(2):607–673.
- Cavero, P. G., W. L. Miller, D. M. Heublein, K. Margulies, and J. Burnett
 1990. Endothelin in experimental congestive heart failure in the anesthetized dog. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 259(2):F312–F317.
- Chao, H., A. Waheed, R. Pohlmann, A. Hille, and K. Von Figura
 1990. Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *The EMBO journal*, 9(11):3507.
- Chen, L., S. M. Kim, M. Oppermann, R. Faulhaber-Walter, Y. Huang, D. Mizel, M. Chen, M. L. S. Lopez, L. S. Weinstein, R. A. Gomez, et al.
 2007. Regulation of renin in mice with cre recombinase-mediated deletion of

g protein g_{α} in juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(1):F27–F37.

Chomczynski, P. and N. Sacchi

1987. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1):156–159.

Chou, S., A. Dahhan, and J. G. Porush

1990. Renal actions of endothelin: interaction with prostacyclin. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 259(4):F645–F652.

Chow, L., S. Subramanian, G. J. Nuovo, F. Miller, and E. P. Nord

1995. Endothelin receptor mrna expression in renal medulla identified by in situ rt-pcr. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 269(3):F449–F457.

Churchill, P.

1985. Second messengers in renin secretion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 249(2):F175–F184.

Churchill, P. C., M. C. Churchill, and F. D. McDonald

1983. Evidence that β 1-adrenoceptor activation mediates isoproterenol-stimulated renin secretion in the rat. *Endocrinology*, 113(2):687–692.

Claria, J., W. Jimenez, G. Villa, M. Asbert, A. Castro, J. Llibre, V. Arroyo, and F. Rivera

1991. Effects of endothelin on renal haemodynamics and segmental sodium handling in conscious rats. *Acta physiologica scandinavica*, 141(3):305–308.

Clavell, A. L., A. J. Stingo, K. B. Margulies, R. Brandt, and J. Burnett

1995. Role of endothelin receptor subtypes in the in vivo regulation of renal function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 268(3):F455–F460.

Clozel, M. and J.-P. Clozel

1989. Effects of endothelin on regional blood flows in squirrel monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 250(3):1125–1131.

- Crowley, S. D., S. B. Gurley, M. I. Oliverio, A. K. Pazmino, R. Griffiths, P. J. Flannery, R. F. Spurney, H.-S. Kim, O. Smithies, T. H. Le, et al.
2005. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *The Journal of clinical investigation*, 115(115 (4)):1092–1099.
- Curtis, T. M. and C. N. Scholfield
2001. Nifedipine blocks ca^{2+} store refilling through a pathway not involving l-type ca^{2+} channels in rabbit arteriolar smooth muscle. *The Journal of physiology*, 532(3):609–623.
- Davenport, A. P., R. E. Kuc, S. L. Hoskins, F. E. Karet, and F. Fitzgerald
1994. [125i]-pd151242: a selective ligand for endothelin eta receptors in human kidney which localizes to renal vasculature. *British journal of pharmacology*, 113(4):1303–1310.
- Davis, J. and R. Freeman
1976. Mechanisms regulating renin release. *Physiological Reviews*, 56(1):1–56.
- De Gasparo, M., K. Catt, T. Inagami, J. Wright, and T. Unger
2000. International union of pharmacology. xxiii. the angiotensin ii receptors. *Pharmacological reviews*, 52(3):415–472.
- Della Bruna, R., A. Kurtz, P. Corvol, and F. Pinet
1993. Renin mrna quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells. short-term effects of camp on renin mrna and secretion. *Circulation research*, 73(4):639–648.
- Denault, J.-B., A. Claing, P. D'Orléans-Juste, T. Sawamura, T. Kido, T. Masaki, and R. Leduc
1995. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS letters*, 362(3):276–280.
- Denton, K. M., A. Shweta, L. Finkelstein, R. L. Flower, and R. G. Evans
2004. Effect of endothelin-1 on regional kidney blood flow and renal arterio-

le calibre in rabbits. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 31(8):494–501.

DiBona, G. F.

2000. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(5):R1517–R1524.

Dickinson, D. P., K. W. Gross, N. Piccini, and C. M. Wilson

1984. Evolution and variation of renin genes in mice. *Genetics*, 108(3):651–667.

D’Orleans-Juste, P., M. Plante, J. Honore, E. Carrier, and J. Labonte

2003. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 81(6):503–510.

Dzau, V. J., D. W. Burt, and R. E. Pratt

1988. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 255(4):F563–F573.

Edwards, R. M. and W. Trizna

1995. Characterization of 125i-endothelin-1 binding to rat and rabbit renal microvasculature. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274(3):1084–1089.

Emoto, N. and M. Yanagisawa

1995. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic ph optimum. *Journal of Biological Chemistry*, 270(25):15262–15268.

Evans, N. J. and J. W. Walker

2008. Endothelin receptor dimers evaluated by fret, ligand binding, and calcium mobilization. *Biophysical journal*, 95(1):483–492.

Evans, R. G., A. C. Madden, J. J. Oliver, and T. V. Lewis

2001. Effects of eta-and etb-receptor antagonists on regional kidney blood flow,

- and responses to intravenous endothelin-1, in anaesthetized rabbits. *Journal of hypertension*, 19(10):1789–1799.
- Facemire, C. S., M. Nguyen, L. Jania, W. H. Beierwaltes, H.-S. Kim, B. H. Koller, and T. M. Coffman
2011. A major role for the ep4 receptor in regulation of renin. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 301(5):F1035–F1041.
- Faust, P. L., J. M. Chirgwin, and S. Kornfeld
1987. Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *The Journal of cell biology*, 105(5):1947–1955.
- Fray, J.
1976. Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney. *American Journal of Physiology–Legacy Content*, 231(3):936–944.
- Freed, M., K. Thompson, D. Wilson, R. Etheredge, and D. Jorkasky
1996. Endothelin (et) receptor antagonism does not alter renal hemodynamic responses or urinary sodium excretion in healthy humans. In *Journal of the american society of nephrology*, volume 7, Pp. A1657–A1657. Williams & Williams, 351 West Camden, St. Baltimore.
- Friis, U. G., B. L. Jensen, S. Sethi, D. Andreasen, P. B. Hansen, and O. Skøtt
2002. Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by camp-specific phosphodiesterases. *Circulation research*, 90(9):996–1003.
- Fuchs, S., S. Germain, J. Philippe, P. Corvol, and F. Pinet
2002. Expression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promoter/lacZ transgenic mouse. *The American journal of pathology*, 161(2):717–725.
- Gambaryan, S., C. Häusler, T. Markert, D. Pöhler, T. Jarchau, U. Walter, W. Haase, A. Kurtz, and S. M. Lohmann
1996. Expression of type ii cgmp-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *Journal of Clinical Investigation*, 98(3):662.

- Gardes, J., J.-M. Poux, M.-F. Gonzalez, F. Alhenc-Gelas, and J. Menard
1992. Decreased renin release and constant kallikrein secretion after injection of l-name in isolated perfused rat kidney. *Life sciences*, 50(14):987–993.
- Ge, Y., D. Ahn, P. K. Stricklett, A. K. Hughes, M. Yanagisawa, J. G. Verbalis, and D. E. Kohan
2005. Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 alters vasopressin regulation of urine osmolality. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 288(5):F912–F920.
- Ge, Y., A. Bagnall, P. K. Stricklett, K. Strait, D. J. Webb, Y. Kotelevtsev, and D. E. Kohan
2006. Collecting duct-specific knockout of the endothelin b receptor causes hypertension and sodium retention. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 291(6):F1274–F1280.
- Ge, Y., A. Bagnall, P. K. Stricklett, D. Webb, Y. Kotelevtsev, and D. E. Kohan
2008. Combined knockout of collecting duct endothelin a and b receptors causes hypertension and sodium retention. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 295(6):F1635–F1640.
- Goetz, K. L., B. Wang, J. B. Madwed, J. Zhu, and R. Leadley
1988. Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 255(6):R1064–R1068.
- Gomez, R. A., R. L. Chevalier, A. D. Everett, J. P. Elwood, M. J. Peach, K. R. Lynch, and R. M. Carey
1990. Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 259(4):F660–F665.
- Gray, H.
2000. *Anatomy of the Human Body*, 20th edition. Philadelphia: Lea & Febiger; Bartleby.com.

- Greenberg, S. G., X. He, J. B. Schnermann, and J. P. Briggs
1995. Effect of nitric oxide on renin secretion. i. studies in isolated juxtaglomerular granular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 268(5):F948–F952.
- Grünberger, C., B. Obermayer, J. Klar, A. Kurtz, and F. Schweda
2006. The calcium paradoxon of renin release calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases ac5 and ac6. *Circulation research*, 99(11):1197–1206.
- Guo, X. and T. Yang
2006. Endothelin b receptor antagonism in the rat renal medulla reduces urine flow rate and sodium excretion. *Experimental Biology and Medicine*, 231(6):1001–1005.
- Hackbarth, H., C. Buchholz, P. Franke, L. Gunter, H. Tapken, and C. Messow
1987. Comparative histometric studies of the size of kidney glomeruli in the mouse, rat and hamster. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 94(2):58–61.
- Hackenthal, E., M. Paul, D. Ganten, and R. Taugner
1990. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol rev*, 70(4):1067–1116.
- Hano, T., M. Shiotani, A. Baba, Y. Nakamura, Y. Tomobuchi, I. Nishio, Y. Masuyama, et al.
1990. Contribution of calmodulin and protein kinase c to renin release in spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension*, 3(8 Pt 2):206S–209S.
- Harris, P., J. Zhuo, F. Mendelsohn, and S. Skinner
1991. Haemodynamic and renal tubular effects of low doses of endothelin in anaesthetized rats. *The Journal of Physiology*, 433(1):25–39.
- He, X.-R., S. Greenberg, J. Briggs, and J. Schnermann
1995. Effect of nitric oxide on renin secretion. ii. studies in the perfused

juxtaglomerular apparatus. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 268(5):F953–F959.

Hees, H. and F. Sinowatz

2000. *Histologie – Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.

Heller, J., H. J. Kramer, and V. Horacek

1996. Action of endothelin-1 on glomerular haemodynamics in the dog: lack of direct effects on glomerular ultrafiltration coefficient. *Clinical Science*, 90(5):385–391.

Herrera, M. and J. L. Garvin

2005. A high-salt diet stimulates thick ascending limb enos expression by raising medullary osmolality and increasing release of endothelin-1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 288(1):F58–F64.

Herrera, M., N. J. Hong, P. A. Ortiz, and J. L. Garvin

2009. Endothelin-1 inhibits thick ascending limb transport via akt-stimulated nitric oxide production. *Journal of Biological Chemistry*, 284(3):1454–1460.

Hickey, K. A., G. Rubanyi, R. J. Paul, and R. F. Highsmith

1985. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 248(5):C550–C556.

Hirose, S., S.-J. Kim, H. Miyazaki, Y.-s. Park, and K. Murakami

1985. In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 260(30):16400–16405.

Höcherl, K., K. Wolf, H. Castrop, K. Ittner, M. Bucher, F. Kees, H. F. Grobecker, and A. Kurtz

2001. Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin ii at 1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 442(6):821–827.

- Hodsman, G., J. Zabudowski, C. Zoccali, R. Fraser, J. Morton, G. Murray, and J. Robertson
1984. Enalapril (mk421) and its lysine analogue (mk521): a comparison of acute and chronic effects on blood pressure, renin-angiotensin system and sodium excretion in normal man. *British journal of clinical pharmacology*, 17(3):233–241.
- Hoffman, A., Z. A. Abassi, S. Brodsky, R. Ramadan, and J. Winaver
2000. Mechanisms of big endothelin-1-induced diuresis and natriuresis role of etb receptors. *Hypertension*, 35(3):732–739.
- Holm, I., R. Ollo, J. Panthier, and F. Rougeon
1984. Evolution of aspartyl proteases by gene duplication: the mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exons. *The EMBO journal*, 3(3):557.
- Holmer, S., K.-U. Eckardt, M. LeHir, K. Schricker, G. Riegger, and A. Kurtz
1993. Influence of dietary nacl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Pflügers Archiv*, 425(1-2):62–67.
- Holmer, S. R., B. Kaissling, K. Putnik, M. Pfeifer, B. K. Krämer, G. A. Riegger, and A. Kurtz
1997. Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *Journal of hypertension*, 15(12):1471–1479.
- Iglarz, M., C. Binkert, K. Morrison, W. Fischli, J. Gatfield, A. Treiber, T. Weller, M. H. Bolli, C. Boss, S. Buchmann, et al.
2008. Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(3):736–745.
- Ikeda, M., M. Kohno, and T. Takeda
1995. Endothelin production in cultured mesangial cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 25(4):1–6.
- Ishikawa, K., M. Ihara, K. Noguchi, T. Mase, N. Mino, T. Saeki, T. Fukuroda,

- T. Fukami, S. Ozaki, and T. Nagase
1994. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin b-receptor antagonist, bq-788. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11):4892–4896.
- Jensen, B. L., C. Schmid, and A. Kurtz
1996. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mrna in mouse renal juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 271(3):F659–F669.
- Johnström, P., T. D. Fryer, H. K. Richards, N. G. Harris, O. Barret, J. C. Clark, J. D. Pickard, and A. P. Davenport
2005. Positron emission tomography using 18f-labelled endothelin-1 reveals prevention of binding to cardiac receptors owing to tissue-specific clearance by etb receptors in vivo. *British journal of pharmacology*, 144(1):115–122.
- Junqueira, L., J. Carneiro, and M. Gratzl
2005. *Histologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Kageyama, S. and J. Brown
1990. Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in rat isolated glomeruli. *Biochemical and biophysical research communications*, 168(1):37–42.
- Karet, F. E., R. E. Kuc, and A. P. Davenport
1993. Novel ligands bq123 and bq3020 characterize endothelin receptor subtypes et a and et b in human kidney. *Kidney international*, 44(1):36–42.
- Keeton, T. K. and W. B. Campbell
1980. The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacological Reviews*, 32(2):81–227.
- Kitamura, K., T. Tanaka, J. Kato, T. Eto, and K. Tanaka
1989. Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochemical and biophysical research communications*, 161(1):348–352.

- Klar, J., P. Sandner, M. W. Müller, and A. Kurtz
2002. Cyclic amp stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflügers Archiv*, 444(3):335–344.
- Klinke, R., H.-C. Pape, and S. Silbernagl
2005. *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kohan, D. E., A. K. Hughes, and S. L. Perkins
1992. Characterization of endothelin receptors in the inner medullary collecting duct of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 267(17):12336–12340.
- Kohan, D. E. and E. Padilla
1992. Endothelin-1 is an autocrine factor in rat inner medullary collecting ducts. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 263(4):F607–F612.
- Kohan, D. E., N. F. Rossi, E. W. Inscho, and D. M. Pollock
2011. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiological reviews*, 91(1):1–77.
- Kon, Y.
1999. Comparative study of renin-containing cells. histological approaches. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(10):1075–1086.
- Kono, T., F. Ikeda, F. Oseko, H. Imura, and J. Endo
1981. Suppression of captopril-induced increase in plasma renin activity by des-asp1-, ileu8-angiotensin ii in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 52(2):354–358.
- Krämer, B. K., K. Schricker, H. Scholz, M. Clozel, G. A. Riegger, and A. Kurtz
1996. Role of endothelins for renin regulation. *Kidney International Supplement*, (55).
- Kurihara, Y., H. Kurihara, H. Suzuki, T. Kodama, K. Maemura, R. Nagai, H. Oda, T. Kuwaki, W.-H. Cao, N. Kamada, et al.
1994. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*, 368(6473):703–710.

- Kurtz, A.
1989. *Cellular control of renin secretion*. Springer.
- Kurtz, A., R. Della Bruna, J. Pfeilschifter, R. Taugner, and C. Bauer
1986. Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cgmp-mediated process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(13):4769–4773.
- Kurtz, A., R. Muff, W. Born, J. Lundberg, B. Millberg, M. Gnädinger, D. Uehlinger, P. Weidmann, T. Hökfelt, and J. Fischer
1988. Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 82(2):538.
- Kurtz, A. and R. Penner
1989. Angiotensin ii induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(9):3423–3427.
- Kurtz, A. and C. Wagner
1999. Cellular control of renin secretion. *Journal of experimental biology*, 202(3):219–225.
- Lalli, E., P. Sassone-Corsi, O. Rivero-Lezcano, J. Sameshima, A. Marcilla, K. Robbins, M. Köhler, H. Kornau, P. Seeburg, E. Angotti, et al.
1994. Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to camp. *Signal transduction*, 269(26).
- Law, R. and R. J. Summers
1987. The distribution of β -adrenoceptors in dog kidney: an autoradiographic analysis. *European journal of pharmacology*, 140(1):1–11.
- Leonhardt, H.
1990. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

- Lerman, A., F. Hildebrand, L. L. Aarhus, and J. Burnett
1991. Endothelin has biological actions at pathophysiological concentrations. *Circulation*, 83(5):1808–1814.
- Linas, S. L. and D. Dickmann
1982. Mechanism of the decreased renal blood flow in the potassium-depleted conscious rat. *Kidney international*, 21(5):757–764.
- Liu, A. and B. J. Ballermann
1998. Tgf- β type ii receptor in rat renal vascular development: Localization to juxtaglomerular cells. *Kidney international*, 53(3):716–725.
- Liu, Y., J. Yang, H. Ren, D. He, A. Pascua, M. I. Armando, C. Yang, L. Zhou, R. A. Felder, P. A. Jose, et al.
2009. Inhibitory effect of etb receptor on na⁺-k⁺ atpase activity by extracellular ca²⁺ entry and ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum in renal proximal tubule cells. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 32(10):846.
- Lüllmann-Rauch, R.
2015. *Histologie*. Stuttgart and New York: Georg Thieme Verlag.
- Machura, K.
2008. *Zeitlich-räumliche Entwicklung der Reninexpression in der Mausniere*. PhD thesis.
- Matsumura, Y., K. Hisaki, T. Ohyama, K. Hayashi, and S. Morimoto
1989a. Effects of endothelin on renal function and renin secretion in anesthetized rats. *European journal of pharmacology*, 166(3):577–580.
- Matsumura, Y., K. Nakase, R. Ikegawa, K. Hayashi, T. Ohyama, and S. Morimoto
1989b. The endothelium-derived vasoconstrictor peptide endothelin inhibits renin release in vitro. *Life sciences*, 44(2):149–157.
- Matsuura, T., K. Miura, T. Ebara, T. Yukimura, S. Yamanaka, S. Kim, and H. Iwao
1997. Renal vascular effects of the selective endothelin receptor antagonists in anaesthetized rats. *British journal of pharmacology*, 122(1):81–86.

Means, A. R. and J. R. Dedman

1980. Calmodulin—an intracellular calcium receptor. *Nature*, 285(5760):73–77.

Mercure, C., D. Ramla, R. Garcia, G. Thibault, C. F. Deschepper, and T. L. Reudelhuber

1998. Evidence for intracellular generation of angiotensin ii in rat juxtaglomerular cells. *FEBS letters*, 422(3):395–399.

Miller, W. L., M. M. Redfield, and J. C. Burnett Jr

1989. Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin. *Journal of Clinical Investigation*, 83(1):317.

Miura, K., T. Yukimura, Y. Yamashita, T. Shimmen, M. Okumura, M. Imanishi, and K. Yamamoto

1989. Endothelin stimulates the renal production of prostaglandin e 2 and i 2 in anesthetized dogs. *European journal of pharmacology*, 170(1):91–93.

Moe, O., A. Tejedor, W. B. Campbell, R. J. Alpern, and W. Henrich

1991. Effects of endothelin on in vitro renin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 260(4):E521–E525.

Morris, B. J.

1992. Molecular biology of renin i: Gene and protein structure, synthesis and processing. *Journal of hypertension*, 10(3):209–214.

Mortimer, C. E. and U. Müller

2010. *Chemie*. Stuttgart: Thieme Verlag.

Mulisch, M. and U. Welsch

2015. *Romeis – Mikroskopische Technik*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Naess, P., G. Christensen, and F. Kiil

1993. Inhibitory effect of endothelin on renin release in dog kidneys. *Acta physiologica scandinavica*, 148(2):131–136.

- Neubauer, B., K. Machura, M. Chen, L. S. Weinstein, M. Oppermann, M. L. Sequeira-Lopez, R. A. Gomez, J. Schnermann, H. Castrop, A. Kurtz, et al.
2009. Development of vascular renin expression in the kidney critically depends on the cyclic amp pathway. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 296(5):F1006–F1012.
- Noble, A. R., R. A. Abu-Kishk, M.-A. E. D'Aloia, B. C. Williams, and D. J. Lush
1994. Cyclic gmp-linked pathway for renin secretion. *Kidney international*, 46(6):1588–1590.
- Oates, H. F., G. S. Stokes, and R. G. Glover
1974. Plasma renin response to acute blockade of angiotensin ii in the anaesthetized rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 1(2):155–160.
- Oliverio, M. I., K. Madsen, C. F. Best, M. Ito, N. Maeda, O. Smithies, and T. M. Coffman
1998. Renal growth and development in mice lacking at1a receptors for angiotensin ii. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 274(1):F43–F50.
- Ong, A. C., T. P. Jowett, J. D. Firth, S. Burton, F. E. Karet, and L. G. Fine
1995. An endothelin-1 mediated autocrine growth loop involved in human renal tubular regeneration. *Kidney international*, 48(2):390–401.
- Ortiz-Capisano, M. C., P. A. Ortiz, P. Harding, J. L. Garvin, and W. H. Beierwaltes
2007. Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase. *Hypertension*, 49(1):162–169.
- Osborn, J., G. DiBona, and M. Thames
1981. Beta-1 receptor mediation of renin secretion elicited by low-frequency renal nerve stimulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 216(2):265–269.
- Pan, L., T. A. Black, Q. Shi, C. A. Jones, N. Petrovic, J. Loudon, C. Kane, C. D. Sigmund, and K. W. Gross
2001. Critical roles of a cyclic amp responsive element and an e-box in regulation

of mouse renin gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49):45530–45538.

Paul, M., A. P. Mehr, and R. Kreutz

2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews*, 86(3):747–803.

Pernow, J. and A. Modin

1993. Endothelial regulation of coronary vascular tone in vitro: contribution of endothelin receptor subtypes and nitric oxide. *European journal of pharmacology*, 243(3):281–286.

Peters, J. and S. Clausmeyer

2002. Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(12):1561–1568.

Peti-Peterdi, J., A. Fintha, A. L. Fuson, A. Tousson, and R. H. Chow

2004. Real-time imaging of renin release in vitro. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 287(2):F329–F335.

Petrovic, N., C. M. Kane, C. D. Sigmund, and K. W. Gross

1997. Downregulation of renin gene expression by interleukin-1. *Hypertension*, 30(2):230–235.

Pfeilschifter, J., A. Kurtz, and C. Bauer

1985. Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglycerol ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 127(3):903–910.

Pietri, L., M. Bloch-Faure, M.-F. Belair, L. P. Sanford, T. Doetschman, J. Ménard, P. Bruneval, and P. Meneton

2002. Altered renin synthesis and secretion in the kidneys of heterozygous mice with a null mutation in the *tgf- β 2* gene. *Nephron Experimental Nephrology*, 10(5-6):374–382.

Plato, C. F., D. M. Pollock, and J. L. Garvin

2000. Endothelin inhibits thick ascending limb chloride flux via etb receptor-mediated no release. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279(2):F326–F333.

Pollock, D. M. and T. J. Opgenorth

1993. Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of eta receptor activation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 264(1):R222–R226.

Pollock, D. M. and T. J. Opgenorth

1994. Eta receptor-mediated responses to endothelin-1 and big endothelin-1 in the rat kidney. *British journal of pharmacology*, 111(3):729–732.

Pöschke, A., N. Kern, T. Maruyama, H. Pavenstädt, S. Narumiya, B. L. Jensen, and R. M. Nüsing

2012. The pge2-ep4 receptor is necessary for stimulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in response to low dietary salt intake in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 303(10):F1435–F1442.

Prié, S., D. J. Stewart, and J. Dupuis

1998. Endothelin a receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 97(21):2169–2174.

Prins, B. A., R.-M. Hu, B. Nazario, A. Pedram, H. Frank, M. A. Weber, and E. R. Levin

1994. Prostaglandin e2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16):11938–11944.

Qiu, C., L. Samsell, and C. Baylis

1995. Actions of endogenous endothelin on glomerular hemodynamics in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 269(2):R469–R473.

- Rakugi, H., M. Nakamaru, H. Saito, J. Higaki, and T. Ogihara
1988. Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochemical and biophysical research communications*, 155(3):1244–1247.
- Reddi, V., A. Zaglul, E. Pentz, and R. Gomez
1998. Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(1):63–71.
- Ritthaler, T., R. Della Bruna, B. K. Krämer, and A. Kurtz
1996. Endothelins inhibit cyclic-amp induced renin gene expression in cultured mouse juxtaglomerular cells. *Kidney international*, 50(1):108–115.
- Ritthaler, T., H. Scholz, M. Ackermann, G. Riegger, A. Kurtz, and B. K. Kramer
1995. Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 268(1):F39–F45.
- Rossi, G. P., A. Sacchetto, M. Cesari, and A. C. Pessina
1999. Interactions between endothelin-1 and the renin–angiotensin–aldosterone system. *Cardiovascular research*, 43(2):300–307.
- Ryan, M. J., T. A. Black, S. L. Millard, K. W. Gross, and G. Hajduczuk
2002. Endothelin-1 increases calcium and attenuates renin gene expression in as4. 1 cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(6):H2458–H2465.
- Ryan, M. J., K. W. Gross, and G. Hajduczuk
2000. Calcium-dependent activation of phospholipase c by mechanical distension in renin-expressing as4. 1 cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 279(4):E823–E829.
- Saito, M., S. Homma, I. Yamatsu, M. Sato, and N. Ohshima
1994. Visualization of renal microcirculation in isolated munich-wistar rat kidneys: effects of endothelin-1 on renal hemodynamic activity. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 66(2):221–229.

- Sakurai, T., M. Yanagisawa, Y. Takuwat, H. Miyazakit, S. Kimura, K. Goto, and T. Masaki
1990. Cloning of a cdna encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, 348(6303):732–735.
- Sandgaard, N. and P. Bie
1996. Natriuretic effect of non-pressor doses of endothelin-1 in conscious dogs. *The Journal of physiology*, 494(Pt 3):809.
- Sandner, P., M. Kornfeld, X. Ruan, W. J. Arendshorst, and A. Kurtz
1999. Nitric oxide/camp interactions in the control of rat renal vascular resistance. *Circulation research*, 84(2):186–192.
- Sauter, A., K. Machura, B. Neubauer, A. Kurtz, and C. Wagner
2008. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney international*, 73(1):43–51.
- Schneider, M. P., E. W. Inscho, and D. M. Pollock
2007. Attenuated vasoconstrictor responses to endothelin in afferent arterioles during a high-salt diet. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(4):F1208–F1214.
- Schnermann, J.
1998. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274(2):R263–R279.
- Schnermann, J., J. N. Lorenz, J. P. Briggs, and J. A. Keiser
1992. Induction of water diuresis by endothelin in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 263(3):F516–F526.
- Scholz, H., M. Hamann, K.-H. Götz, and A. Kurtz
1994. Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflügers Archiv*, 428(2):173–178.

- Scholz, H., B. Krämer, M. Hamann, K.-H. Götz, and A. Kurtz
 1995. Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta physiologica scandinavica*, 155(2):173–182.
- Schramek, H., C. Willinger, G. Gstraunthaler, and W. Pfaller
 1992. Endothelin-3 modulates glomerular filtration rate in the isolated perfused rat kidney. *Kidney and Blood Pressure Research*, 15(6):325–333.
- Schricker, K. and A. Kurtz
 1993. Liberators of no exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 265(2):F180–F186.
- Schricker, K., H. Scholz, M. Hamann, M. Clozel, B. K. Krämer, and A. Kurtz
 1995. Role of endogenous endothelins in the renin system of normal and two-kidney, one clip rats. *Hypertension*, 25(5):1025–1029.
- Schulz, E., F. Ruschitzka, S. Lueders, R. Heydenbluth, J. Schrader, and G. A. Müller
 1995. Effects of endothelin on hemodynamics, prostaglandins, blood coagulation and renal function. *Kidney international*, 47(3):795–801.
- Schunkert, H., J. R. Ingelfinger, H. Jacob, B. Jackson, B. Bouyounes, and V. J. Dzau
 1992. Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mrna expressions by angiotensin ii. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 263(5):E863–E869.
- Schweda, F., U. Friis, C. Wagner, O. Skott, and A. Kurtz
 2007. Renin release. *Physiology*, 22(5):310–319.
- Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher
 2009. *Prometheus – Lernatlas der Anatomie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Sealey, J., S. Atlas, and J. Laragh

1983. Prorenin in plasma and kidney. In *Federation proceedings*, volume 42, Pp. 2681–2689.

Sequeira-Lopez, M. L., E. S. Pentz, B. Robert, D. R. Abrahamson, and R. A. Gomez

2001. Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 281(2):F345–F356.

Simonson, M. S. and M. J. Dunn

1990. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *The FASEB Journal*, 4(12):2989–3000.

Skinner, S. L., J. W. McCubbin, and I. H. Page

1964. Renal baroreceptor control of acute renin release in normotensive, nephrogenic and neurogenic hypertensive dogs. *Circulation research*, 15(6):522–531.

Skøtt, O.

1986. Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflügers Archiv*, 407(1):41–45.

Skøtt, O. and J. P. Briggs

1987. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science*, 237(4822):1618–1620.

Smith, H. W.

1951. *The kidney: structure and function in health and disease*. Oxford University Press, USA.

Speckmann, E.-J., J. Hescheler, and R. Köhling

2013. *Physiologie*. München: Elsevier, Urban & Fischer.

Steckelings, U.

2011. *Der Angiotensin-AT₂-Rezeptor: Untersuchungen zu Expression, physiologischen Wirkungen und zum therapeutischen Potential einer pharmakologischen Stimulation*. PhD thesis, Berlin, Medizinische Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin, Habilitationsschr., 2011.

- Takagi, M., H. Matsuoka, K. Atarashi, and S. Yagi
1988. Endothelin: a new inhibitor of renin release. *Biochemical and biophysical research communications*, 157(3):1164–1168.
- Takagi, M., H. Tsukada, H. Matsuoka, and S. Yagi
1989. Inhibitory effect of endothelin on renin release in vitro. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 257(6):E833–E838.
- Takemoto, F., S. Uchida, E. Ogata, and K. Kurokawa
1993. Endothelin-1 and endothelin-3 binding to rat nephrons. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 264(5):F827–F832.
- Taquini, A. C., P. Blaquier, and A. C. Taquini Jr.
1964. On the production and role of renin. *Canadian Medical Association Journal*, 90(4):210.
- Taugner, R., C. P. Bührle, and R. Nobiling
1984. Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell and tissue research*, 237(3):459–472.
- Taugner, R., S.-J. Kim, K. Murakami, and R. Waldherr
1987. The fate of prorenin during granulopoiesis in epithelioid cells. *Histochemistry*, 86(3):249–253.
- Terada, Y., K. Tomita, H. Nonoguchi, and F. Marumo
1992. Different localization of two types of endothelin receptor mrna in microdissected rat nephron segments using reverse transcription and polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Investigation*, 90(1):107.
- Tharaux, P.-L., J.-C. Dussaule, M.-D. Pauti, Y. Vassitch, R. Ardaillou, and C. Chatziantoniou
1997. Activation of renin synthesis is dependent on intact nitric oxide production. *Kidney international*, 51(6):1780–1787.
- Tigerstedt, R. and P. Bergman
1898. Niere und kreislauf. *Skandinavisches Archiv für Physiologie*, 8(1):223–271.

- Tobian, L., M. Braden, and J. Maney
1965. Effect of unilateral renal denervation on secretion of renin. In *Federation Proceedings*, volume 24, P. 405. Federation amer soc exp biol, Rockville Pike, Bethesda.
- Todorov, V., M. Müller, F. Schweda, and A. Kurtz
2002. Tumor necrosis factor- α inhibits renin gene expression. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(5):R1046–R1051.
- Uzuner, K. and R. Banks
1993. Endothelin-induced natriuresis and diuresis are pressure-dependent events in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 265(1):R90–R96.
- Vander, A. J.
1967. Control of renin release. *Physiol Rev*, 47(3):359–382.
- Vandongen, R., W. S. Peart, and G. W. Boyd
1974. Effect of angiotensin ii and its nonpressor derivatives on renin secretion. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 226(2):277–282.
- Verhaar, M. C., F. E. Strachan, D. E. Newby, N. L. Cruden, H. A. Koomans, T. J. Rabelink, and D. J. Webb
1998. Endothelin-a receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-b receptor blockade. *Circulation*, 97(8):752–756.
- Vignon-Zellweger, N., S. Heiden, T. Miyauchi, and N. Emoto
2012. Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life sciences*, 91(13):490–500.
- Vuurmans, J. T., P. Boer, and H. A. Koomans
2004. Effects of endothelin-1 and endothelin-1-receptor blockade on renal function in humans. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(11):2742–2746.

- Wagner, C., M. Hinder, B. K. Krämer, and A. Kurtz
1999. Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension*, 34(5):1101–1105.
- Wagner, C., B. L. Jensen, B. K. Krämer, and A. Kurtz
1998. Control of the renal renin system by local factors. *Kidney International*, 54:S78–S83.
- Wagner, C. and A. Kurtz
1998. Regulation of renal renin release. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 7(4):437–441.
- Wagner, O. F., G. Christ, J. Wojta, H. Vierhapper, S. Parzer, P. J. Nowotny, B. Schneider, W. Waldhäusl, and B. R. Binder
1992. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 267(23):16066–16068.
- Watts, S. W.
2010. Endothelin receptors: what's new and what do we need to know? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(2):R254–R260.
- Wehner, R., W. Gehring, and W. J. Gehring
2007. *Zoologie: 17 Tabellen; Glossar mit 830 Stichworten*. Georg Thieme Verlag.
- Weisert, J.
1990. *Zur mikroskopischen Anatomie der Niere von Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Hamster: eine vergleichende Literaturstudie*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Welsch, U.
2009. *Sobotta Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. Elsevier, Urban & Fischer.
- Wendel, M., L. Knels, W. Kummer, and T. Koch
2006. Distribution of endothelin receptor subtypes eta and etb in the rat kidney. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(11):1193–1203.

- Xu, D., N. Emoto, A. Giaid, C. Slaughter, S. Kaw, M. Yanagisawa, et al.
1994. Ece-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*, 78(3):473–485.
- Yamashita, Y., T. Yukimura, K. Miura, M. Okumura, and K. Yamamoto
1991. Effects of endothelin-3 on renal functions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259(3):1256–1260.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, T. Masaki, et al.
1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *nature*, 332(6163):411–415.
- Yokota, T., Y. Kawakami, Y. Nagai, J.-X. Ma, J.-Y. Tsai, P. W. Kincade, and S. Sato
2006. Bone marrow lacks a transplantable progenitor for smooth muscle type α -actin-expressing cells. *Stem Cells*, 24(1):13–22.
- Yukimura, T., Y. Yamashita, K. Miura, S. Kim, H. Iwao, M. Takai, and T. Okada
1994. Renal vasodilating and diuretic actions of a selective endothelin et b receptor agonist, irl1620. *European journal of pharmacology*, 264(3):399–405.
- Zhang, Y., T. Morgan, and G. Read
1992. The role of the renal nerves in renin synthesis. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 19(12):827–831.
- Zhao, X., P. Gong, Y. Lin, J. Wang, X. Yang, and X. Cai
2012. Characterization of α -smooth muscle actin positive cells during multilineage differentiation of dental pulp stem cells. *Cell proliferation*, 45(3):259–265.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der letzten Jahre unterstützt und auf diese Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner für die Vergabe des Themas sowie für die Anleitung während der gesamten Bearbeitungszeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Björn Neubauer für seine ausdauernde und unkomplizierte Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Katharina Machura, Dr. Dominik Steppan sowie Thomas Neder, die mir stets mit Rat zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle bei Anna M'Bangui und Gerda Treuner für ihre kompetente Unterstützung bei allen Arbeiten im Labor bedanken.

Eigenständigkeitserklärung

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

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. 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 in Anspruch genommen. Niemand hat von mir mittelbar oder unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 07. November 2016

Christoph Langer

