

**Die Aldo-Keto-Reduktase AKR1B7:
Koexpression mit Renin in der
Mausniere und Einfluss auf die
Reninexpression und -sekretion**

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

VORGELEGT VON

ELINA BENKOWITSCH GEB. IANKILEVITCH

AUS
TOMSK, RUSSISCHE FÖDERATION

IM JAHR
2017

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 20.01.2017

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

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2012 bis Dezember 2016 unter der Anleitung von Prof. Dr. Armin Kurtz und unter der Betreuung von Dr. Katharina Machura am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Anatomische Grundlagen der Mausniere	5
1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	8
1.3 Reninsynthese in der juxtaglomerulären Zelle	10
1.4 Regulation der Reninsynthese und –sekretion	12
1.4.1 Faktoren der physiologischen Regulation	12
1.4.2 Faktoren der Regulation auf zellulärer Ebene	13
1.4.3 Interzelluläre Kommunikation mittels Gap Junctions	15
1.5 Die Familie der Aldo-Ketoreduktasen	16
1.6 Die Aldo-Ketoreduktase AKR1B7	17
1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Verbrauchsmaterial	25
2.1.3 Chemikalien	26
2.1.4 Primer	27
2.1.5 Antikörper	28
2.1.6 Puffer und Lösungen	28
2.1.6.1 Immunhistochemie	28
2.1.6.2 Molekularbiologie	29
2.1.7 Software und Internetdienste	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Versuchstiere	30
2.2.2 Histologische Methoden	31
2.2.2.1 Fixierung des Nierengewebes	31
2.2.2.2 Einbettung in Paraffin	32
2.2.2.3 Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung	32
2.2.2.4 Immunhistochemische Färbung	33
2.2.3 Dreidimensionale Rekonstruktion	34
2.2.3.1 Mikroskopie und Digitalisierung	34
2.2.3.2 Datenaufarbeitung mittels ImageJ	34
2.2.3.3 Dreidimensionale Rekonstruktion mit Amira	35

2.2.4 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.4.1 Isolierung von Total-RNA aus Nieren	38
2.2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	40
2.2.4.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR) ...	40
2.2.4.4 Genotypisierung	41
2.2.5 Plasmareninbestimmung	42
2.2.6 Blutdruckmessung	43
2.2.7 Statistische Methoden	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Qualitative Analyse des AKR1B7- und Reninexpressionsmusters	46
3.1.1 Die Wildtyp-Maus	47
3.1.1.1 Die Wildtyp-Maus unter Normalsalzdiät [NS]: dreidimensionale und histologische Betrachtung	47
3.1.1.2 Die Wildtyp-Maus nach 10d Hochsalzdiät [HS]: histologische Betrachtung	52
3.1.1.3 Die Wildtyp-Maus nach 10d Niedrigsalzdiät und 7d Enalapril [LS/E]: histologische Betrachtung	54
3.1.2 Die Aldosteronsynthase-Knockout-Maus: dreidimensionale und histologische Betrachtung	56
3.1.3 Die Connexin40-Knockout-Maus: dreidimensionale und histologische Betrachtung	65
3.1.4 Die AKR1B7-Knockout-Maus	72
3.1.4.1 Die AKR1B7-Knockout-Maus unter Normalsalzdiät [NS]: dreidimensionale und histologische Betrachtung	72
3.1.4.2 Die AKR1B7-Knockout-Maus nach 10d Hochsalzdiät [HS]: histologische Betrachtung	75
3.1.4.3 Die AKR1B7-Knockout-Maus nach 10d Niedrigsalzdiät und 7d Enalapril [LS/E]: histologische Betrachtung	77
3.2 Dreidimensionale Betrachtung der Gefäßarchitektur	79
3.2.1 Die Wildtyp-Maus unter Normalsalzdiät [NS]	79
3.2.2 Die AKR1B7-Knockout-Maus unter Normalsalzdiät [NS]	80
3.3 Quantitative Analyse der Reninexpression	82
3.4 Plasmareninmessung	83
3.5 Blutdruckmessung	84

4 Diskussion	85
4.1 Die Kolokalisation von Renin und AKR1B7	86
4.2 Die Folgen von AKR1B7-Defizienz	89
4.3 Fazit und Ausblick	92
5 Zusammenfassung	94
6 Literaturverzeichnis	96
7 Anhang	104
7.1 Abbildungsverzeichnis	105
7.2 Abkürzungsverzeichnis	111

1 Einleitung

1.1 Anatomische Grundlagen der Mausniere

Die Niere stellt für Säugetiere ein lebenswichtiges Ausscheidung- und Bilanzierungsorgan dar - durch komplexe Filtrations-, Sekretions- und Resorptionsvorgänge ermöglicht sie nicht nur die Ausscheidung wasserlöslicher Abfallprodukte des Stoffwechsels, sondern auch die feinste Einstellung des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts. Darüber hinaus spielt die Niere eine wichtige Rolle als endokrines Organ und gewährleistet dadurch u.a. die Einstellung des arteriellen Blutdrucks (Klinke et al., 2005; Lüllmann-Rauch, 2006). Zur Verdeutlichung, wie die Niere dieser Funktion gerecht werden kann, soll zunächst ein Überblick über ihre Anatomie und Physiologie gegeben werden.

Die Niere liegt im Retroperitonealraum und ist von einer bindegewebigen Kapsel und einer Fettgewebekapsel umgeben. Der Sinus renalis, eine Einbuchtung im Hilumbereich, ist mit Fettgewebe ausgefüllt, in das Nierenkelche, Nierenbecken und Gefäße eingebettet sind (Lüllmann-Rauch, 2006; Welsch & Deller, 2010). Die menschliche Niere ist in 6-8 gleichartige Einheiten gegliedert, die sich jeweils in Mark und Rinde unterteilen lassen (multipapillärer Bau durch prä- und postnatales Zusammenwachsen mehrerer Nierenanlagen). Mäuse und andere kleine Säuger besitzen dagegen nur eine solche Einheit (unipapillärer Bau) (Lüllmann-Rauch, 2006). Das Mark ist pyramidenförmig und ragt mit seiner Spitze, der Papilla renalis, in einen Kelch des Nierenbeckens. Die Oberfläche der Papillen enthält Öffnungen der Nierenkanälchen, die den Endharn in die Nierenkelche und anschließend ins Nierenbecken leiten. Die Rinde umgibt die Basis der Markpyramiden und besitzt darüber hinaus Ausläufer (Columnae renales), die sich zwischen den Pyramiden bis zum Sinus renalis fortsetzen. Von jeder Pyramidenbasis dringen Markstrahlen ins umgebende Rindengewebe ein. Das restliche, von Markstrahlen freie Rindengewebe wird als Rindenlabyrinth bezeichnet (Junqueira et al., 2002; Lüllmann-Rauch, 2006).

Das Nephron

Die anatomische und funktionelle Grundeinheit der Niere ist das Nephron, von denen es in der menschlichen Niere ca. eine Million, in der Mausniere ca. zwölftausend gibt (Weisert, 1990; Welsch & Deller, 2010). Es setzt sich aus einem Nierenkörperchen und einem Tubulussystem zusammen, das ins Sammelrohrsystem mündet. Jedes Nierenkörperchen wird von einer afferenten Arteriole gespeist, die sich in ein kapilläres Gefäßknäuel (= Glomerulus) aufteilt. Dieser mündet wiederum in eine efferente Arteriole, die das Nierenkörperchen verlässt. Über den Glomerulus stülpt sich becherförmig als blindes Ende des Tubulussystems die Bowman-Kapsel. Die innere Kapselwand umgibt das Kapillarendothel der Glomeruli, während die äußere Kapselwand die äußere Begrenzung des Glomerulus bildet. Dazwischen befindet sich der Kapselraum, in den der

Primärharn filtriert wird (Abb. 1.4) Die sog. Podozyten der inneren Kapselwand bilden zusammen mit dem Kapillarendothel und der dazwischenliegenden Basallamina eine dreischichtige Filtrationsbarriere. Die fingerförmigen Ausläufer der Podozyten umgeben die Kapillaren so dicht, dass nur schlitzförmige Zwischenräume entstehen. Durch zusätzliches Hineinragen von Glykoproteinen der Basallamina wird ein Ultrafilter gebildet, der für Proteine > 70 kDa komplett undurchlässig ist (Lüllmann-Rauch, 2006). Die Kapillaren des Glomerulus sind von glattmuskelähnlichen Mesangialzellen umgeben, die die Blutzufuhr zu bestimmten Kapillaren durch Kontraktion beschränken können. Das ermöglicht eine gewisse Regulierung des Blutdruck im Glomerulus und damit auch eine Steuerung der Filtration (Moyes & Schulte, 2008). An das Nierenkörperchen schließt sich das Tubulussystem an, das in einen Tubulus proximalis, intermedius und distalis unterteilt wird. Der Tubulus proximalis besteht aus einem gewundenen (Pars contorta) und einem geraden (Pars recta) Anteil. Als nächster Abschnitt folgt der Tubulus intermedius, der je nach Lage des Nephrons entweder nur einen aufsteigenden oder aber einen aufsteigenden und einen absteigenden Schenkel besitzt. Der aufsteigende Schenkel mündet im Tubulus distalis, der sich wiederum in eine Pars recta und eine Pars contorta unterteilen lässt. Über ein Verbindungsstück findet der distale Tubulus Anschluss an das Sammelrohrsystem. Die Sammelrohre durchqueren das gesamte Nierenparenchym und münden an den Papillen ins Nierenbecken. Die gewundenen Anteile von Tubulus proximalis und distalis befinden sich wie die Nierenkörperchen im Rindenlabyrinth. Dort findet der überwiegende Teil der Resorptions- und Sekretionsvorgänge statt, die zur Sekundärharnbildung führen. Die geraden Anteile des Tubulussystems, auch als Henle-Schleife bezeichnet, verlaufen gemeinsam mit den Sammelrohren gestreckt und parallel zueinander in den Markpyramiden und ermöglichen zusammen mit den dazugehörigen Gefäßen durch Wasserresorption die Harnkonzentrierung nach dem Gegenstromprinzip (Lüllmann-Rauch, 2006).

Je nach Lage innerhalb der Nierenrinde unterscheidet man juxtamedulläre und oberflächliche Nephrone, deren Tubulussysteme unterschiedlich weit in das Mark hineinreichen. Die unterschiedliche Lage und Strukturierung der Nephrone, die unterschiedliche Länge der Henle-Schleifen und die Anordnung der Sammelrohre sind das Korrelat für die makroskopische Erscheinung der Markstrahlen und die Unterteilung des Nierenmarks in eine Innen- und Außenzone (Welsch & Deller, 2010). (s. Abb. 1.1)

Die Gefäßarchitektur der Niere

Die Gefäßarchitektur der Niere ist einzigartig und essenziell für die Nierenfunktion. Eine Besonderheit stellt dabei die starke Durchblutung der Nierenrinde dar, die der Filtratbildung und somit den Regulations- und Ausscheidungsaufgaben der Niere dient. Während beide Nieren zusammen beim Menschen nur ca. 1 % des Körpergewichts ausmachen, durchströmt sie etwa

15-25 % des Herzzeitvolumens (Klinke et al., 2005). Eine weitere Besonderheit besteht darin, dass das Blut zwei Kapillarbetten nacheinander durchlaufen muss. Das Kapillargebiet der Glomeruli ist ein arterielles Portalsystem: Jeder Gefäßknäuel ist zwischen zwei Arteriolen eingeschaltet und weist einen für Kapillaren ungewöhnlich hohen Druck auf (55 mmHg im Vergleich zu 25 mmHg in den üblichen Kapillaren) (Lüllmann-Rauch, 2006). Dadurch wird eine effektive Filtration ermöglicht.

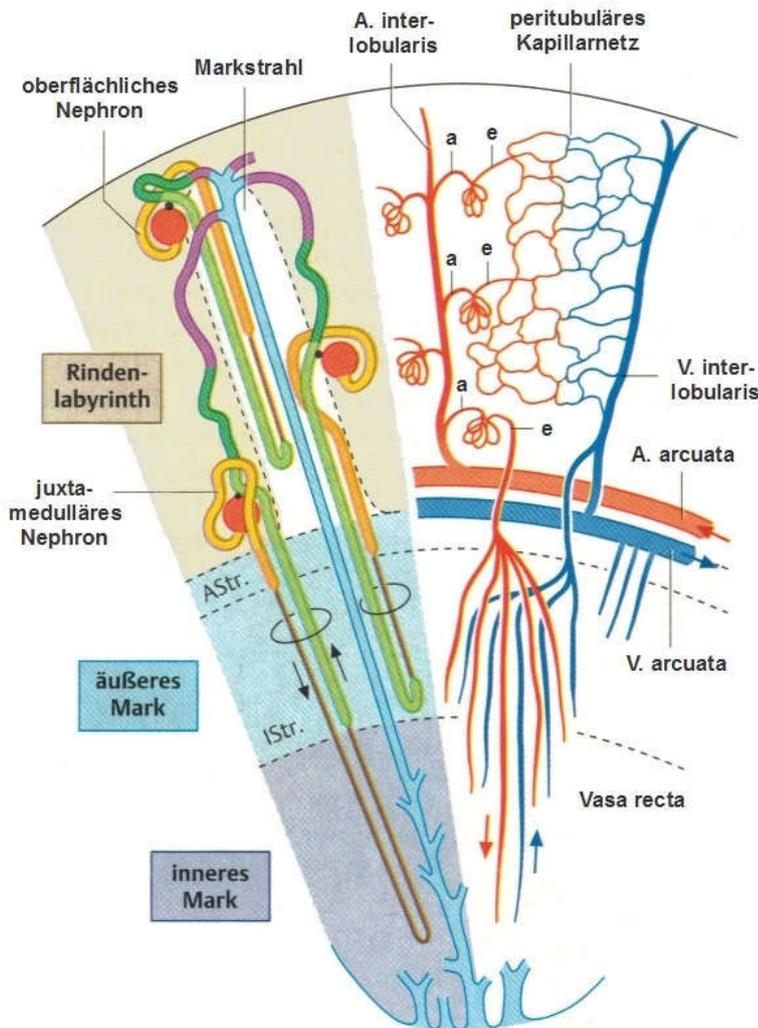


Abb. 1.1: Feinstruktur der Niere.

Links: Lage der Tubulussegmente in Abhängigkeit von der Position des Nephrons. Tubulussegmente: Pars contorta (gelb) und Pars recta (orange) des Tubulus proximalis, Tubulus intermedius (braun), Pars recta (hellgrün) und Pars contorta (dunkelgrün) des Tubulus distalis, Verbindungsstück (lila), Sammelrohrsystem (hellblau). Astr. = Außenstreifen, Istr. = Innenstreifen.

Rechts: Gefäßarchitektur. a = Vas afferens. e = Vas efferens.

(Abbildung modifiziert nach Lüllmann-Rauch, 2006)

Die Arteria renalis tritt im Bereich des Nierensinus in das Nierenparenchym ein und teilt sich in mehrere Aa. interlobares auf, die in die Columnae renales eintreten und in den Aa. arcuatae münden. Diese bilden ein verzweigtes arterielles Netz, das sich an der Grenze zwischen Rinde und Mark erstreckt und die Aa. interlobulares abgibt. Aus diesen entspringen in unregelmäßigen Abständen die afferenten Arteriolen, die die Glomeruli speisen. Das glomeruläre Kapillarnetz mündet in die efferenten Arteriolen, die zur Sicherstellung eines ausreichenden glomerulären Perfusionsdrucks einen kleineren Durchmesser als die afferenten Arteriolen besitzen. Die efferenten Arteriolen, die aus oberflächlichen Glomeruli entspringen, verzweigen sich anschließend zu den peritubulären Kapillaren und versorgen die Tubuli der Nierenrinde. Die aus juxtaglomerulären

Glomeruli stammenden efferenten Arteriolen geben dagegen die Aa. rectae ab, die zusammen mit den Henle-Schleifen ins Nierenmark absteigen, um danach als Vv. rectae wieder in die Nierenrinde aufzusteigen. Diese Vasa recta sind am Gegenstromprinzip der Harnkonzentrierung in der Henle-Schleife beteiligt. Das aus den Vasa recta und den peritubulären Kapillaren stammende venöse Blut gelangt anschließend über die Vv. arcuatae und die V. interlobares in die V. renalis (Anderhuber & Weiglein, 1992; Welsch & Deller, 2010).

1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die Aufgabe des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) besteht in der Regulierung des Blutdrucks und der Aufrechterhaltung des Wasser- und Salzhaushaltes im Körper (Davis & Freeman, 1976; Wagner & Kurtz, 1998). Beim Unterschreiten einer kritischen Blutdruckschwelle im Vas afferens, bei zu niedriger Natriumchlorid-Konzentration am distalen Tubulus oder nach Aktivierung durch das sympathische Nervensystem setzen die juxtaglomerulären Zellen Renin frei und setzen dadurch die RAAS-Kaskade in Gang (Junqueira et al., 2002).

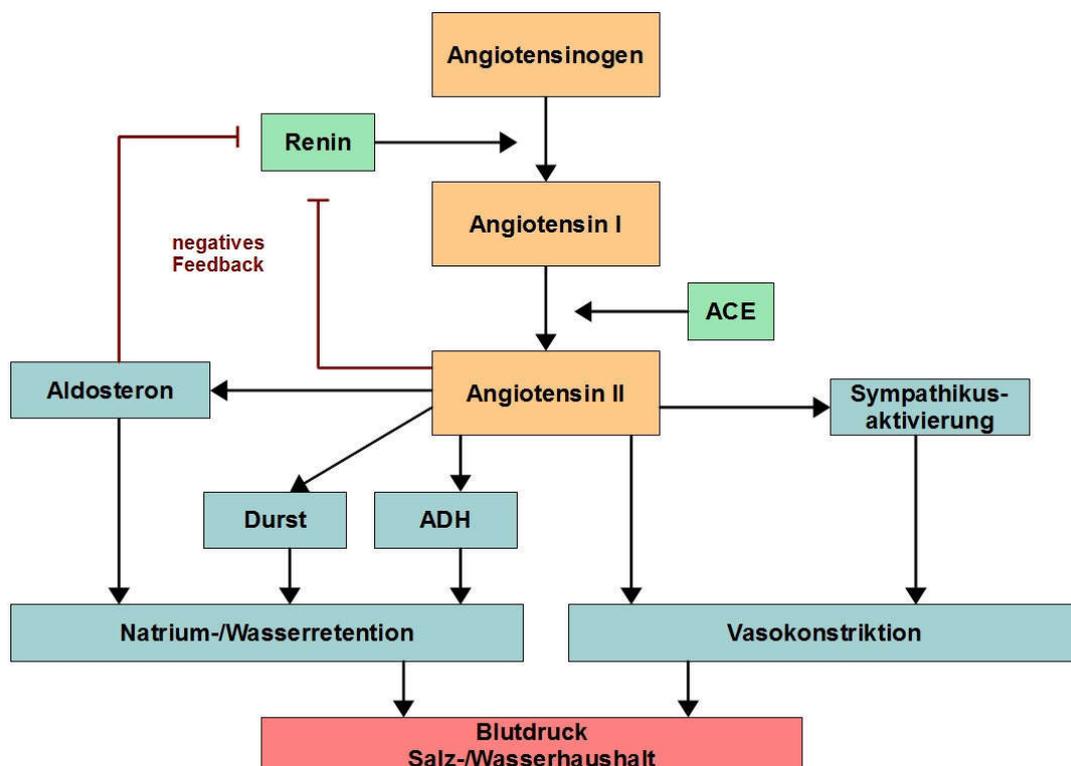


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Signalkaskade des RAAS. ACE = Angiotensin-converting Enzyme. ADH = Antidiuretisches Hormon.

Das RAAS besteht aus der Aspartylprotease Renin, dem Glykoprotein Angiotensin und dem Steroidhormon Aldosteron. Renin spaltet von Angiotensinogen, welches in der Leber gebildet und ins Blutplasma sezerniert wird, das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) ab. Dieses wird anschließend durch das an der Oberfläche der Endothelzellen der Lunge befindliche Angiotensin Converting Enzym (ACE) zum Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) umgewandelt. ANG II ist der eigentliche physiologische Effektor des RAAS (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008) und erreicht seine Wirkung über ANGI-Rezeptoren (AT₁- und AT₂-Rezeptoren), die sich auf Zellen des kardiovaskulären, des endokrinen und des Endothelsystems befinden (Ardaillou, 1999; Grobecker, 1999; Levens et al., 1981; Unger et al., 1996). Über den wesentlich stärker exprimierten AT₁-Rezeptor (de Gasparo et al., 2000) nimmt ANGI über unterschiedliche Wege Einfluss auf den Blutdruck und den Wasser-Salz-Haushalt mit dem Ziel eines stabilen Kreislaufs und einer ausreichenden glomerulären Filtration. ANGI wirkt stark vasokonstriktorisch durch Erhöhung des Gefäßwiderstands, indem es zum einen an ANGI-Rezeptoren der Gefäßwand bindet und zum anderen im Hypothalamus das Kreislauf-Zentrum aktiviert. Darüber hinaus löst es im Hypothalamus eine vermehrte ADH-Sekretion aus und fördert das Durstgefühl und den Appetit auf Salziges (Silbernagl & Despopoulos, 2007). In der Nebennierenrinde stimuliert ANGI in der Zona glomerulosa die Bildung und Freisetzung des Mineralkortikoids Aldosteron, welches in der Niere über eine vermehrte Einsparung von Natriumionen im Tausch gegen Kaliumionen die Salz- und Wasserresorption fördert. Eine weitere Wirkung wird über die vermehrte Freisetzung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark erzielt, das über eine Vasokonstriktion ebenfalls eine Erhöhung des Gefäßwiderstands und des Blutdruck bewirkt. Sowohl ANGI als auch Aldosteron hemmen die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen im Sinne eines negativen Feedbacks.

Die Funktionen des wesentlich schwächer exprimierten AT₂-Rezeptors unterscheiden sich maßgeblich von denen des AT₁-Rezeptors. Obwohl über den Rezeptor bisher relativ wenig bekannt ist, konnten Studien aus den letzten Jahren eine antiproliferative Wirkung auf Endothelzellen, einen gewebeprotectiven Effekt auf neuronales Gewebe, Herz, Niere und weitere Organe sowie eine antiinflammatorische Wirkung beschreiben (Steckelings, 2011).

Da Angiotensinogen und ACE unter physiologischen Bedingungen im Überfluss vorhanden sind, stellt die Reninkonzentration im Blut den limitierenden Faktor der RAAS-Kaskade dar (Kurtz, 1989; Mercure et al., 1998; Peters & Clausmeyer, 2002).

Außerhalb der Niere konnten in verschiedenen Organen lokale Renin-Angiotensin-Systeme gefunden werden, u.a. in Augen, Herz, Gehirn und Reproduktionsorganen (Paul et al., 2006). Bis auf die postulierte regulierende Funktion der Myozytenkontraktilität (Delbridge et al., 1995) ist über diese lokalen Systeme noch wenig bekannt.

1.3 Reninsynthese in der juxtaglomerulären Zelle

Das Reningen wurde bereits für unterschiedliche Spezies analysiert und beschrieben. Bei Maus und Ratte besteht es aus neun Exons und acht Introns, beim Menschen liegt ein weiteres Exon vor, das drei zusätzliche Aminosäuren kodiert (Castrop et al., 2010; Dzau et al., 1988).

Auffallend ist die Existenz von zwei reninkodierenden Genen bei einem Teil der Mäusepopulation: Bei manchen Mäusen sind zwei Reningene, Ren-1D und Ren-2, zu finden, während andere Mäuse nur das Ren-1C-Gen besitzen. Die enge Verwandtschaft von Ren-1 und Ren-2 könnte dadurch erklärbar sein, dass Ren-2 vor ca. drei Millionen Jahren durch Genduplikation aus Ren-1 entstanden ist (Dickinson et al., 1984; Holm et al., 1984).

Die Reninsynthese beginnt mit der Bildung von Präprorenin (Barajas, 1979; Taugner et al., 1984), das ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert und dort durch die Abspaltung der Präsequenz zum Vorläuferprotein Prorenin umgewandelt wird (Morris, 1992).

Dieses gelangt anschließend zur weiteren Modifizierung in den Golgi-Apparat und wird einem von zwei Sekretionswegen zugeführt: Es wird entweder als inaktive Form konstitutiv sezerniert oder für die regulierte Exozytose durch Mannose-6-Phosphatreste glykosyliert (Faust et al., 1987) und unter Beteiligung von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren in lysosomale Kompartimente befördert (Chao et al., 1990). Dort erfolgt die Verpackung von Prorenin in Speichergranula, in denen durch Abspaltung der Prosequenz das aktive Renin entsteht. Die anschließende Freisetzung von Renin geschieht durch regulierte Exozytose und findet dabei schubweise, nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip, statt (Peti-Peterdi et al., 2004).

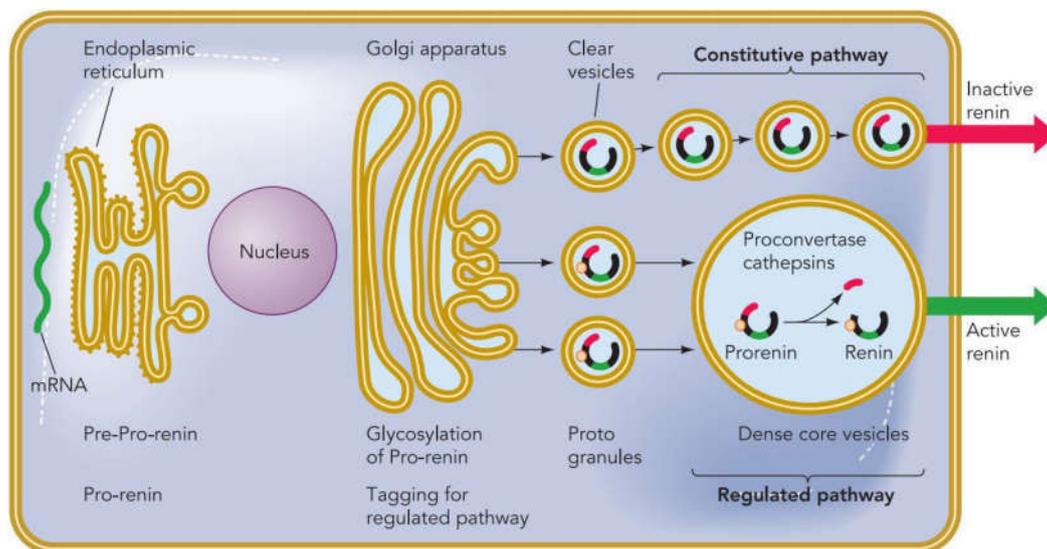


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Reninsynthese und -sekretion (Abbildung nach Schweda et al., 2007)

Die Reninsynthese in der Niere findet in speziellen Zellen statt, die in der Tunica media der afferenten Arteriolen in unmittelbarer Nähe zum Gefäßpol der Glomeruli liegen. Deren Lage führte zur Bezeichnung als „juxtaglomeruläre Zellen“ (JG-Zellen) (Bader & Ganten, 2000). Bei den Zellen handelt es sich um modifizierte glatte Muskelzellen, die aufgrund der zahlreichen Reninspeichergranula eine epitheloide Form besitzen. Zusammen mit der Macula densa des distalen Tubulus, dem extraglomerulären Mesangium und den endothelialen Glattmuskelzellen bilden sie den juxtaglomerulären Apparat (Barajas, 1979; Taugner et al., 1984). In geringerem Ausmaß sind granuliert JG-Zellen auch in der Wand der efferenten Arteriolen oder entlang der Mesangialzellen lokalisiert (Keeton and Campbell, 1980).

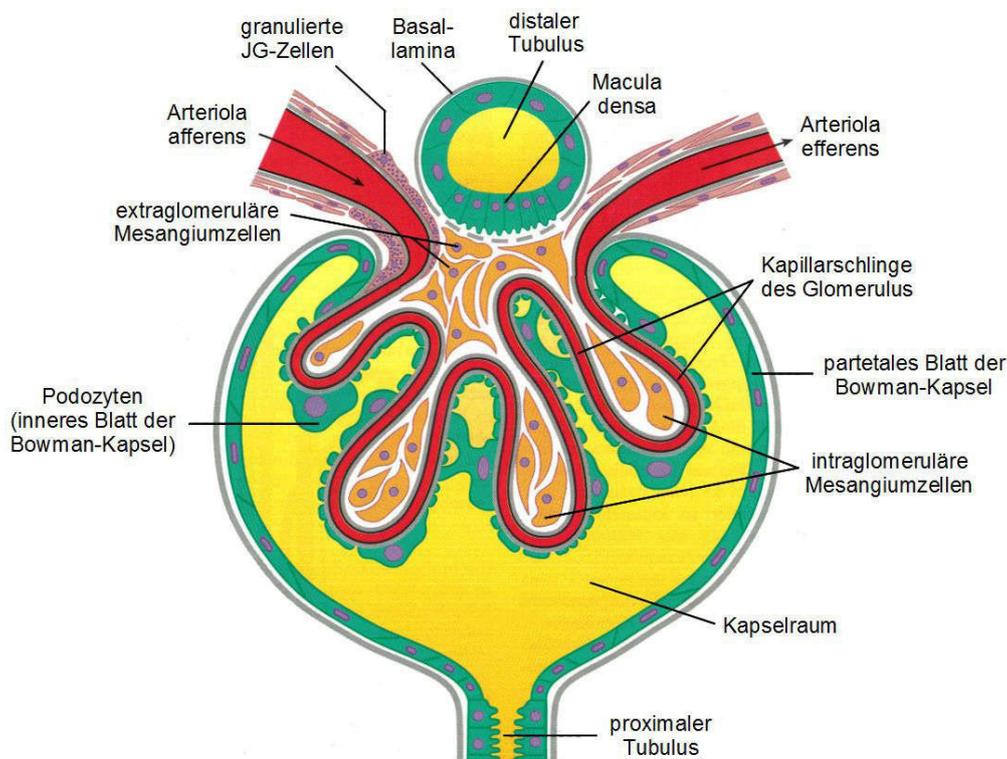


Abb. 1.4: Schematische Darstellung eines Glomerulus. Der juxtaglomeruläre Apparat besteht aus den granulierten JG-Zellen, der Macula densa, der afferenten und efferenten Arteriolen und dem extraglomerulären Mesangium (Abbildung modifiziert nach Welsch & Deller, 2010).

Die beschriebene Lokalisation der reninbildenden Zellen ist die Endlokalisierung in der ontogenetischen Entwicklung der Niere, während der die Reninsynthese entlang des gesamten präglomerulären Gefäßbaums stattfindet. Nach Beginn in den größeren intrarenalen Arterien schreitet der Expressionort kontinuierlich in Richtung kleinerer Gefäße fort, bis die endgültige juxtaglomeruläre Lage erreicht ist (Minuth et al., 1981; Sauter et al., 2008). Obwohl diese in adulten Individuen unter physiologischen Bedingungen konstant bleibt, kann sich die Anzahl der reninbildenden Zellen unter pathologischen Umständen ändern. In chronischen

Salzmangelsituationen wird das RAAS dauerhaft aktiviert und es findet eine sogenannte retrograde Rekrutierung der reninbildenden Zellen statt: die Reninsynthese findet dann ähnlich wie in früheren Entwicklungsstadien auch in den vorgeschalteten präglomerulären Gefäßen statt. Diese Rekrutierung erfolgt nach einem diskontinuierlichen, bisher noch nicht vollständig verstandenem Muster (Casellas et al., 1994; Fuchs et al., 2002; Reddi et al., 1998). Gegenätzlich führt eine chronische Unterdrückung des RAAS, wie sie beispielsweise bei Diabetes mellitus vorkommt, zur Umbildung von reninbildenden Zellen zu Glattmuskelzellen (Kurtz, 1989).

1.4 Regulation der Reninsynthese und –sekretion

1.4.1 Faktoren der physiologischen Regulation

Die Salzaufnahme des Körpers stellt einen zentralen physiologischen Regulator der Reninsynthese und -sekretion dar. Von besonderer Bedeutung ist dabei der enge Kontakt zwischen den reninbildenden JG-Zellen und der Macula densa des distalen Tubulus, die aus spezialisierten Endothelzellen besteht. Diese fungieren als sensorisches Element, indem sie die Natriumchlorid-Konzentration im distalen Tubulus messen (Schnermann, 1998; Vander, 1967). Niedrige NaCl-Konzentrationen stimulieren das RAAS, hohe Konzentration hemmen es dagegen. Der genaue Einflussmechanismus der Macula densa auf die Reninbildung ist noch nicht ausreichend erforscht, postuliert wird jedoch ein Zusammenspiel verschiedener lokaler Mediatoren. Die Macula densa beeinflusst darüber hinaus durch tubuloglomeruläres Feedback den Gefäßwiderstand in den afferenten und efferenten Arteriolen, was der kapazitätsbedingten Natriurese entgegenwirkt und zur Natriumhomöostase im Körper beiträgt (Castrop et al., 2004).

Als weiterer Faktor beeinflusst der Blutdruck die Reninfreisetzung. Ein systemischer Blutdruckabfall führt zum Absinken des renalen Perfusionsdrucks und zur Stimulierung der Reninsynthese und -sekretion. Durch die Aktivierung des RAAS und die Bildung von ANGII nimmt der Gefäßwiderstand zu und der Blutdruck steigt. Gegenätzlich haben hohe Blutdruckwerte durch ein negatives Feedback eine Minderung der Reninsekretion zur Folge (Skinner et al., 1964). Die Vermittlung dieses Feedbacks erfolgt über einen wahrscheinlich in der Niere lokalisierten Barorezeptor (Scholz et al., 1994). Auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht gänzlich verstanden ist, wird vermutet, dass es bei Druckanstieg in der afferenten Arteriole zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in den Gefäßmuskelzellen des JGA kommt, was wiederum über eine kontraktionsbedingte Änderung der Wandspannung eine Minderung der Reninsekretion bewirkt (Bader & Ganten 2000; Carey et al., 1997).

Auch das sympathische Nervensystem ist maßgeblich an der Regulation der Reninsekretion beteiligt. In der Niere werden neben afferenten und efferenten Arterien auch der proximale und distale Tubulus, die Henle-Schleife und die JG-Zellen sympathisch innerviert (Barajas et al., 1992; DiBona, 2000). Während vaskuläre Effekte über α_1 - und β_2 -Rezeptoren erreicht werden, besitzen die reninbildenden Zellen β_1 -Rezeptoren (Boivin et al., 2001; Hackenthal et al., 1990). Diese werden durch die systemisch zirkulierenden oder lokal sezernierten Katecholamine stimuliert und aktivieren ihrerseits die Adenylatzyklase. Die daraus resultierende cAMP-Erhöhung steigert die Reninsekretion (Holmer et al., 1997; Kurtz, 1997). Interessant ist die Beobachtung, dass nur reninhaltige Zellen des JGA sympathisch angeregt werden können, nicht jedoch rekrutierte, räumlich vom JGA getrennte reninpositive Zellen (Wagner et al., 1999).

Die Wirkungen von ANGII und Aldosteron als weitere Regulatoren der Reninsekretion wurden bereits in Kapitel 1.2 beschrieben. Darüber hinaus sind lokale Faktoren bekannt, die in unmittelbarer Nähe der JG-Zellen synthetisiert werden und neben den oben genannten klassischen Regulationsfaktoren ebenfalls einen signifikanten Effekt auf die Reninsynthese und -sekretion haben. Während endotheliale Autacoide wie Prostaglandin E₂, Prostazyklin oder Stickstoffmonoxid (NO) die Synthese antreiben, üben beispielsweise Endotheline einen hemmenden Einfluss aus (Wagner et al., 1998).

1.4.2 Faktoren der Regulation auf zellulärer Ebene

Als zentraler intrazellulärer Stimulator für die Reninfreisetzung konnte der cAMP-Signalweg identifiziert werden (Klar et al., 2002; Pan et al., 2001). Seine Aktivierung erfolgt unter anderem durch Katecholamine, die Prostaglandine E₂ und I₂ (=Prostazyklin) und CGRP (Calcitonin-gene-related peptide), die an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden (Kurtz, 1989). Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor dissoziiert vom stimulierenden G-Protein G_s die Untereinheit G_s- α , welche die Adenylatzyklase aktiviert. Diese wandelt ihrerseits ATP zu cAMP um und der daraus resultierende cAMP-Anstieg führt schließlich zur Steigerung der Renintranskription und -translation. Dieser Effekt kommt durch die cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A zustande - ein Phänomen, das für viele andere Zellen des Körpers bekannt und bereits gut untersucht ist (Lalli et al., 1994). Die Proteinkinase A phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element-binding protein), der an das cAMP response element, eine Promotorregion des Reningens, binden kann und schließlich durch Transaktivierung die Renintranskription steigert (Klar et al., 2002; Pan et al., 2001). Darüber hinaus verhindert cAMP die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und reduziert die Calciumpermeabilität der Zellmembran, was einen positiven Effekt auf die Reninsekretion hat (DellaBruna et al., 1993).

Eine andere Theorie geht von einer Proteinkinase A-gesteuerten Aktivierung von Protonenpumpen in der Membran von Reninspeichervesikeln aus, die dadurch zur Entleerung gebracht werden (King & Fray, 1994). Die zentrale Rolle des cAMP-Wegs bezüglich Reninsynthese und -freisetzung konnte durch Untersuchungen mit G_s - α -Knockout-Mäusen bestätigt werden (Chen et al., 2007; Neubauer et al., 2009). Limitierend wirken auf den cAMP-Weg Phosphodiesterasen, die cAMP zu AMP abbauen (Chiu & Reid, 1996; Chiu et al., 1999).

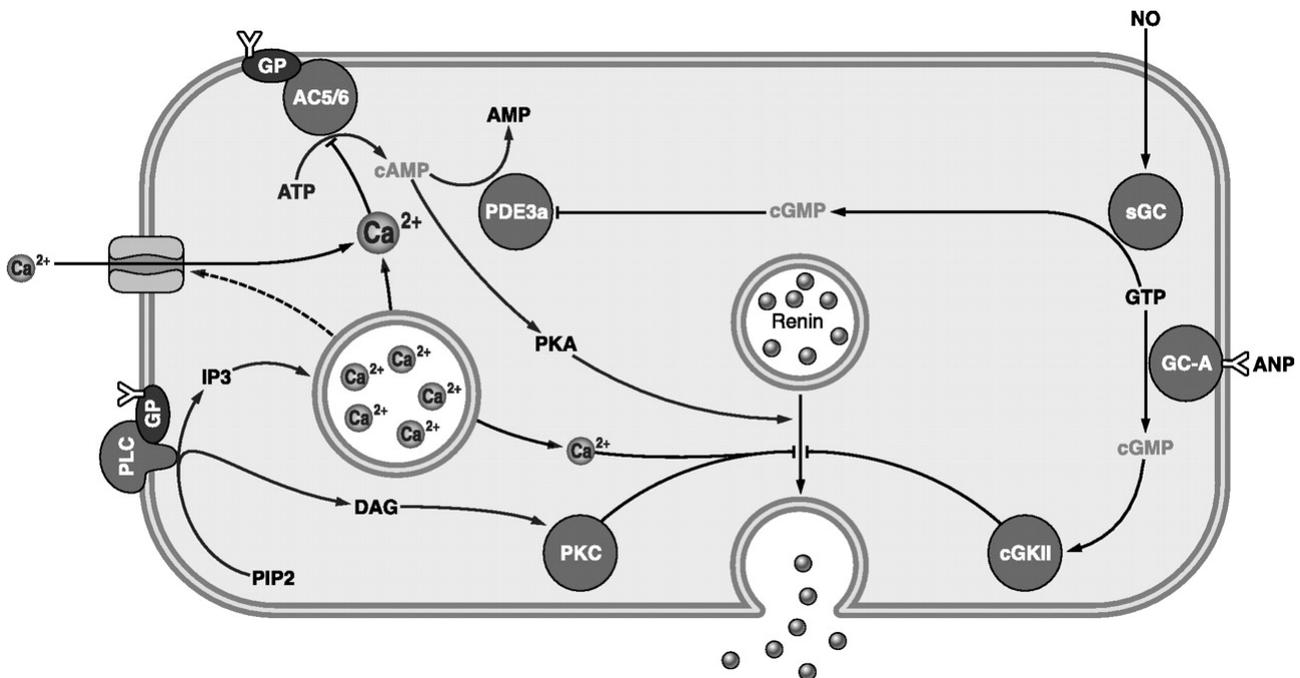


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege, die die Reninfreisetzung beeinflussen. AC5/6 = Adenylatzyklase 5/6. AMP = Adenosinmonophosphat. ANP = Atriales Natriuretisches Peptid. ATP = Adenosintriphosphat. Ca^{2+} = Calcium. cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat. cGKII = cGMP-dependent protein kinase type II. cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat. DAG = Diacylglycerol. GC-A = Guanylatzyklase A. GP = Glykoprotein. IP3 = Inositoltriphosphat. NO = Stickstoffmonoxid. sGC = lösliche (soluble) Guanylatzyklase. GTP = Guanosintriphosphat. PDE3a = Phosphodiesterase 3a. PIP2 = Phosphatidyl-Inositolbisphosphat. PKA = Proteinkinase A. PKC = Proteinkinase C. PLC = Phospholipid C. (Abbildung nach Castrop et al., 2009)

Im Gegensatz zum cAMP-Signalweg fungiert die intrazelluläre Calcium-Konzentration in den JG-Zellen als Inhibitor des Reninexpression und -freisetzung (Fuchs et al., 2003). In dieser Hinsicht unterscheiden sich die reninbildenden Zellen von allen anderen sekretorischen Zellen im Körper, in denen eine intrazelluläre Calciumerhöhung in der Regel die Exozytose initiiert (Cohen et al., 1997), was als "Calcium-Paradoxon" bezeichnet wird (Persson, 2003; Schweda and Kurtz, 2004). Ein möglicher und derzeit diskutierter Erklärungsansatz liegt in der Fähigkeit von Calcium, die Adenylatzyklasen AC5 und AC6 zu hemmen (Grünberger et al., 2006; Ortiz-Capisano et al., 2007; Schweda et al., 2007). Beide Enzyme wurden in den JG-Zellen auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Grünberger et al., 2006; Ortiz-Capisano et al., 2007). Außerdem konnte in primären JG-

Zellkulturen gezeigt werden, dass der intrazelluläre Calcium-Anstieg nach Gabe von ANGII oder Endothelin eine Senkung des cAMP-Levels und der Reninsekretion zur Folge hat. Es wird vermutet, dass diese Querverbindung zwischen Calcium und dem cAMP-Signalweg zur Erklärung des Calcium-Paradoxons beitragen könnte, es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen zur Funktion von AC5 und AC6 in vivo (Castrop et al., 2010).

Die dritte Signalkaskade, der cGMP-Weg, kann auf das RAAS sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken. Die Mediatoren Stickstoffmonoxid (NO) und ANP können zytosolische oder membrangebundene Guanylatzyklasen aktivieren, die GTP zu cGMP umwandeln. Einerseits hemmt cGMP die Phosphodiesterase-3 (PDE-3), verhindert damit den cAMP-Abbau und übt dadurch einen stimulierende Einfluss auf das RAAS aus (Friis et al., 2002; Reid & Chiu, 1995). Andererseits aktiviert cGMP die Proteinkinase II. Diese ist mit Reninspeichergranula assoziiert und hemmt die Reninfreisetzung (Gambaryan et al., 1996; Wagner et al., 1998). Welcher der beiden Wege eingeschlagen wird, könnte von der cGMP-Konzentration abhängen: Während bei niedriger Konzentration der hemmende Einfluss zu überwiegen scheint, rückt bei hohen Konzentrationen der aktivierende Effekt in den Vordergrund (Kurtz & Wagner, 1998).

Abgesehen von diesen drei klassischen Signalkaskaden haben in den letzten Jahren vermehrt neue Erkenntnisse über Gap Junctions und micro-mRNA an Aufmerksamkeit gewonnen, die vielversprechend bezüglich eines umfassenderen Verständnisses der komplexen Regulation des Reninsystems scheinen (Sequeira López & Gomez, 2010).

1.4.3 Interzelluläre Kommunikation mittels Gap Junctions

Gap Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die benachbarte Zellen miteinander elektrisch und metabolisch koppeln. Die Zellen des gesamten JGA mit Ausnahme der Macula densa sind durch derartige Kontakte miteinander verbunden und stellen somit ein funktionelles Synzytium dar (Hees & Sinowatz, 2000). Die Baueinheit der Gap Junctions sind die integralen Membranproteine Connexine, von denen bei der Maus bisher 20 und beim Menschen 21 Subtypen bekannt sind. Die Bezeichnung erfolgt dabei entsprechend des Molekulargewichts, z.B. kennzeichnet Cx40 ein Connexin mit der Masse 40kDa (Söhl & Willecke, 2004). Sechs gleiche oder unterschiedliche Connexine sind röhrenförmig zu einem Halbkanal (Connexon) zusammengelagert, der mit dem Connexon der benachbarten Zelle den kompletten Kanal (Gap Junction) bildet (Karp, 2005). Dieser ermöglicht einen direkten Durchgang von anorganischen Ionen (Na^{2+} , Ca^{2+}) und kleinen wasserlöslichen Molekülen (z.B. cAMP) und besitzt je nach Zusammensetzung der Connexine eine unterschiedlich ausgeprägte Leitfähigkeit, die darüber hinaus durch komplexe Mechanismen reguliert wird (Hanner et al., 2010; Wölfle et al., 2007). In der Niere dominiert die Expression von

Cx40, dessen Rolle für das RAAS in mehreren Studien untersucht wurde. Studien mit Cx40-defizienten Mäusen zeigen, dass in diesen Tieren die Positionierung und Rekrutierung von reninbildenden Zellen gestört ist. Während die Lokalisation reninbildender Zellen in der fetalen Niere unauffällig ist, findet die Reninbildung im adulten Organismus nicht nur an der typischen juxtaglomerulären Position, sondern auch im juxta- und periglomerulären Interstitium statt. Darüber hinaus erfolgt nach Stimulation des RAAS keine retrograde Rekrutierung reninbildender Zellen entlang afferenter Arteriolen (Kurtz et al., 2007).

1.5 Die Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen

Die Aldo-Keto-Reduktasen sind eine große Superfamilie von NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen, die die Reduktion von aromatischen und aliphatischen Aldehyden und Ketonen in die korrespondierenden Alkohole katalysieren. Als Substrat dienen sowohl endogene Stoffe wie Monosaccharide, Lipide, Prostaglandine und Steroidhormone als auch Xenobiotika. Entsprechend dieses Substratspektrums erfüllen Aldo-Keto-Reduktasen unterschiedliche Aufgaben in Stoffwechsel, Biosynthese und Detoxifikation.

Als erster beschrieb der belgische Physiologe und Biochemiker Henry-Géri Hers die Entdeckung des Enzyms Aldose-Reduktase (Hers, 1956). Im Verlauf der folgenden Jahrzehnte wurden Studien über eine Vielzahl anderer Enzyme veröffentlicht, die in Bezug auf Aminosäuresequenz, Substratspezifität und genomische Organisation große Ähnlichkeiten untereinander und mit der Aldose-Reduktase aufweisen. Heute wird die Gesamtheit dieser Enzyme zur großen Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) zusammengefasst. Aufgrund von überlappenden Substrat- und Coenzympezifitäten, die zu Verwechslungen zwischen diesen Enzymen führen könnten, wurde ein einheitliches Nomenklatorsystem für die AKR-Superfamilie eingeführt. Das System basiert auf strukturellen und genetischen Eigenschaften der Proteine und ist unter www.med.upenn.edu/akr einsehbar (Hyndman et al., 2002). Die Einteilung erfolgt anhand der Aminosäuresequenz, wobei innerhalb einer Subfamilie mehr als 60 % Übereinstimmung besteht und Mitglieder einer Familie weniger als 40 % Übereinstimmung mit anderen Familien aufweisen. Zur Bezeichnung der Mitglieder werden an die allgemeine Bezeichnung AKR drei weitere Zeichen angehängt - eine Zahl für die Familie, ein Buchstabe für die Subfamilie und eine weitere Zahl für das konkrete Enzym. So ist beispielsweise AKR1B1, die menschliche Aldose-Reduktase, ein Enzym aus der Familie 1 und Subfamilie B der Aldo-Keto-Reduktasen. Aktuell umfasst die Enzymfamilie über 150 Mitglieder in 15 Familien und 50 Subfamilien.

Die Enzymfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen besitzt ein ubiquitäres Verbreitungsmuster: Einige ihrer Mitglieder werden nicht nur Vertebraten, sondern auch in Pflanzen, Protozoen, Pilzen, Eubakterien und Archebakterien exprimiert (Jez et al., 1997). Deswegen liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich um eine Genfamilie handelt, die bereits sehr früh in der Evolutionsgeschichte aufgekommen ist (Seery et al., 1998).

Die Aldo-Ketoreduktasen der Säugetiere sind in drei Familien vertreten: AKR1, AKR6, AKR7. Am intensivsten untersucht sind bisher die Eigenschaften und Funktionen der am längsten bekannten Aldo-Keto-Reduktase AKR1B1, der menschlichen Aldose-Reduktase. Es ist das erste Enzym des Polyol-Reaktionswegs und reduziert neben anderen Zuckerverbindungen vor allem Glukose zu Sorbitol. Dieses wird mit einer Reihe von Komplikationen bei Diabetes mellitus, wie Nephropathie, Neuropathie und Katarakt in Verbindung gebracht (Kinoshita & Nishimura 1988; Oates & Mylari, 1999). Mehrere Aldose-Reduktase-Inhibitoren als möglicher Ansatz zur Therapie von diabetischen Komplikationen sind in den letzten Jahren Gegenstand diverser Studien gewesen, mit Epalrestat steht sogar bereits ein erster Vertreter der Gruppe kommerziell zur Verfügung (Grewal et al., 2015). Darüber hinaus wird der Aldose-Reduktase eine wichtige Rolle bei der Osmoregulation und der Homöostase divalenter Kationen zugeschrieben (Aida et al., 2000).

Weitere Vertreter der AKR-Superfamilie spielen u.a. eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Steroidhormone, der Biosynthese von Neurosteroiden und Gallensäuren, im Stoffwechsel der konjugierten Steroide und der synthetischen therapeutischen Steroide sowie als Strukturproteine in Kaliumkanälen (Rižner & Penning, 2014).

1.6 Die Aldo-Keto-Reduktase AKR1B7

AKR1B7 wurde erstmalig von Taragnat et al. (1986) beschrieben. Aufgrund des gehäuftten Vorkommens im Vas deferens der Maus erhielt das Glykoprotein zunächst die Bezeichnung „Mouse Vas Deferens Protein.“ (MVDP). Später wurde das Protein auch in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde und in weiteren Organen – u.a. Darm, Auge, Genitalorgane – lokalisiert (Aigueperse et al., 1999; Brockstedt et al., 2000; Lau et al., 1995). Während das Protein im Vas deferens androgenabhängig und mausspezifisch exprimiert wird (Martinez et al., 2001; Taragnat et al., 1988), ist das Vorkommen in der Nebennierenrinde ACTH-abhängig und wird auch bei anderen Nagern beobachtet (Aigueperse et al., 1999; Lau et al., 1995; Lefrançois-Martinez et al., 1999; Martinez et al., 2001).

Funktionell wurde AKR1B7 eine Rolle in der zellulären Detoxifikation zugesprochen: das Enzym besitzt eine hohe Spezifität für Isocaproaldehyd und 4-Hydroxynonenal (4-HNE) (Lefrançois-

Martinez et al., 1999), zwei hochtoxische Substanzen (Dianzani et al., 1999; Pizzimenti et al., 2002). Da Isocaproaldehyd als Nebenprodukt während der Steroidogenese entsteht (Constantopoulos et al., 1966) und das Expressionsmuster von AKR1B7 in der Nebenniere und im Ovar den Bildungsorten von Steroidhormonen wie Glukokortikoiden, Androgenen und Progesterin entspricht, wurde vermutet, dass die Rolle von AKR1B7 in diesen Organen in der Detoxifikation von Isocaproaldehyd besteht. Das hochtoxische 4-HNE entsteht durch Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Comporti, 1998; Yi et al., 1997). Da diese in auffallend hohen Mengen in der Membran von Spermatozoen vorkommen (Aitken, 1994), wurde postuliert, dass die ausgeprägte Expression von AKR1B7 im Vas deferens einen Schutzmechanismus gegen 4-HNE darstellt und somit die Spermiovitalität sichert. Ein Einfluss von AKR1B7-Defizienz auf die Reproduktionsfähigkeit von Mäusen konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden (Baumann et al., 2007).

Darüber hinaus ist AKR1B7 an der Prostaglandinsynthese beteiligt, indem es die Vorstufe Prostaglandin H₂ zu Prostaglandin F₂ umwandelt (Kabututu et al., 2009). Dieses spielt unter anderem eine Rolle bei der Kontraktion der Uterus-, Bronchial- und Gefäßmuskulatur, bei der Regulierung des intraokulären Drucks, der renalen Filtration und des ovariellen Zyklus. Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass AKR1B7 eine prostaglandin-vermittelte antiadipogene Wirkung besitzt (Pastel et al., 2015; Volat et al., 2012).

In der Niere erlangte das Enzym dadurch Aufmerksamkeit, dass Brunskill et al. 2011 ein hohes Expressionslevel von AKR1B7 in den reninbildenden Zellen von Mäusen entdeckten. Auf der Suche nach einem unabhängigen Marker für reninexprimierende Zellen verglichen sie das Genexpressionsprofil von reninbildenden Zellen mit dem Profil anderer Zelltypen in der Niere. Die Untersuchung erfolgte dabei zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten der Niere und unter verschiedenen Bedingungen - sowohl unter physiologischen Normalbedingungen als auch nach Stimulation des RAAS und der damit verbundenen Rekrutierung von reninbildenden Zellen durch eine Natriumsalzdilatation. Auffallend war dabei die Expression von AKR1B7, die in allen Entwicklungsstufen selektiv mit dem Reninexpressionsmuster übereinstimmte - mit dem Beginn in den größeren intrarenalen Arterien bei neugeborenen Mäusen und der endgültigen Lokalisation in den JG-Zellen bei adulten Nieren. Auch unter Behandlung mit dem ACE-Hemmer Captopril folgte AKR1B7 der retrograden Rekrutierung der reninbildenden Zellen. Zur Klärung der Frage nach der Unabhängigkeit von AKR1B7 und Renin untersuchten Brunskill et al. außerdem Ren1c-Knockout-Mäuse. In deren Nieren war die AKR1B7-Expression in denjenigen Zellen festzustellen, die normalerweise Renin exprimieren würden, was dafür spricht, dass Renin keinen Einfluss auf die Expression von AKR1B7 in der Niere besitzt (Brunskill et al., 2011).

1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die Entdeckung von Brunskill et al. führte zu der Frage, welche Rolle AKR1B7 in den reninbildenden Zellen des JGA spielen könnte. Ein Einfluss von Renin auf die Expression von AKR1B7 konnte bereits weitgehend ausgeschlossen werden, der umgekehrte Einfluss von AKR1B7 auf die Reninexpression und -sekretion und den Blutdruck wurde jedoch noch nicht untersucht. Einerseits könnte man im Falle einer gegenseitigen Unabhängigkeit beider Proteine bei strenger Koexpression tatsächlich von der Entdeckung eines neuen, von Renin unabhängigen Markers für reninbildende Zellen sprechen. Die Abwesenheit eines solchen verlässlichen und unabhängigen Markers erschwerte bisher die Forschung an den reninbildenden Zellen, da bei Manipulationen, die die Reninexpression beeinflussen, die Identifizierung dieser Zellen nicht sicher möglich war (Brunskill et al., 2011). Andererseits wurde auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass AKR die Reninexpression und -sekretion beeinflusst. Ein solcher Zusammenhang schien nicht unwahrscheinlich, nachdem eine mögliche Verbindung zwischen den beiden Enzymen unter Vermittlung von Prostaglandinen bestehen könnte: Zum einen wurde in anderen Geweben die Funktion von AKR1B7 als PGF-Synthase gesichert (Kabutu et al., 2009; Lambert-Langlais et al., 2009) und zum anderen wird vermutet, dass Prostaglandine an der Reninsynthese und -sekretion beteiligt sind (Hackenthal et al., 1980; Schwertschlag et al., 1980; Yu et al., 2009). Abgesehen von der Frage nach der Unabhängigkeit beider Proteine waren weitere Untersuchungen zur Koexpression von AKR1B7 und Renin erforderlich. Die Koexpression während der Entwicklung, unter physiologischen Bedingungen und bei Stimulation des RAAS durch ACE-Hemmung wurde zwar bereits 2011 von Brunskill et al. untersucht. Darüber hinaus ist es jedoch relevant, die Expression beider Proteine unter weiteren Bedingungen zu analysieren, die zu einer vermehrten, verminderten oder morphologisch abweichenden Reninexpression führen.

Um der Klärung dieser Fragen näher zu kommen, wurden in dieser Arbeit zwei Schwerpunkte gesetzt: Zum einen wurde die Koexpression von Renin und AKR1B7 nach verschiedenen Manipulationen des RAAS untersucht, zum anderen wurde der Einfluss von AKR1B7 auf das RAAS und die renale Gefäßarchitektur analysiert.

Zur Analyse des Expressionsmusters wurden zum einen Diättiere und zum anderen Versuchstiere mit unterschiedlichen genetischen Defekten verwendet. Bei den Diättieren wurde zwischen drei Gruppen unterschieden: Normalsalz [NS]-, Hochsalz [HS]-, und Niedrigsalz [LS]-diätgruppe. Eine hohe Salzzufuhr hemmt das RAAS und vermindert die Anzahl reninbildender Zellen, während eine zu niedrige Salzzufuhr zu einer Stimulierung des RAAS unter Beteiligung einer retrograden Rekrutierung führt. Die Mäuse aus der Niedrigsalz-Diätgruppe wurden dabei zusätzlich für sieben Tage mit dem ACE-Hemmer Enalapril behandelt, um die Reninbildung noch stärker anzuregen.

Zur Koexpressions-Analyse wurden zudem zwei Knockout-Modelle verwendet: Aldosteronsynthese-(AS)-Knockout und Connexin 40-(Cx40)-Knockout. Bei Aldosteronsynthese-defizienten Tieren kommt es – ähnlich wie bei Nidrigsalzdiät und ACE-Hemmung – zu einer ausgeprägten Zunahme reninbildender Zellen durch retrograde Rekrutierung (Makhanova et al., 2006). Dieser Effekt kommt dadurch zustande, dass erstens das Aldosteron-vermittelte negative Feedback auf die Reninbildung wegfällt und dass zweitens die durch Aldosteronmangel verursachte Minderung der renalen Natrium- und Flüssigkeitsretention indirekt über einen Natriummangel und eine Minderung des Blutdrucks zur Stimulierung des RAAS führt. Ein Connexin40-Knockout führt zu einem anderen Phänomen: Durch die Störung der interzellulären Kommunikation innerhalb des JGA ist die retrograde Rekrutierung von reninbildenden Zellen gestört und reninpositive Zellen sind neben der typischen juxtaglomerulären Position auch in ektoper Lage zu finden (Kurtz et al., 2007).

Von den Nieren der genannten Mäuse wurden histologische Schnitte angefertigt und in diesen Schnitten Glattmuskelaktin (als Marker für die Gefäßwand), Renin und AKR1B7 mit Hilfe immunfluoreszierender Antikörper markiert. Auf diese Weise war eine mikroskopisch-histologische Untersuchung des Koexpressionsmusters für Renin und AKR1B7 innerhalb und außerhalb der Gefäßwand möglich. Von ausgewählten Nieren, für die besonders aussagekräftige Ergebnisse erwartet wurden (AS-Knockout, Cx40-Knockout und als Referenz Wildtyp unter Normalkost) wurden außerdem mit Hilfe von ebenfalls Immunfluoreszenz-markierten histologischen Serienschnitten sowie des Computerprogramms Amira dreidimensionale Rekonstruktionen des jeweiligen Gefäßbaums angefertigt. Durch die Darstellung der Lokalisation und Konzentration von Renin und AKR1B7 im dreidimensionalen Raum boten diese Rekonstruktionen eine zusätzliche Analysemöglichkeit in Bezug auf die Verteilung der reninbildenden Zellen und das Koexpressionsmuster der beiden Proteine in der Niere.

Der zweite Versuchsteil beschäftigte sich mit dem Einfluss von AKR1B7 auf die Reninexpression und –sekretion sowie auf den Blutdruck der Mäuse. Zu diesem Zweck wurden AKR1B7-Knockout-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen verglichen, und zwar ebenfalls innerhalb der bereits beschriebenen drei Diätgruppen. Durch die Berücksichtigung der Diät sollten differenzierte Aussagen in Bezug auf die Auswirkungen der AKR1B7-Defizienz bei RAAS-Stimulation und –inhibition ermöglicht werden. Bestimmt wurden in den jeweiligen Mausgruppen der Renin-mRNA-Gehalt der Nieren, die Plasmareninkonzentration und der systolische Blutdruck. Außerdem wurden auch für diese Maustypen histologische Schnitte der Niere angefertigt, um das Reninexpressionsmuster von Wildtyp- und AKR1B7-Mäusen in allen Diätgruppen qualitativ vergleichen zu können.

Darüber hinaus wurde für die AKR-Knockout-Maus ein dreidimensionales Modell des Gefäßbaums angefertigt. Durch den Vergleich mit dem Gefäßbaum der Wildtyp-Maus sollten Aussagen darüber getroffen werden, ob AKR1B7 für die physiologische Architektur der Nierengefäße entbehrlich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Blutdruckmessgerät	Blood Pressure Measuring Monitor, 9001-series; TSE Systems, Bad Homburg
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets <u>TRITC-Filter:</u> Anregung 533-558 nm Emission 570-640 nm <u>Cy2-Filter:</u> Anregung 450-490 nm Emission 500-550 nm <u>Cy5-Filter:</u> Anregung 625-655 nm Emission 665-715 nm	Filter set 43, Zeiss, Jena Filter set 38 HE, Zeiss, Jena Filter set 50, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences Industrial Division, Mississauga, Canada
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Würselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85 °C, New Brunswick Scientific

Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore, Schwalbach
PCR-Geräte	Thermocycler, OmniGene, MWG, Ebersberg Primus 96, Peqlab, Erlangen Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Scantisch	motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller), Ludl Electronic Products, München
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen Multidrive XL, Pharmacia, Ratingen
UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
UV-Spektrometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vakuumentrifuge	Univapo 150 H UniEquip, Martinsried
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen
Wärmeblöcke	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar

Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/1
Wasserbäder	Modell W13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Labofuge 400, Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

2.1.3 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100 bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Frankfurt am Main
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Glycerin 87 %	Merck, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/ μ l	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x bzw. Colorless, 5x	Promega, Mannheim
H ₂ O ₂ 30 %	Merck, Darmstadt
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin®25000 5 ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol	Merck, Darmstadt

M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nuclease freies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0,5 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
Phenol	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Sevofluran SEVOrane	Abbott, Wiesbaden
SYBR® Green PCR Kit	Roche, Mannheim
TRizol®-Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazinx	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4 Primer

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

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
chicken anti-Renin-IgG	polyklonal	Davids Biotech, Regensburg	1:400
mouse anti-Glattmuskelaktin-IgG	polyklonal	Immunotech., Marseille, Frankreich	1:200
goat anti-AKR1B7-IgG	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA	1:100

Sekundärantikörper	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
donkey anti-chicken-IgY	Cy2 (Histologie) TRITC (3D-Rekonstruktionen)	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-mouse-IgG	Cy5 (Histologie) Cy2 (3D-Rekonstruktionen)	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-goat-IgG	TRITC (Histologie) Cy5 (3D-Rekonstruktionen)	Dianova, Hamburg	1:400

2.1.6 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die Herstellung sämtlicher Puffer und Lösungen mit H₂O bidest. als Lösungsmittel.

2.1.6.1 Immunhistochemie

Fixierlösung (Methyl-Carnoy-Lösung)	
Methanol	60 %
Chloroform	30 %
Eisessig	10 %

Fixierlösung für Perfusion	
PBS	
Paraformaldehyd	3 %

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

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

Waschpuffer	
PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %

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

2.1.6.2 Molekularbiologie

Agarosegel	
TBE	
Agarose	2 %

NaOH für gDNA-Extraktion	
NaOH	25 mM

Ethidiumbromid	
Ethidiumbromid	50 mg/ml

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

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

2.1.7 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2003 erstellt. Zur Literaturrecherche diente PubMed von NCBI - The National Center for Biotechnology Information. Die Mikroskopie erfolgte mit AxioVision 4.7 von Zeiss.

Die Serienbilder wurden mit Adobe Photoshop CS4 und ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA) bearbeitet. Die 3D-Rekonstruktionen wurden mit Amira 5.4.2 visualization software (Mercury Computer Systems, Inc., USA) realisiert. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism 5 erstellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die durchgeführte Untersuchung zur Anatomie und Physiologie der Mausnieren wurden 8-12 Wochen alte, adulte männliche Mäuse verschiedener Tierstämme verwendet:

Tierstamm	Genetischer Hintergrund	Herkunft
C57/B16	C57/B16	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
AKR1B7-Knockout	C57/B16	F. Theuring, Charité–Universitätsmedizin Berlin
Aldosteronsynthase-Knockout	129Sv	O. Smithies, University of North Carolina, Chapel Hill, NC
Connexin40-Knockout	C57/B16	K. Willecke, Universität Bonn

Bei den im Nachfolgenden als Wildtyp (WT) bezeichneten Mäusen handelt es sich um C57/Bl6-Mäuse.

Zur Stimulation, bzw. zur Suppression des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wurde ein Teil der Versuchstiere 10 Tage bis zum Versuchsende mit Niedrigsalzfutter (0,02 % NaCl, Ssniff, Soest; [LS]) bzw. mit Hochsalzfutter (4 % NaCl, Ssniff, Soest; [HS]) ernährt. Die mit Niedrigsalzfutter ernährten Tiere wurden während der letzten 7 Tage zusätzlich mit dem ACE-Hemmer Enalapril (10mg/kg/d, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri; [LS/E]) behandelt. Die restlichen Versuchstiere erhielten Standardfutter (0,4 % NaCl, Ssniff, Soest; [NS]).

Alle Versuchstiere wurden gemäß dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ behandelt. Es wurde stets auf für Mäuse optimale Haltungparameter geachtet (Temperatur $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$, Hell-Dunkelintervall 12 h, Futter und Wasser ad libitum).

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Fixierung des Nierengewebes

Retrograde arterielle Perfusion

Die Fixierung des Gewebes soll autokatalytische Vorgänge verhindern, die Erhaltung der Zellstruktur in einem möglichst natürlichen Zustand ermöglichen und eine Härtung des Materials und damit eine bessere Schneidbarkeit bewirken. Dazu erfolgte eine retrograde arterielle Perfusion mit 3 % Paraformaldehyd in PBS. Die Mäuse wurden zunächst mit einer Wirkstoffkombination aus Ketamin und Xylazin (80 mg/kg KG i.p.) anästhesiert. Nach Eröffnung des Abdomens und Darstellung der Bauchorta wurde diese unterhalb des Abganges der Arteriae renales abgeklemmt, so dass die Versorgung der Nieren im Blutkreislauf nicht beeinträchtigt wurde. Kurz unterhalb der Klemme wurde der Perfusionskatheter eingeführt und dort fixiert. Zum Druckausgleich erfolgte das Öffnen der unteren Vena cava. Zur Druckentlastung und zum Abfließen der Perfusionslösung wurde die untere Vena cava durch einen kleinen Schnitt eröffnet. Nach Entfernen der oberen Klemme wurden über den Katheter 10 ml isotone NaCl-Lösung und 10 I.E. Heparin retrograd perfundiert. Im Falle einer erfolgreichen Perfusion kam es zu einer raschen Entfärbung der Abdominalorgane. Anschließend wurde das Gewebe durch Perfusion mit frisch angesetztem 4 % Paraformaldehyd in PBS mit konstantem Fluss von 40 ml/3 min fixiert. Die entnommenen, perfundierten Nieren wurden bis zur Paraffineinbettung in 70 % Methanol bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2.2 Einbettung in Paraffin

Zur Vorbereitung der Einbettung in Paraffin wurde das Nierengewebe in Gewebe-Einwegkassetten durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration schrittweise dehydriert:

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

Nach Abschluss dieser Behandlung wurden die Nieren zweimal für mindestens 24 h in 60 °C warmes flüssiges Paraffin eingelegt. Nachdem das Gewebe durch diese Behandlung vollständig mit flüssigem Paraffin durchtränkt war, erfolgte anschließend die Einbettung der Präparate in mit 60 °C warmem Paraffin gefüllte Silikon-Kautschuk-Einbettformen sowie die Abkühlung und Aushärtung bei 4 °C über Nacht.

2.2.2.3 Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die eingebetteten Präparate mittels eines erhitzten Spatels an der Unterseite leicht geschmolzen, zurechtgeformt und auf einen Holzblock geklebt. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden 5µm dicke Serienschnitte angefertigt und anschließend in einem 40 °C warmen Wasserbad gestreckt. Nach dem Aufziehen auf super frost Objektträger wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 40 °C über Nacht getrocknet.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte für die anschließenden Färbungen durch eine umgekehrte Alkoholreihe nach folgendem Schema entparaffiniert:

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

2.2.2.4 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis und die Identifikation antigener Strukturen in Zellen und Geweben mit Hilfe von Antikörpern, die an Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, Goldpartikel oder Isotope gekoppelt sind. Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet im ersten Schritt ein primärer, unkonjugierter Antikörper an sein spezifisches Antigen im Gewebeschnitt. Im zweiten Schritt werden die Schnitte mit einem sekundären Antikörper inkubiert, der sich gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers richtet und an einen fluoreszierenden Marker gekoppelt ist. Durch Anregung des Fluorophors mit Licht passender Wellenlänge können die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht werden.

Das folgende Protokoll bietet einen Überblick über die immunhistochemischen Abläufe im Anschluss an die Entparaffinierung:

Tag 1:

3 x 5 min Waschen der Präparate in PBS-Puffer auf dem Schüttler

- Herstellung der Stammlösung: PBS/1 % BSA (filtriert und komplett in Lösung)
Herstellung der Blockierlösung: 10 % HS in PBS/1 % BSA (Vortex-Anwendung)
- Schnitte mit Liquid-Blocker-Markierstift umranden, Blockierlösung auftragen und 20 min bei RT und auf dem Schüttler blockieren (zur Abschwächung unspezifischer Bindungen)
- Absaugen der Blockierlösungen und Überschichtung mit primären Antikörpern (Verdünnung in Blockierlösung, Vortex-Anwendung)
- Inkubation der primären Antikörper über Nacht bei 4 °C in einer geschlossenen, feuchten Kammer

Tag 2:

- 3 x 5 min Waschen der Schnitte in PBS/1 % BSA auf dem Schüttler
- Inkubation der sekundären Antikörper für 2 h bei RT im Dunkeln (Verdünnung in PBS/1 % BSA, Vortex-Anwendung, Zentrifugieren)
- 3 x 5 min Waschen der Präparate in PBS im Dunkeln auf dem Schüttler
- Eindeckeln mit Dako Glycergel Mounting Medium, Trocknen, Reinigen, in Präparatmappe überführen und im Kühlschrank aufbewahren

2.2.3 Dreidimensionale Rekonstruktion

2.2.3.1 Mikroskopie und Digitalisierung

Zur 3D-Rekonstruktion wurden Paraffinserienschnitte von adulten Nieren angefertigt und, wie oben beschrieben, gegen Renin, Glattmuskelaktin und AKR1B7 immunfluoreszent gefärbt. Für die Rekonstruktion eines Gefäßbaums wurden jeweils etwa 100 Schnitte von 5µm Dicke verwendet. Die Mikroskopie und die Digitalisierung der Schnitte erfolgten mit Hilfe eines Axiovert 200M Mikroskops mit motorisierter Objektauflage, einer Schwarz-weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) und der Software AxioVision LE Rel.4.5. von Zeiss. Aufgrund der unterschiedlichen Fluorophore für Renin, Glattmuskelaktin und AKR1B7 wurde die Wellenlänge der einstrahlenden Lichts mit Hilfe verschiedener Fluoreszenzfilter variiert und das jeweils emittierte Licht im entsprechenden Spektralbereich aufgenommen (TRITC: Anregung bei 533-558 nm, Emission bei 570-640 nm; Cy2: Anregung bei 450-490 nm, Emission bei 500-550 nm; Cy5: Anregung bei 625-655 nm, Emission bei 665-715 nm). Die Einzelbilder wurden mit 100facher Vergrößerung aufgenommen.

AxioVisionLE Rel.4.5

Nach der Auswahl der Kanalfarben (hellblau für Aktin, grün für Renin, rot für AKR1B7) sowie der Einstellung der optimalen Belichtungszeit für jeden Kanal wurde zunächst ein Übersichtsbild aller Schnitte auf dem Objektträger erzeugt. Aufgrund der Größe der adulten Nieren erfolgte wurden die Nierenausschnittbilder quadrantenweise aufgenommen, d.h. anhand von vier Einzelbildern, mit 15%iger Überlappung, die zu einem Gesamtbild zusammengefügt wurden. Im Anschluss wurden Überlappungsunregelmäßigkeiten durch die Funktion Stitching anhand des Referenzkanals Aktin ausgeglichen. Zur Konvertierung der Kachelbilder wurde ein Helligkeitsausgleich durchgeführt sowie das jeweilige Overlay-Bild benannt und im Rot-Grün-Blau (RGB)-Farbraum im zvi-Format gespeichert. Für die weitere Bearbeitung der Daten wurden diese in 8 Bit konvertiert. Zur Vermeidung eines Qualitätsverlusts wurde das Grafikformat TIFF verwendet:

- Bild öffnen
- Datei → Exportieren → *.tif
- Stapelverarbeitung zur Konvertierung aller Serienbilder

2.2.3.2 Datenaufarbeitung mittels ImageJ

Bildstapelgenerierung

Da die Größe der einzelnen Overlay-Aufnahmen durch das individuelle Stitching variierte, für die weitere Datenaufarbeitung mit dem Rekonstruktionsprogramm Amira aber Bilder gleicher Größe verwendet werden müssen, wurden die RGB-Bilder zunächst auf eine einheitliche Größe zugeschnitten. Dazu wurden die Bilder mit Hilfe der Graphiksoftware ImageJ zu einem Bildstapel

(Stack) zusammengefasst:

- alle Serienbilder öffnen
- PLUGINS
- STACKS
- STACK BUILDER

Dabei wurde durch Anfügen schwarzer Ränder an die kleineren Bilder eines Bildstapels für alle Nierenschnitte einer Serie exakt die gleiche Bildgröße erreicht und der gesamte Bildstapel dann als IMAGE SEQUENCE gespeichert.

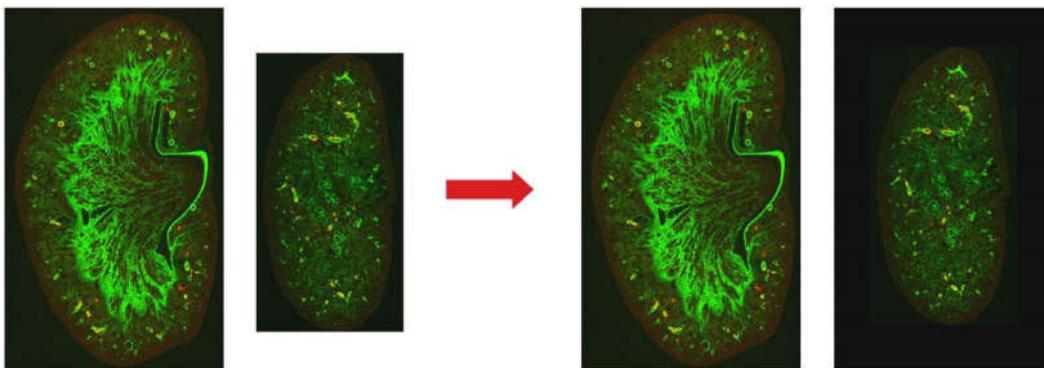


Abb. 2.1: Bildstapelgenerierung (Abbildung nach Machura et al., 2009)

2.2.3.3 Dreidimensionale Rekonstruktion mit Amira

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Daten in die Amira 5.4.2 Visualization Software auf eine Graphik-Workstation importiert. Für eine korrekte Skalierung der Daten musste zunächst die Pixelgröße in μm berücksichtigt werden. Dieser Wert ist Objektiv- und Kamera-abhängig und beträgt bei der Verwendung des 10x Objektivs $1 \times 1 \mu\text{m}$. Bezogen auf die maximalen Abmessungen des Bildstapels (Länge x und Breite y), die Gesamtzahl der Schnitte und die jeweilige Schnittdicke ($z = 5 \mu\text{m}$) wurde die BOUNDINGBOX definiert, die die maximalen Abmessungen des Datensatzes in jeder Ebene beschreibt. Da fortan mit dreidimensionalen Daten gearbeitet wurde, wurde der Begriff Pixel durch den Begriff Voxel abgelöst, der der Geometrie des Raumes entsprechend eine quaderförmige Zelle darstellt. Ein Voxel hatte in dieser Arbeit somit $1 \times 1 \times 5 \mu\text{m}$.

Farbkanaltrennung

Im nächsten Schritt wurde der RGB-Datensatz wieder in seine einzelnen monochromen Kanäle aufgetrennt. Dies ist notwendig, damit die Rekonstruktionssoftware die Fluoreszenzmarkierungen an Hand der Grauwerte der Pixel von jedem aufgenommenen Bild erkennen kann und um später eine getrennte Datensegmentierung zu ermöglichen:

- COMPUTE
- CHANNEL WORKS
- INPUT 1 CHANNEL 1 → speichern als Aktin-Stapel
- INPUT 1 CHANNEL 2 → speichern als Renin-Stapel
- INPUT 1 CHANNEL 3 → speichern als AKR1B7-Stapel

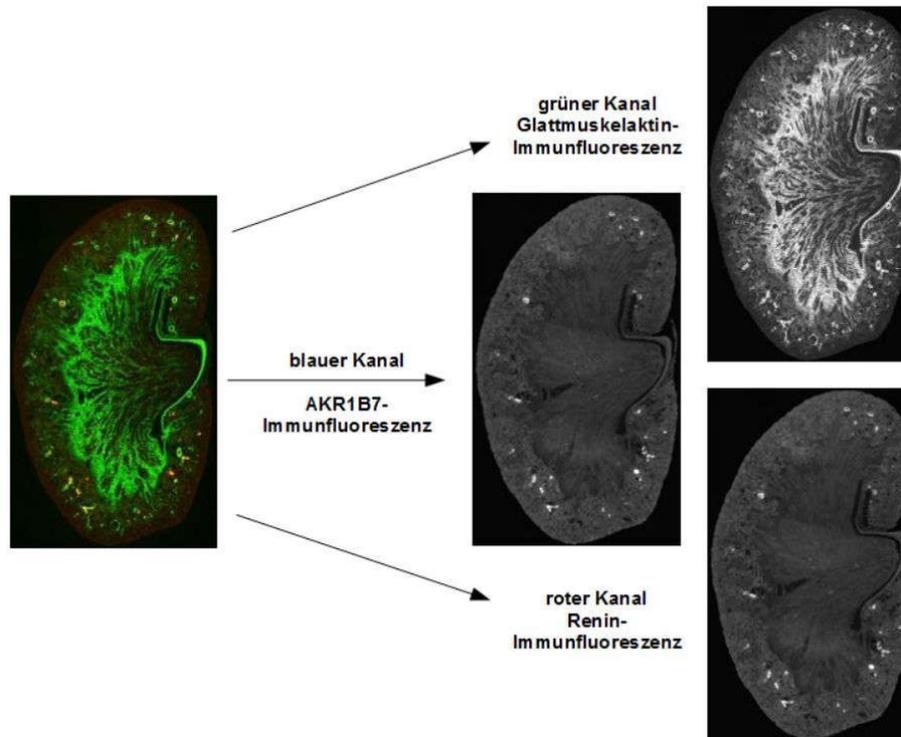


Abb. 2.2: Farbkanaaltrennung (Abbildung modifiziert nach Machura et al., 2009)

Alignierung

Da die digitalisierten Bilder zwar auf die gleiche Größe gebracht wurden, die histologischen Serienschnitte auf den Objektträgern jedoch unterschiedlich angeordnet waren, mussten der Aktin-, Renin- und AKR1B7-Stapel aligniert, d.h. zur Deckung gebracht werden. Das geschah über Rotations- und Verschiebungsbewegungen, wobei jeweils zwei aufeinanderfolgende Schnitte des Bildstapels so exakt wie möglich aufeinander projiziert wurden. Angewandt auf alle Schnitte entsteht hierdurch eine vollständig ausgerichtete Niere. Da der Aktin-Kanal aufgrund zahlreicher und zusammenhängender Immunreaktionen des Aktins eine bessere Alignierung ermöglicht, orientierte man sich am Aktin-Bildstapel. Die Renin- und AKR1B7-Daten wurden dann unter Referenz des bereits alignierten Aktin-Stapels ebenfalls auf die selben Positionen gedreht:

- COMPUTE
- ALIGN SLICES
- EDIT

- Automatische Alignierung und manuelle Feinabstimmung
- RESAMPLE

Datensegmentierung

Bei der Datensegmentierung werden diejenigen Strukturen, die zur Rekonstruktion des Gefäßbaums verwendet werden, markiert. Bei diesem sogenannten Labeln wird den relevanten Strukturen (Aktin, Renin, AKR1B7, Glomerulus, Nierenkapsel) jeweils ein definiertes Material zugeordnet. Aus der Gesamtheit der Markierungen für ein Material kann anschließend eine Oberflächenberechnung durchgeführt werden und die den verschiedenen Strukturen zugeordneten – farblich voneinander abgegrenzten – Oberflächen zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden.

Für das Labeln der Immunreaktionen bietet das Programm verschiedene Hilfswerkzeuge, die die Segmentierungsarbeit etwas erleichtern. Da die Fluoreszenzfärbung aber niemals vollkommen konstant ist und in jedem Fall mit Artefakten einhergeht, ist eine manuelle Korrektur essentiell. Eine Übersicht der wichtigsten Tools:

- BRUSH: Fluoreszenzsignale werden im Freihandmodus umfahren.
- MAGIC WAND: Hierbei nutzt man die unterschiedliche Verteilung der Grauwerte (0 = schwarz bis 255 = weiß). Durch Festlegen einer Grauwert-Schwelle können Immunofluoreszenzsignale mit einem Mausklick markiert werden.
- FILL HOLES: Löcher in Materialien werden aufgefüllt.
- REMOVE ISLANDS: Kleine Material-Inseln (Artefakte) werden automatisch entfernt.
- SMOOTH LABELS: Die Ränder der Materialien werden geglättet.
- THRESHOLD: Ermöglicht ähnlich wie MAGIC WAND eine Markierung aller Voxel in einem festgelegten Grauwertbereich. Der Unterschied liegt darin, dass die Funktion THRESHOLD auf einen ganzen Schnitt wirkt, während MAGIC WAND nur den mit dem ausgewählten Voxel verbundenen Bereich markiert.
- INTERPOLATE: Eine fehlende Struktur wird durch Markierung auf dem Schnitt vor und nach dem Fehler durch eine Interpolation berechnet und ergänzt.
- WRAP: Durch Markierung von Anfang, Mitte und Ende einer Zielstruktur werden die Zwischenschnitte so ergänzt, dass sich im 3D-Bild eine kugelige Struktur ergibt.

Die einzelnen Segmentierungsfunktionen können sowohl auf alle Bilder (ALL SLICES) als auch nur auf das aktuelle Bild (CURRENT SLICE) angewandt werden.

Die Aktin-, Renin- und AKR1B7-Labels wurden anhand der Fluoreszenzsignale der einzelnen Kanäle bearbeitet, wobei die Aktin-Daten die Markierungen für den späteren Gefäßbaum lieferten.

Die Strukturen der Kapsel und der Glomeruli konnten aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz erkannt und markiert werden.

Oberflächengenerierung

Die erstellten Label-Dateien bieten die Grundlage für die Berechnung der 3D-Modelle. Aus jedem Material wurde eine separate Oberfläche generiert und räumlich dargestellt:

- SURFACE GEN
- Anhängen von SURFACEVIEW zur Darstellung der Oberfläche

Die einzelnen Oberflächen konnten dann auf vielfältige Weise unter PROPERTIES bearbeitet werden, wie z.B.:

- SURFACE-EDITOR: Entfernung überflüssiger Ausschnitte
- SIMPLIFIER: Reduktion der Polygonzahl und somit der Datenmenge
- PARAMETER-EDITOR: Änderung der Farbe oder Skalierung der Oberfläche

Darüber hinaus kann die Oberfläche geglättet werden:

- COMPUTE
- SMOOTH SURFACE

Das aus mehreren Oberflächen zusammengesetzte Modell konnte rotiert und räumlich analysiert werden. Die Darstellungsform konnte unter SURFACE VIEW für jede einzelne Oberfläche z.B. in transparent geändert werden. Mit Hilfe weiterer Tools konnten Strecken und Winkel sowohl zwei- als auch dreidimensional gemessen und die Volumina und Flächen der einzelnen Modelle bestimmt werden.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolierung von Total-RNA aus Nieren

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem TRIzol[®]-Reagenz nach dem dazugehörigen Protokoll des Herstellers. Die Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Das TRIzol[®]-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat. Mit Hilfe von Chloroform wird das Homogenisat in drei Phasen aufgetrennt. Die RNA wird dann mit Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt. Bei sämtlichen Vorgängen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNase Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet. Glaswaren wurden durch dreistündiges Erhitzen auf 180 °C RNase-frei gemacht. Benötigte Puffer und Lösungen wurden mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Alle Vorgänge wurden auf Eis durchgeführt.

Kurzprotokoll zur RNA-Isolation mit TRIzol ®-Reagenz

- 1 ml TRIzol ®-Reagenz für ½ adulte Mausniere in Sarstedt-Tubes auf Eis vorlegen
- Nieren direkt aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen überführen und ca. 30 s homogenisieren
- Mix in 2 ml-Eppendorf-Tubes überführen, 5 min bei RT stehen lassen (Denaturierung der Proteine)
- 1/5 Vol. (für ½ adulte Niere also 200 µl) Chloroform zugeben, schütteln (keine Vortex-Anwendung)
- 20 min bei 4 °C mit 12000 rpm zentrifugieren
- ca. 500 µl wässrigen Überstand in 1,5 ml Eppendorf-Tube überführen, dabei auf keinen Fall Interphase (mit hydrophilen Proteinen) mitnehmen
- wässrige Phase 1:1 (500 µl) mit Isopropanol mischen und kräftig schütteln
- 10 min bei RT RNA ausfällen
- 10 min bei 4 °C bei 12000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml 75 % Ethanol aufnehmen
- 5 min bei 4 °C mit 7500 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet 10 min bei RT trocknen und je nach Größe in 50-300 µl RNase-freiem Wasser lösen
- max. 2 min bei 65 °C im Schüttler resuspendieren, bei -80 °C lagern

Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels eines Photometers im Wellenlängenbereich von 260 nm und 280 nm bestimmt. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm wurde die Qualität der isolierten RNA ermittelt. Für die Versuche wurde nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0 verwendet.

2.2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkription (RT) ermöglicht die Übersetzung der RNA in copy DNA (cDNA). In dieser Form sind die ursprünglich auf der RNA enthaltenen Informationen stabiler konserviert. Als Primer wurden Oligo(dT)₁₅-Ketten verwendet, da auf diese Weise hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz transkribiert wird.

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

Dieses Reaktionsgemischt (10 µl) wurde für 5 min auf 65 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des folgenden Ansatzes:

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

Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend 1 h bei 37 °C. Um zum Schluss die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurde der Reaktionsansatz für 2min auf 94 °C erhitzt. Für die quantitative PCR wurde die entstandene cDNA mit 20 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion wurde mit dem Lightcycler 480® SYBR Green Master PCR Kit von Roche an einem Roche Lightcycler 480® durchgeführt. Bei dieser Methode wird die DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch bestimmt. Dies ermöglicht, den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die entstandene Produktmenge wird dabei indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green bestimmt, der mit hoher Affinität in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet und in dieser gebundenen Form ca. 1000-fach stärker fluoresziert als in freier Form. Die dabei nachgewiesene Signalintensität ist proportional zur entstandenen DNA-Menge.

Reaktionsansatz:

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

Nach jedem Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1 °C/s) von 60 °C auf 95 °C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Housekeeper diente GAPDH. Der Renin-mRNA Gehalt pro Niere wurde berechnet aus der Gesamtausbeute an extrahierter RNA und des Renin-mRNA Levels.

2.2.4.4 Genotypisierung

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

Protokoll zur gDNA-Extraktion:

- Abschneiden von 2 mm Mausschwanz und in ein 0,5 ml PCR-Cup überführen, 100 µl 125 mM NaOH hinzufügen
- Inkubation bei 96 °C für 1h im Thermo cycler
- Gut vortexen um den Schwanz aufzulösen und Zugabe von 10 µl Tris HCl, pH 8
- 6 min zentrifugieren bei 10.000 rpm
- Einsetzen von 2 µl des Überstandes (gDNA) in die Genotypisierungs-PCR

In dieser Arbeit lag der Fokus auf dem Nachweis der Banden für AKR1B7. Die Genotypisierung erfolgte nach folgendem Reaktionsansatz und Amplifizierungsprotokoll.

Reaktionsansatz:

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	dd H ₂ O
2 µl	gDNA

Amplifizierungsprotokoll:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	3 min	Aktivierung
33	94 °C	30 s	Denaturierung
	64 °C	1 min	Annealing
	72 °C	1 min	Elongation
1	72 °C	5 min	Elongation
1	8 °C	∞	Store

Die PCR-Ansätze wurden dann auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte nach der Größe durch horizontale Gelelektrophorese bei 120 V.

2.2.5 Plasmareninbestimmung

Zur Bestimmung der Plasmareninkonzentration wurde die von Renin katalysierte Bildung von Angiotensin I (ANGI) aus Angiotensinogen betrachtet. Dazu wurden die zu untersuchenden Plasmaproben zusammen mit Reninsubstrat (Angiotensinogen aus dem Plasma von beidseitig nephrektomierten Ratten) inkubiert. Die Menge an entstandenem ANGI war proportional zum Reningehalt der jeweiligen Probe und wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassay-Kits (RIA) der Firma DiaSorin mit den vom Hersteller bereitgestellten Reagenzien und Standards bestimmt.

Für die Probengewinnung wurde den Mäusen nach der jeweiligen Diät Blut aus der Schwanzvene entnommen und in ein mit EDTA beschichtetes 75 µl-Hämatokritröhrchen überführt. Nach einseitigem Verschluss des Röhrchens mit Hilfe des Hämatokrit-Versiegelungskits wurde das

Plasma durch Zentrifugation (12000 rpm, 4 min) separiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Durchführung des RIA bei -80 °C aufbewahrt.

Die anschließende Messung der Plasmapreninkonzentration erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Verdünnung der Plasmaprobe 1:10 bis 1:2000, je nach erwarteter Reninmenge
- Verdünnung von Reninsubstrat 1:5 mit Maleatpuffer
- Herstellung des Reaktionsansatzes:

102 µl	Reaktionsansatz
50 µl	Verdünnte Plasmaprobe
50 µl	Mix aus 4 Teilen verdünntem Reninsubstrat und 5 Teilen RIA-Reaktionspuffer
2 µl	Enzyminhibitor (PMSF)

- Inkubation einer Hälfte des Reaktionsansatzes (51 µl) bei 37 °C, der anderen Hälfte bei 4 °C für 90 min
- Überführung von jeweils 45 µl inkubiertem Reaktionsansatz und 500 µl Tracer in Kit-Röhrchen
- Inkubation der Röhrchen zusammen mit 5 Standardproben (Kit) 3-24 h bei RT

Während der Inkubationszeit bindet ANGI proportional zur vorhandenen Konzentration an die anti-ANGI-Antikörper, mit denen die Innenseite der Kit-Röhrchen beschichtet ist. An die übrigen Bindestellen, die nicht mit ANGI-Molekülen besetzt sind, binden die radioaktiven Tracermoleküle.

Nach der Inkubationsphase wurde die Flüssigkeit aus den Proben abgesaugt, die Radioaktivität der Röhrchen gemessen und anhand einer aus den Standardwerten berechneten Standardkurve die ANGI-Konzentration berechnet. Die tatsächliche ANGI-Konzentration wurde durch Subtraktion des Warm- und Kaltwertes einer Probe bestimmt.

2.2.6 Blutdruckmessung

Vor der Blutdruckmessung wurden die Mäuse für 10 min in eine bereits aufgewärmte Kammer gesetzt. Anschließend wurden sie in eine Haltevorrichtung gebracht, an die sie zur Vermeidung stressbedingter, falsch-hoher Blutdruckwerte bereits Tage im Voraus gewöhnt wurden. Die Messung erfolgte am aus der Haltevorrichtung herausragenden Mausschwanz. Etwa an der Schwanzmitte wurde eine Blutdruckmanschette angelegt und weiter distal eine zweite Manschette, in die ein photoelektrischer Pulsdetektor integriert ist. Anschließend erfolgte die Messung des systolischen Blutdrucks, welcher auf dem Monitor aufgezeichnet wurde.

2.2.7 Statistische Methoden

Bei der statistischen Auswertung der Plasmareninkonzentration, der Renin-mRNA, des systolischen Blutdrucks sowie der Länge und des Durchmessers der afferenten Arteriolen wurden die Unterschiede zwischen den Subgruppen mittels ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen analysiert. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf 5 % ($P < 0,05$) festgelegt. Die Werte für Gefäßlänge, Gefäßdurchmesser und systolischen Blutdruck werden im Folgenden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Qualitative Analyse des AKR1B7- und Reninexpressionsmusters

Im folgenden Kapitel werden die Erkenntnisse vorgestellt, die mittels der histologisch-mikroskopischen Untersuchungen und der dreidimensionalen Rekonstruktionen der Serienschritte über die Verteilung von AKR1B7 und Renin in der Niere gewonnen wurden. Das Expressionsmuster von AKR1B7 und Renin bei der Wildtyp-Maus unter verschiedenen Diäten, der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus sowie der Connexin40-Knockout-Maus soll Aussagen über das Ausmaß der Koloaliation beider Proteine liefern. Anschließend erfolgt die Betrachtung von Renin in der AKR1B7-Knockout-Maus, die in Zusammenschau mit anderen Versuchsteilen eine Beurteilung des Einflusses von AKR1B7 auf die Reninexpression und –freisetzung ermöglichen soll.

Die histologisch-mikroskopischen Schnitte erlauben detaillierte Aussagen über die Verteilung beider Proteine. Im Folgenden werden zu jeder Niere zunächst eine Übersichtsaufnahme und anschließend mehrere Detailaufnahmen gezeigt. Diese werden in einer festgelegten Reihenfolge präsentiert, wobei zum einen ein gematchtes Bild der drei Fluoreszenzsignale gezeigt wird und zum anderen eine getrennte Darstellung der Kanäle für Aktin, Renin und ggf. AKR1B7 erfolgt.

Von den Nieren ausgewählter, besonders aussagekräftiger Maustypen wurden neben histologischen Schnitten auch dreidimensionale Rekonstruktionen erstellt. Der rekonstruierte Abschnitt wurde dabei jeweils so gewählt, dass ein arcuater Seitenast mit mehreren Aa. interlobulares und afferenten Arteriolen zu sehen ist. Die efferenten Arteriolen wurden nur bei einem Teil der Glomeruli exemplarisch dargestellt.

3.1.1 Die Wildtyp-Maus

3.1.1.1 Die Wildtyp-Maus unter Normalsalzdiät [NS]: dreidimensionale und histologische Betrachtung

Der Gefäßbaum der unstimulierten Wildtyp-Maus zeigt die physiologische Menge und Lokalisation von Renin und AKR1B7 in der Mausniere bei normaler Salzzufuhr (0,4 % NaCl) und soll als Referenz für die weiteren Rekonstruktionen dienen (Abb. 3.1., 3.2.).

Die Immunreaktionen von Renin sind hier an der typischen juxtaglomerulären Position am Ende der jeweiligen afferenten Arteriole sichtbar. Die Reninexpression findet dabei ausnahmslos an jedem Glomerulus statt. In der Wand der Interlobulararterien, der arcuaten Seitenäste und der efferenten Arteriolen ist dagegen kein Renin zu finden.

Die Expression von AKR1B7 zeigt das selbe Verteilungsmuster. AKR1B7-positive Bereiche zeigen sich ebenfalls an der juxtaglomerulären Position jeder afferenten Arteriole und fehlen in anderen vaskulären und extravaskulären Strukturen. Lokalisation und Menge von Renin und AKR1B7 erscheinen vergleichbar. Bei hochgradiger Überlappung der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 kann man hier von einer Kolo-kalisation beider Proteine sprechen.

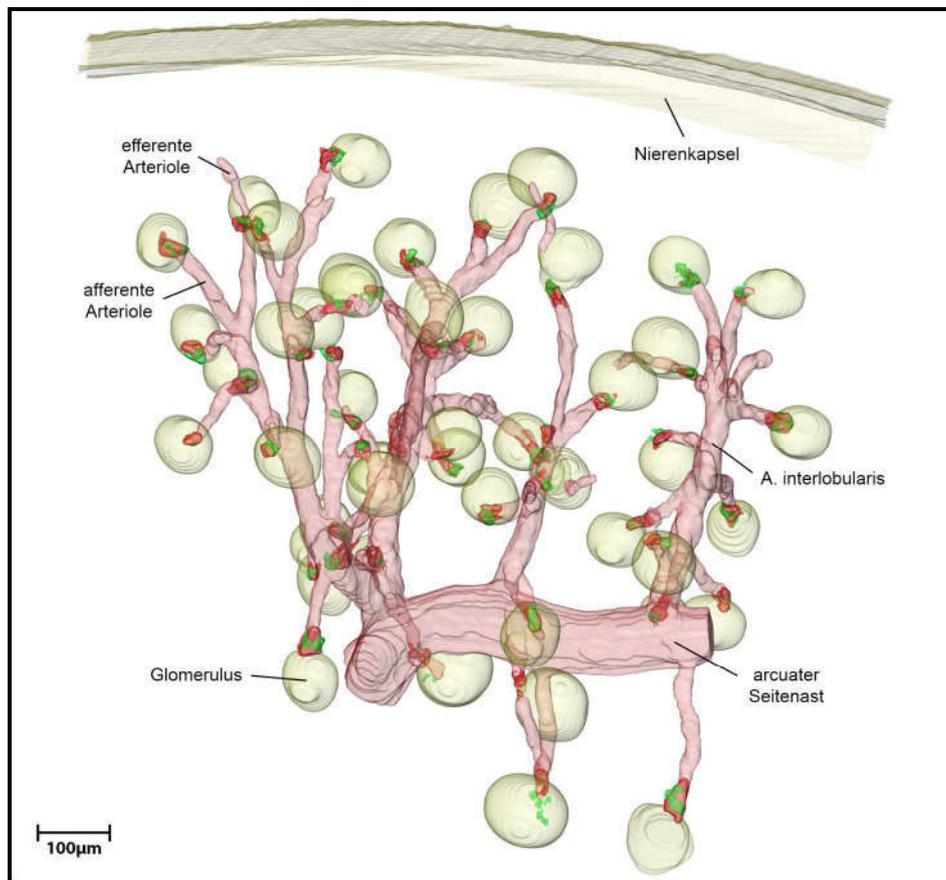


Abbildung 3.1: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa), Renin- (grün) und AKR1B7- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Wildtyp-Maus [NS] mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb).

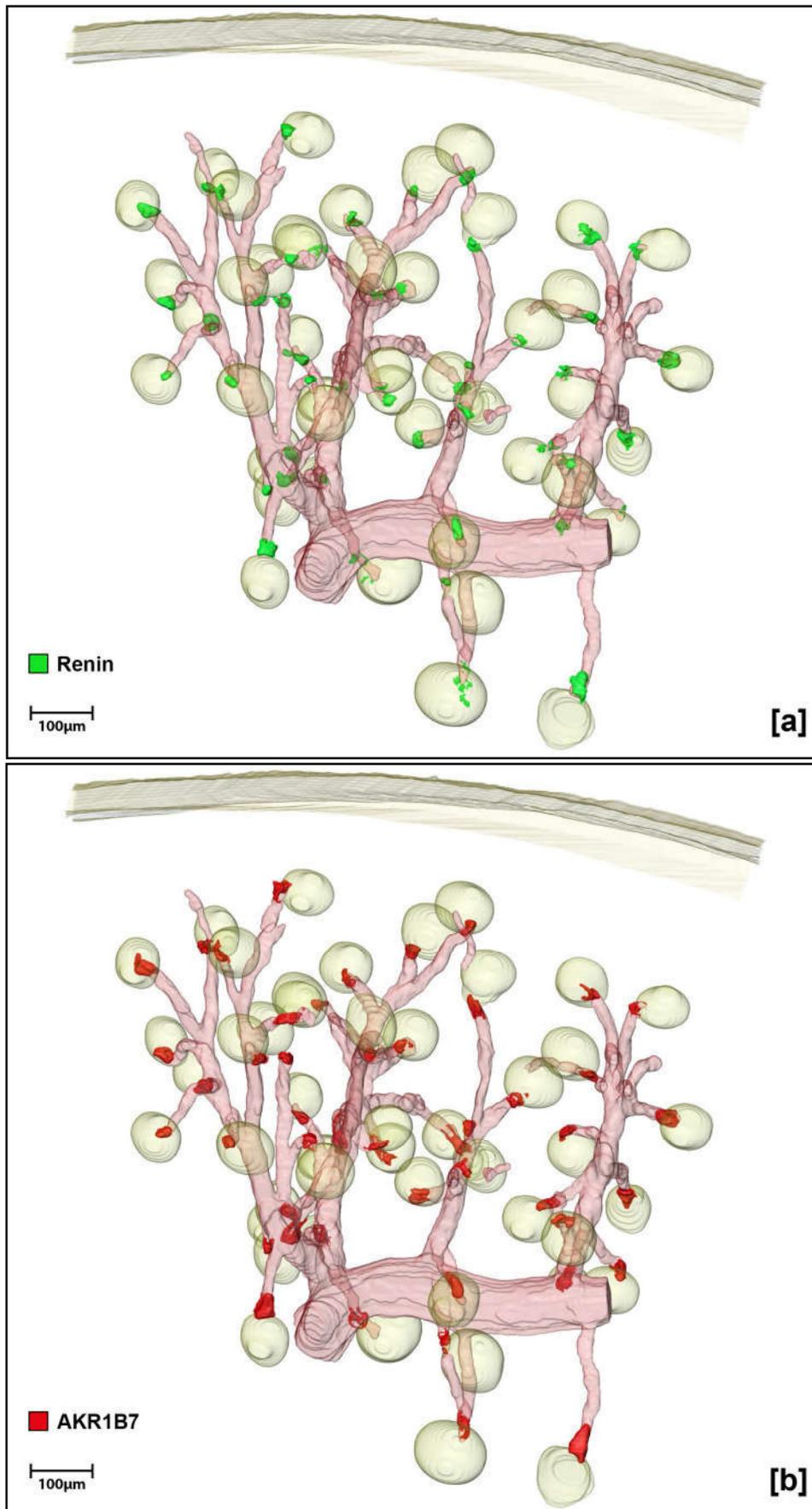
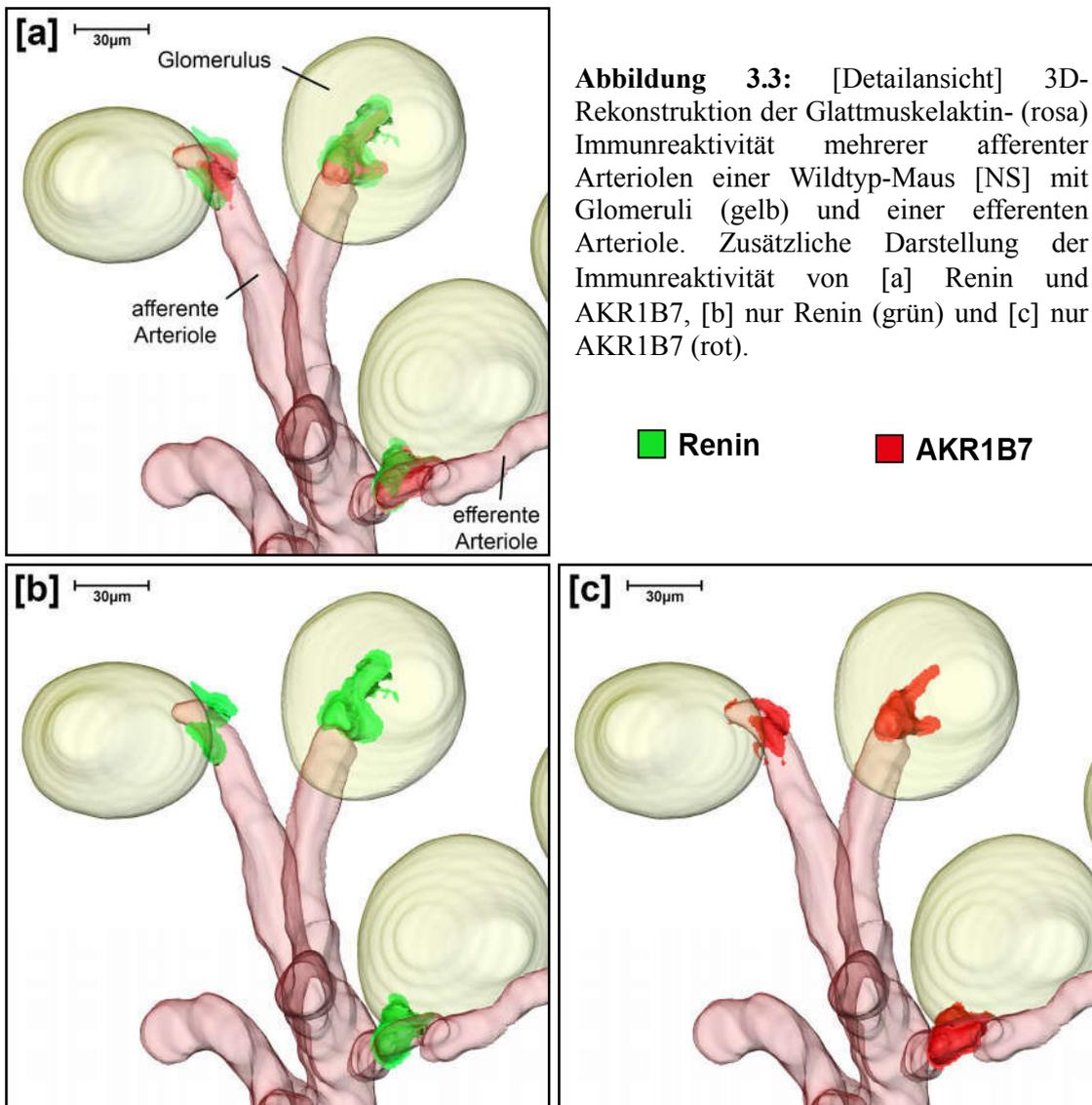


Abbildung 3.2: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Wildtyp-Maus [NS] mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb). Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin- (grün) bzw. [b] AKR1B7 (rot).

Die Detailansicht verdeutlicht die Kolokalisation von Renin und AKR1B7 an der juxtaglomerulären Position von drei afferenten Arteriolen (Abb. 3.3).



Auch anhand der histologischen Betrachtung lässt sich eine weitgehende Kolo­kalisierung von Renin und AKR1B7 an der juxtaglomerulären Position in der Wand der afferenten Arteriolen sowie die Abwesenheit beider Proteine in anderen vaskulären und extravaskulären Strukturen nachweisen. Abb. 3.4 zeigt exemplarisch drei Glomeruli mit dazugehörigen afferenten Arteriolen, in deren Wand sich die Koexpression von Renin und AKR1B7 in Form gelb erscheinender Bereiche äußert. Bereiche mit scheinbar alleiniger Expression von Renin (grünes Signal) bzw. AKR1B7 (rote Bereiche) sind zum Teil durch die Schnittführung in den Paraffinpräparaten bedingt. Zum Teil entsteht jedoch trotz des Vergleichs von benachbarten Schnitten der Eindruck kleinerer Unstimmigkeiten in Bezug auf die genaue Lokalisation beider Proteine, häufig in Form von schwachen, punkt- bis streifenförmigen AKR1B7-Signalen in der Wand kleiner Nierengefäße. Diese Unstimmigkeiten bilden jedoch nur einen geringen Anteil der Immunfluoreszenz-Signale.

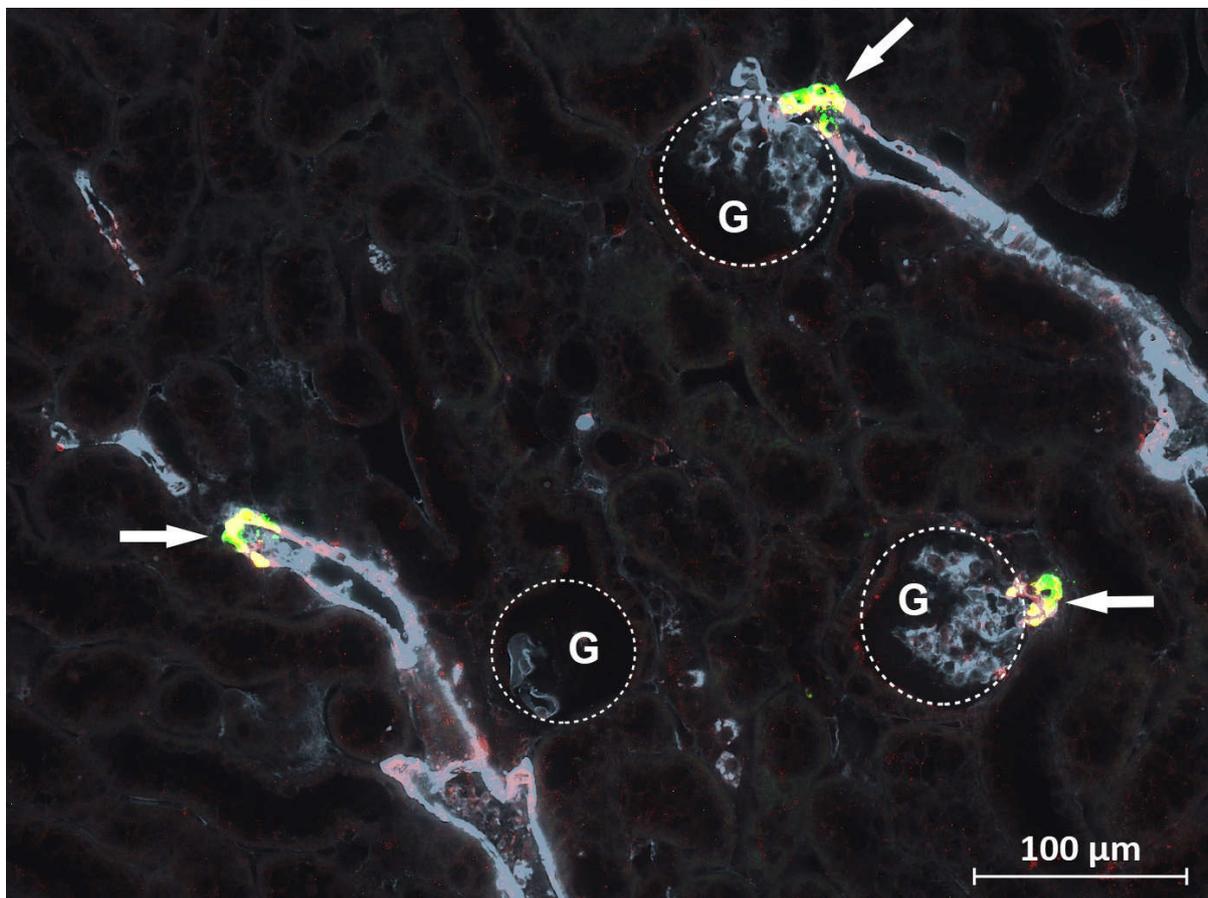


Abbildung 3.4: [Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [NS]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weiße Pfeile: Kolo­kalisierung der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.

Die Detailaufnahme (Abb. 3.5) zeigt neben der kombinierten auch die getrennte Darstellung der einzelnen Immunfluoreszenzsignale. Hier sind die Renin und AKR1B7-Signale in vergleichbarer Quantität an der selben Position in der Wand der afferenten Arteriole am glomerulären Gefäßpol erkennbar. Bei Betrachtung des isolierten AKR1B7-Signals zeigt sich darüber hinaus ein dünner Saum, der sich entlang der Gefäßwand fortsetzt, sich jedoch deutlich schwächer präsentiert als das kräftige, sich mit Renin überlappende Signal an der juxtaglomerulären Position.

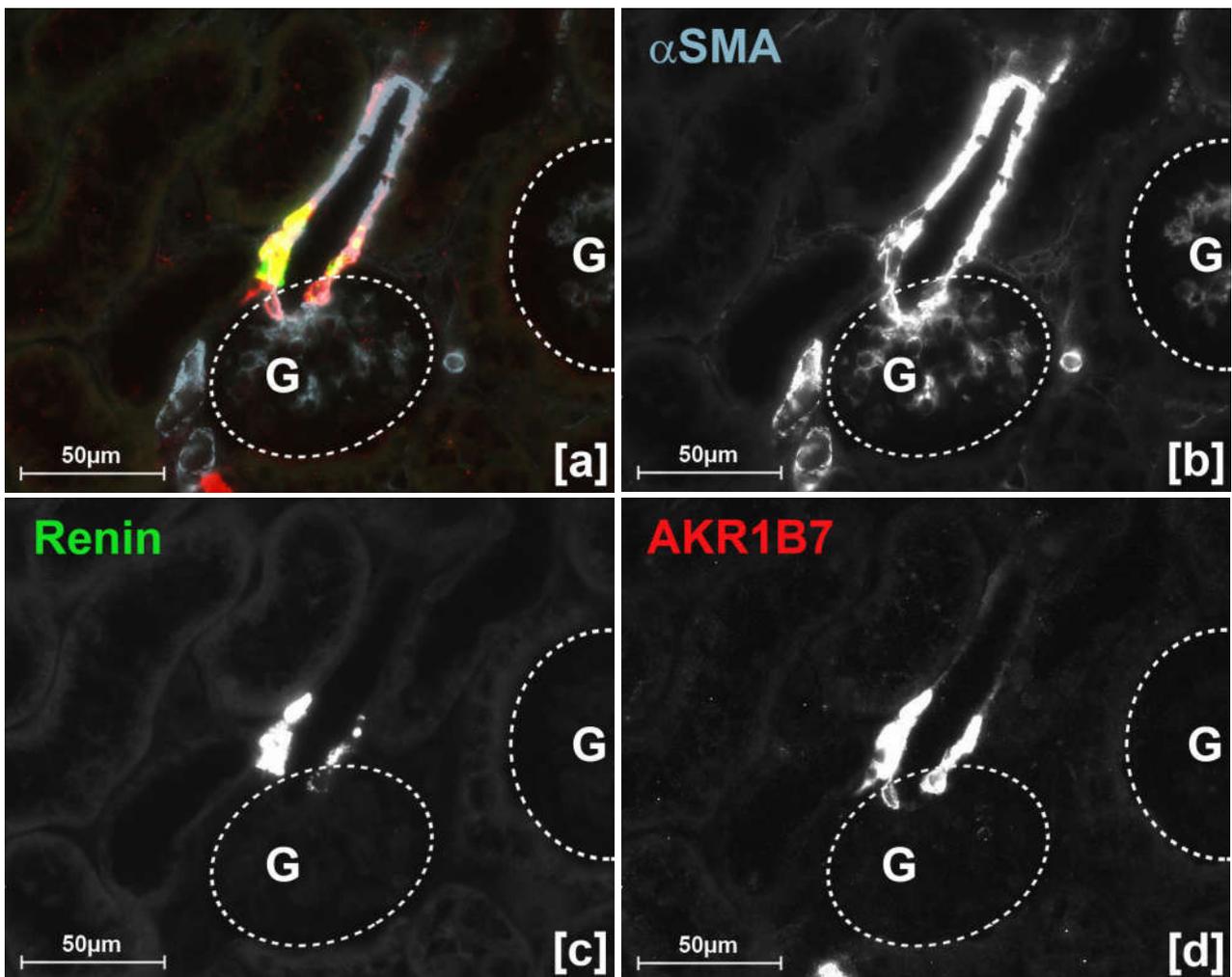


Abbildung 3.5: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [NS]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

3.1.1.2 Die Wildtyp-Maus nach 10d Hochsalzdiät: histologische Betrachtung

Die histologische Betrachtung der Reninverteilung der Wildtyp-Maus nach Hochsalzdiät zeigt diskrete Veränderungen im Vergleich zur Wildtyp-Maus unter Normalkost. Hier zeigt sich die Renin- und AKR1B7-Expression ebenfalls an der juxtaglomerulären Position jeder afferenten Arteriole, die Gesamtmenge beider Proteine erscheint jedoch leicht vermindert. In allen anderen Gefäßtypen (arcuate Haupt- und Seitenäste, Interlobulararterien, efferente Arteriolen) und extravaskulären Strukturen ist keine Renin- oder AKR1B7-Expression festzustellen. Der in Abb. 3.6 gewählte repräsentative histologische Ausschnitt zeigt neben verschiedenen Gefäßstrukturen zwei Glomeruli mit begleitender Kolokalisation von Renin und AKR1B7. Darüber hinaus finden sich - ähnlich wie bei der Wildtyp-Maus unter Normalkost - schwächere punkt- bzw. streifenförmige AKR1B7-Signale in der Wand kleinerer und größerer Gefäße.

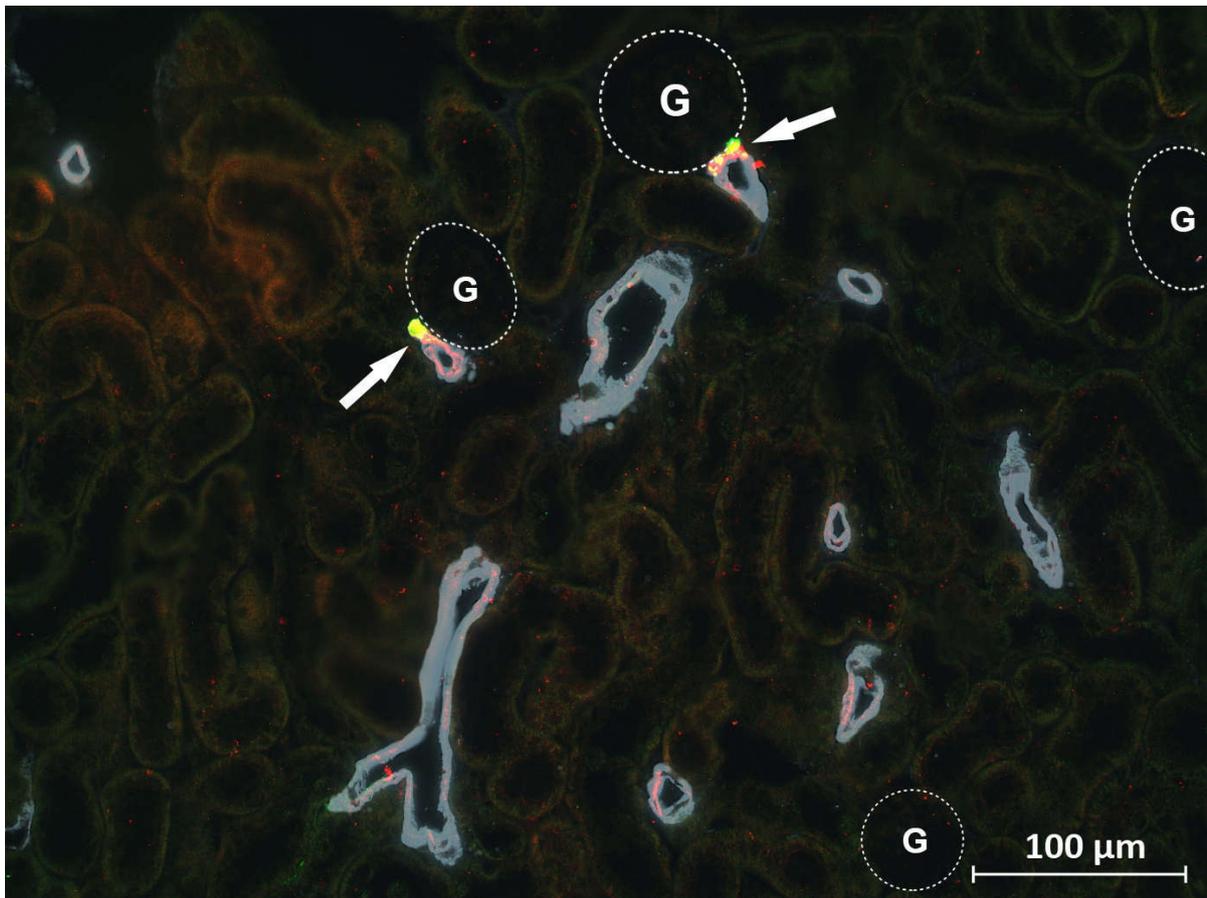


Abbildung 3.6: [Übersicht] Immunfluoreszenzfarbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [HS]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (rot), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weiße Pfeile: Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.

Die Detailaufnahme (Abb. 3.7) zeigt eine sehr gute Überlappung der Immunfluoreszenzsignale von Renin und AKR1B7 an der juxtaglomerulären Position zweier afferenter Arteriolen bei im Vergleich zur Wildtyp-Maus unter Normalkost leicht verringerter Gesamtmenge beider Proteine.

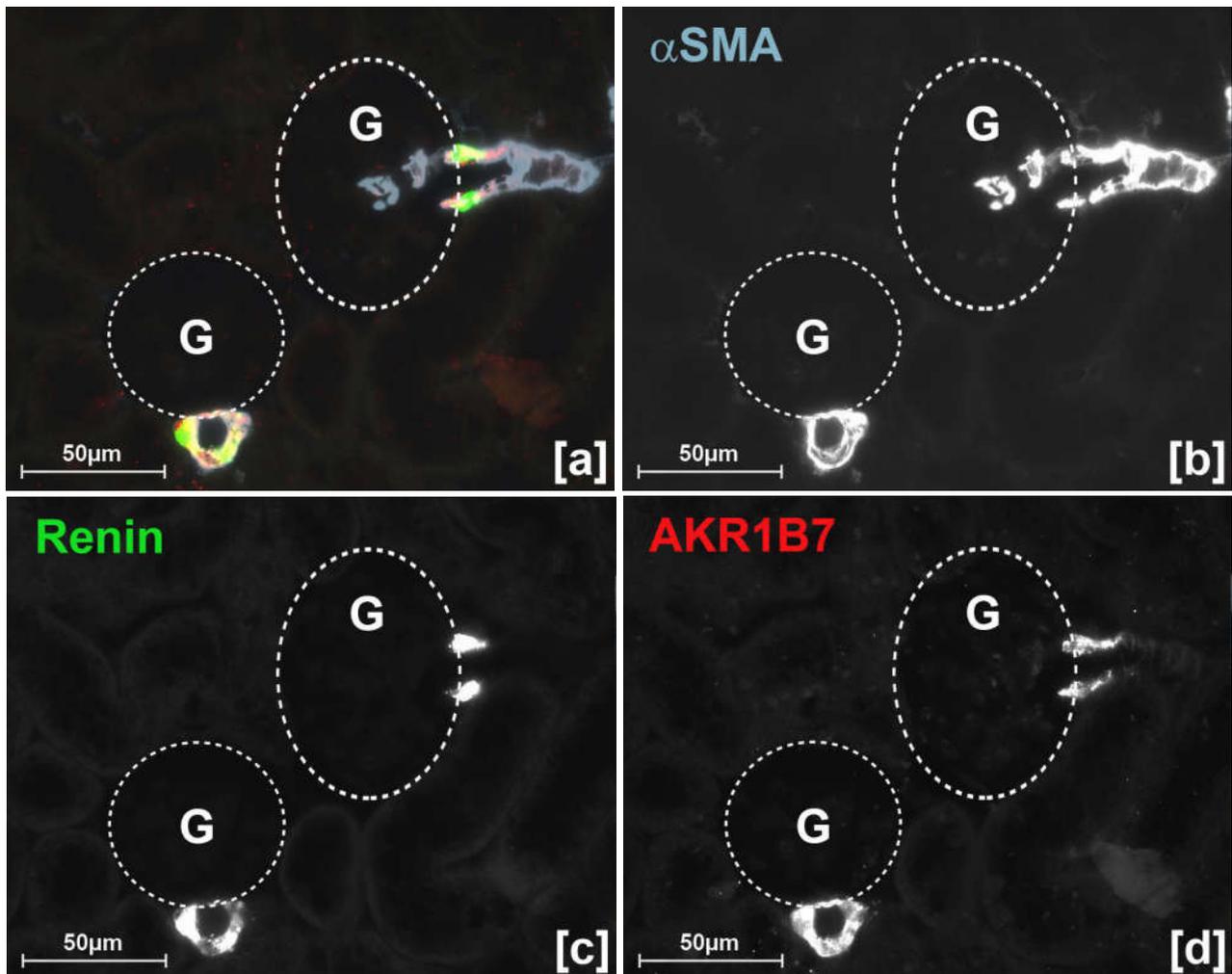


Abbildung 3.7: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [HS]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

3.1.1.3 Die Wildtyp-Maus nach 10d Niedrigsalzdiät und 7d Enalapril: histologische Betrachtung

Nach Niedrigsalzdiät und Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril zeigen sich bei der Renin- und AKR1B7-Verteilung deutliche Änderungen im Vergleich zu Mäusen mit Normalkost. Diese sind den Änderungen unter Hochsalzdiät entgegengesetzt und äußern sich in erster Linie in einer ausgeprägten Zunahme der Renin- und AKR1B7-Signale. Renin ist hier nicht mehr ausschließlich an der juxtaglomerulären Position lokalisiert, sondern im Rahmen einer retrograden Rekrutierung durch die Stimulation des RAAS auch in Abschnitten der afferenten Arteriole, die weiter vom Gefäßpol des Glomerulus entfernt sind. Die Rekrutierung erreicht dabei allerdings nicht die Abzweigung von der Interlobulararterie. Eine vergleichbare Zunahme des Signals ist auch in Bezug auf AKR1B7 festzustellen, das auch bei diesem Maustyp eine Kolo-kalisation mit dem Reninsignal zeigt. Die Zunahme der Renin- und AKR1B7-Expression erscheint bei diesem Maustyp insgesamt stärker ausgeprägt als die Abnahme der Renin- und AKR1B7-Expression in der Wildtyp-Maus nach Hochsalzdiät. Andere vaskuläre oder extravaskuläre Strukturen sind frei von Renin und AKR1B7.

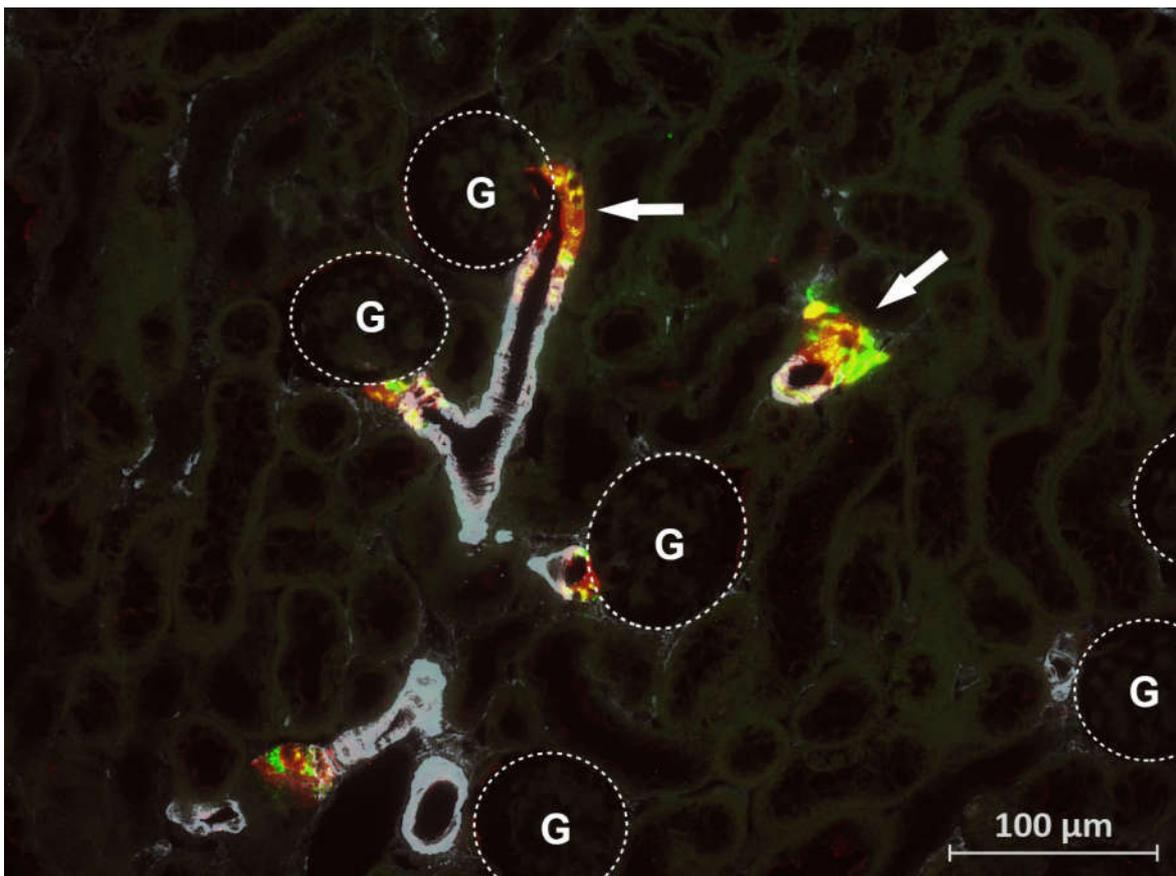


Abbildung 3.8: [Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [LS/E]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (rot), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weiße Pfeile: Kolo-kalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.

Die Detailaufnahme (Abb. 3.9) verdeutlicht die Kolo­kalisierung von Renin und AKR1B7 bei ausgeprägter retrograder Rekrutierung beider Proteine. Darüber hinaus ist – wie bereits für die Wildtyp-Maus nach Normalkost und Hochsalzdiät beschrieben – ein schwächeres AKR1B7-Signal ohne begleitendes Reninsignal in der Wand der zweiten, oben angeschnittenen afferenten Arteriole zu finden.

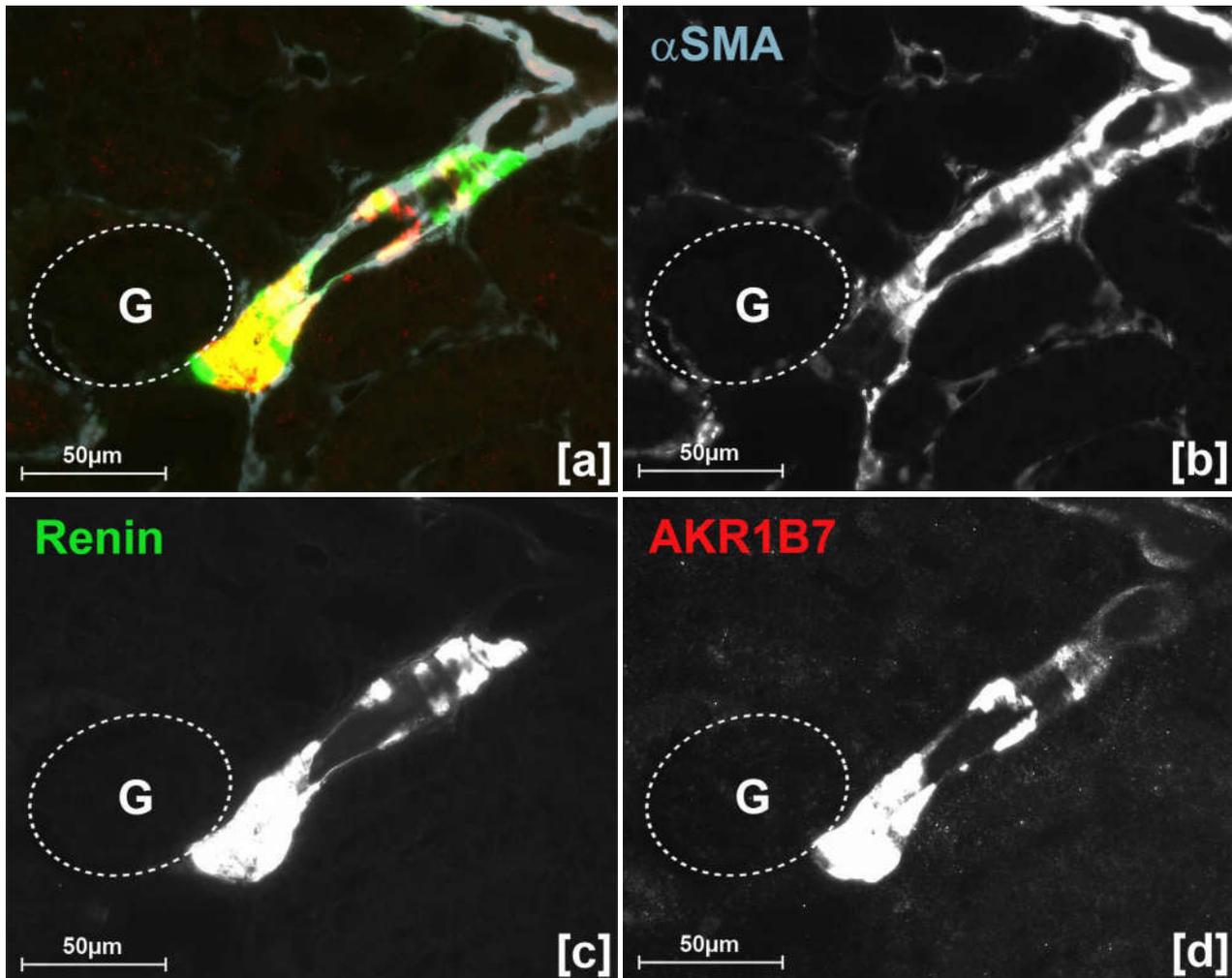


Abbildung 3.9: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [LS/E]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolo­kalisierung der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

3.1.2 Die Aldosteronsynthese-Knockout-Maus: dreidimensionale und histologische Betrachtung

Bei Betrachtung des 3D-rekonstruierten Gefäßbaums der Aldosteronsynthese-Knockout-Maus fallen massive Veränderungen in Bezug auf die renale Gefäßarchitektur sowie die Quantität und Lokalisation von Renin und AKR1B7 ins Auge. Die Gefäße erscheinen auf den ersten Blick deutlich verdickt und verkürzt, außerdem unterliegen sowohl die Gefäße als auch die Glomeruli deutlichen Kaliberschwankungen. Die Reninexpression ist im Rahmen einer retrograden Rekrutierung reninbildender Zellen entlang der Gefäßwand massiv gesteigert und erreicht neben weiter von den Glomeruli entfernten Abschnitten der afferenten Arteriolen auch die Wand von Interlobulararterien und sogar einzelne Bereiche des arcuaten Seitenastes. An der efferenten Arteriole sowie extravaskulär ist kein Reninsignal zu finden. Die AKR1B7-Expression ist in ähnlichem Ausmaß gesteigert und findet sich ebenfalls nicht nur in der Wand afferenter Arteriolen, sondern auch in der Wand interlobulärer Arterien und arcuater Seitenäste. Sowohl Renin als auch AKR1B7 zeigen in Bezug auf die retrograde Rekrutierung ein diskontinuierliches Muster: Zwischen Renin- und AKR1B7-positiven Bereichen finden sich gelegentlich Bereiche ohne Renin- bzw. AKR1B7-Signal (Abb. 3.10 und 3.11).

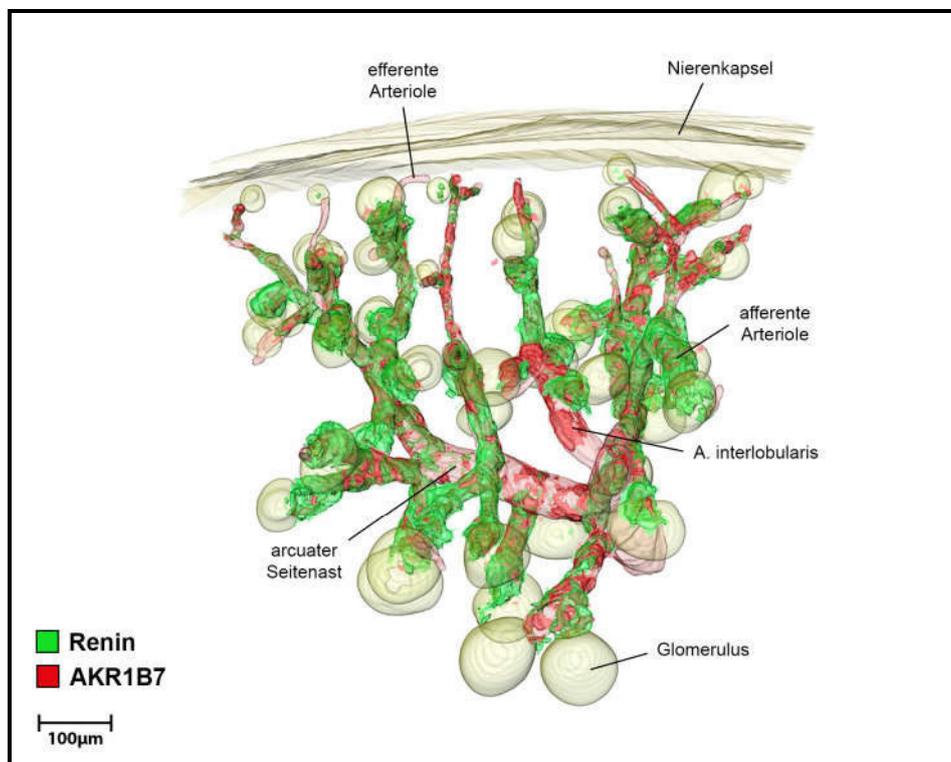


Abbildung 3.10: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa), Renin- (grün) und AKR1B7- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb).

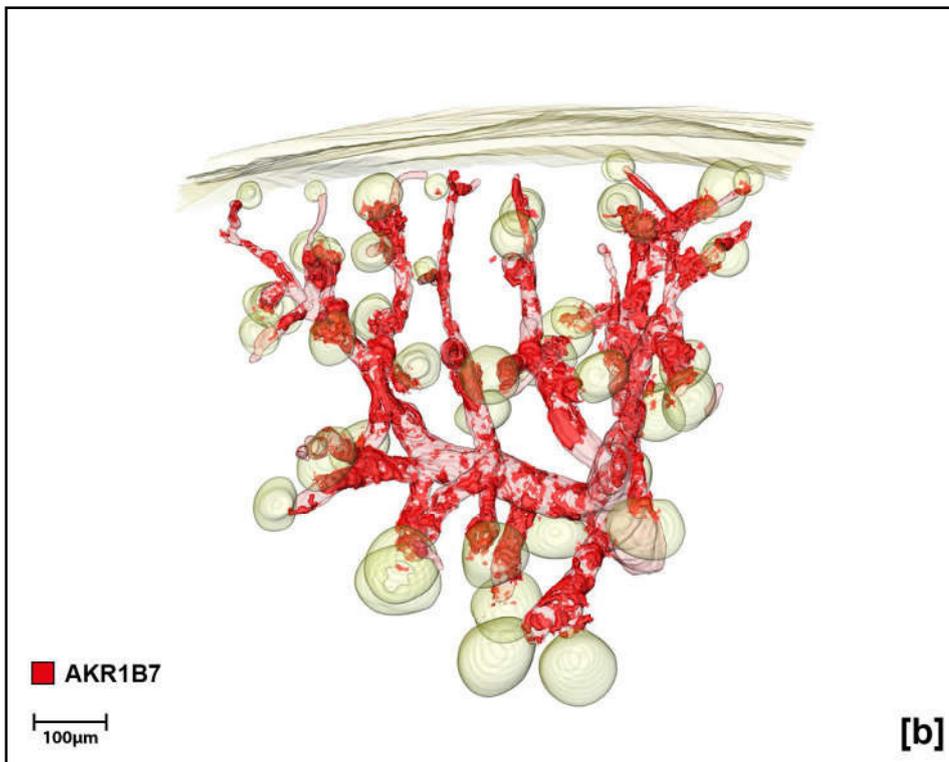
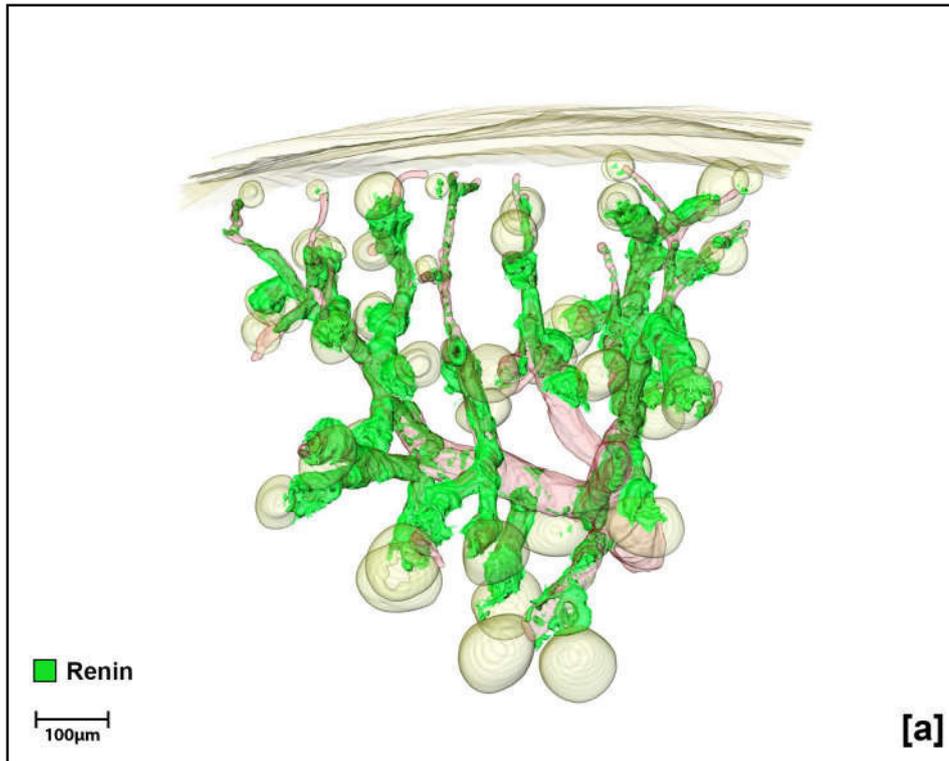


Abbildung 3.11: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Aldosteronsynthase-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb). Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin- (grün) bzw. [b] AKR1B7 (rot).

Darüber hinaus weisen die Verteilungsmuster der Renin- und AKR1B7-Immunfluoreszenz leichte Unterschiede auf: Während beide Proteine an den meisten Glomeruli und Gefäßabschnitten weitgehend kolokalisiert erscheinen, existieren zum einen Reninsignale ohne begleitendes AKR1B7-Signal und zum anderen Bereiche mit AKR1B7-Signal ohne begleitendes Reninsignal. Diese Situationen werden anhand dreier unterschiedlicher Detailansichten verdeutlicht (Abb. 3.12-3.14).

Abb. 3.12 zeigt drei aus einer Interlobulararterie entspringende afferente Arteriolen sowie die dazugehörigen Glomeruli. In allen gezeigten Gefäßabschnitten finden sich im Rahmen der retrograden Rekrutierung starke Immunfluoreszenzsignale von Renin und AKR1B7, die sich bis auf wenige Ausnahmen überlappen, sodass man hier von einer Kolokalisation beider Proteine sprechen kann. Eine solche Koexpression ist bei etwa zwei Drittel aller Glomeruli bzw. afferenter Arteriolen zu finden.

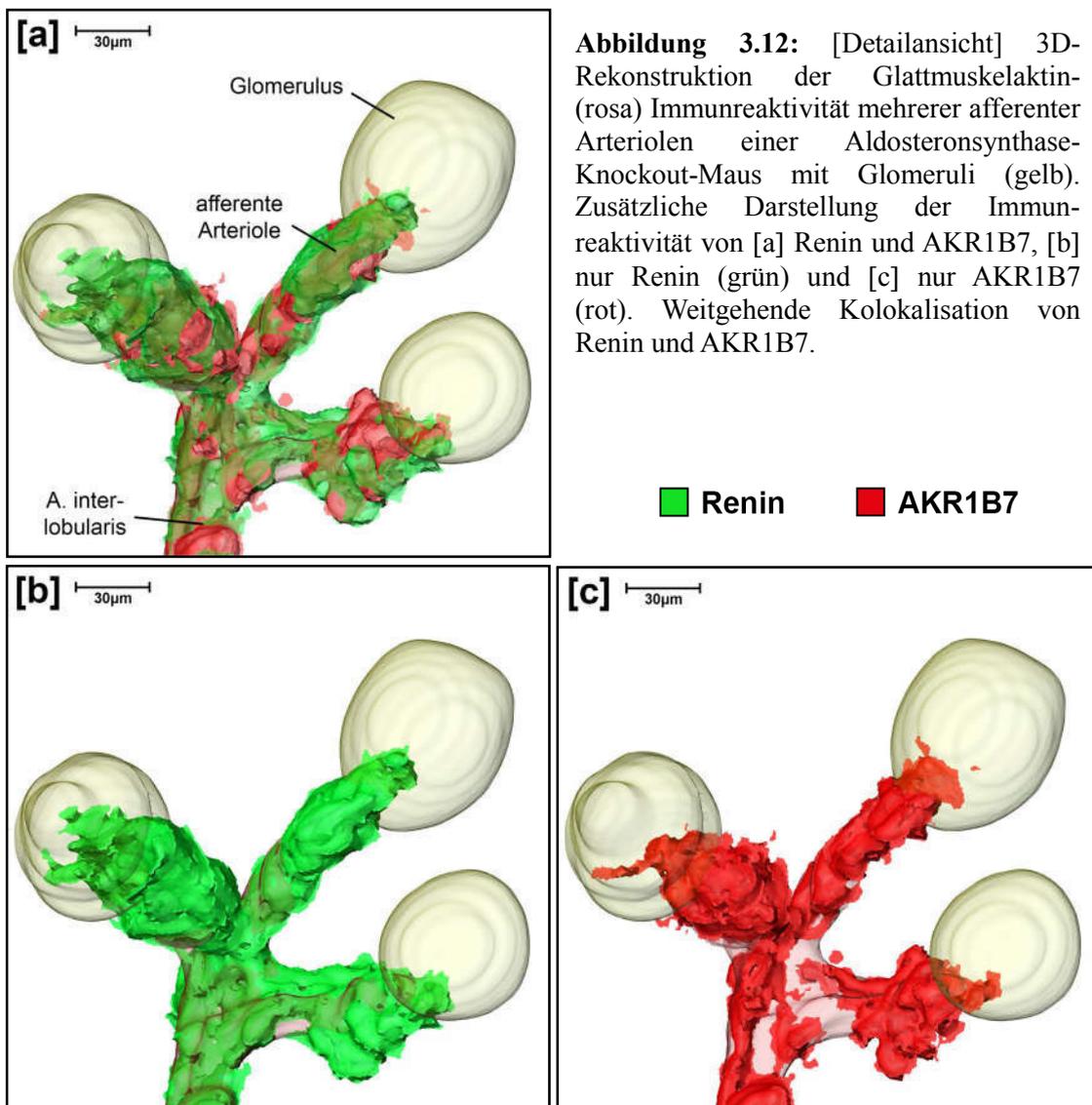


Abbildung 3.12: [Detailansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin-(rosa) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit Glomeruli (gelb). Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin und AKR1B7, [b] nur Renin (grün) und [c] nur AKR1B7 (rot). Weitgehende Kolokalisation von Renin und AKR1B7.

An den restlichen Glomeruli bzw. afferenten Arteriolen ist die Reninmenge deutlich höher als die AKR1B7-Menge. Abb. 3.13 zeigt ein Beispiel für zwei solche Arteriolen. Während die beiden Proteine in der Wand der Interlobulararterie sowie der vom Glomerulus weiter entfernten Abschnitte der afferenten Arteriole kolokalisiert sind, ist die Reninmenge direkt an juxtaglomerulärer Position der afferenten Arteriolen im Vergleich zu AKR1B7-Menge deutlich gesteigert. Gleichzeitig sind beim AKR1B7-Signal deutliche Lücken erkennbar.

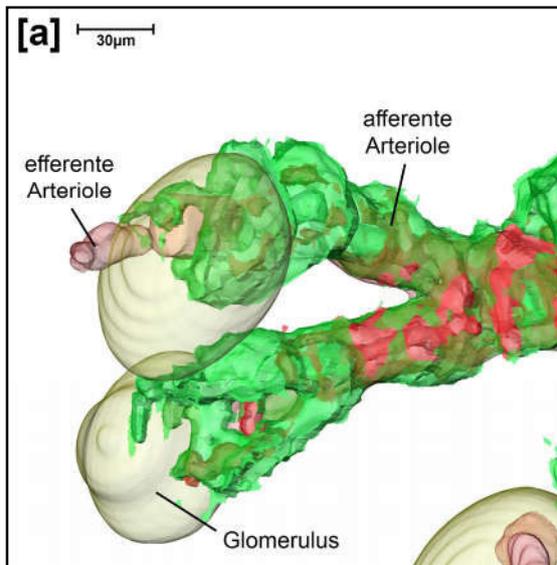
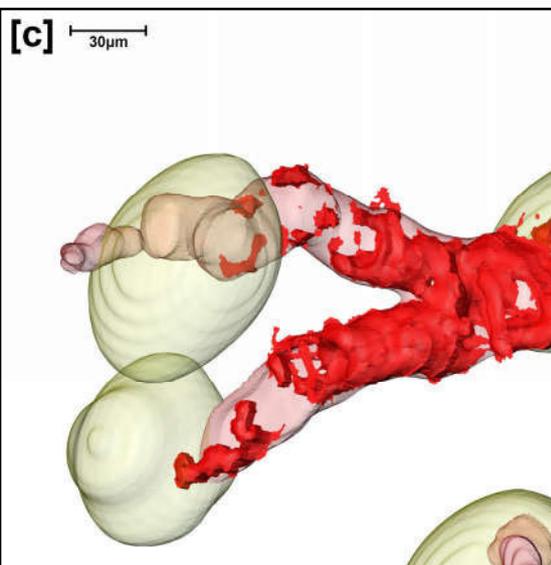
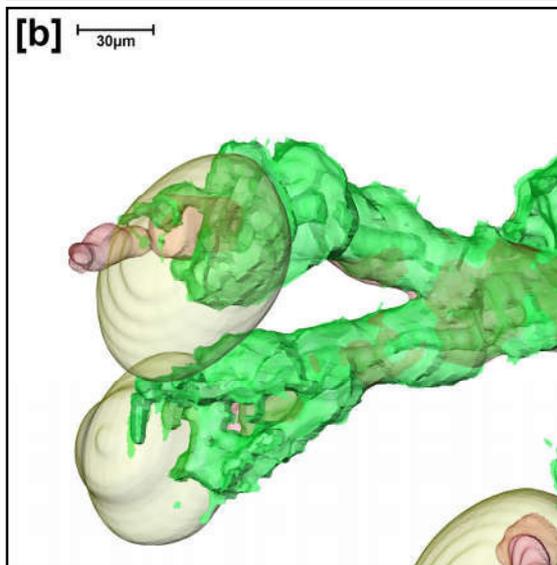
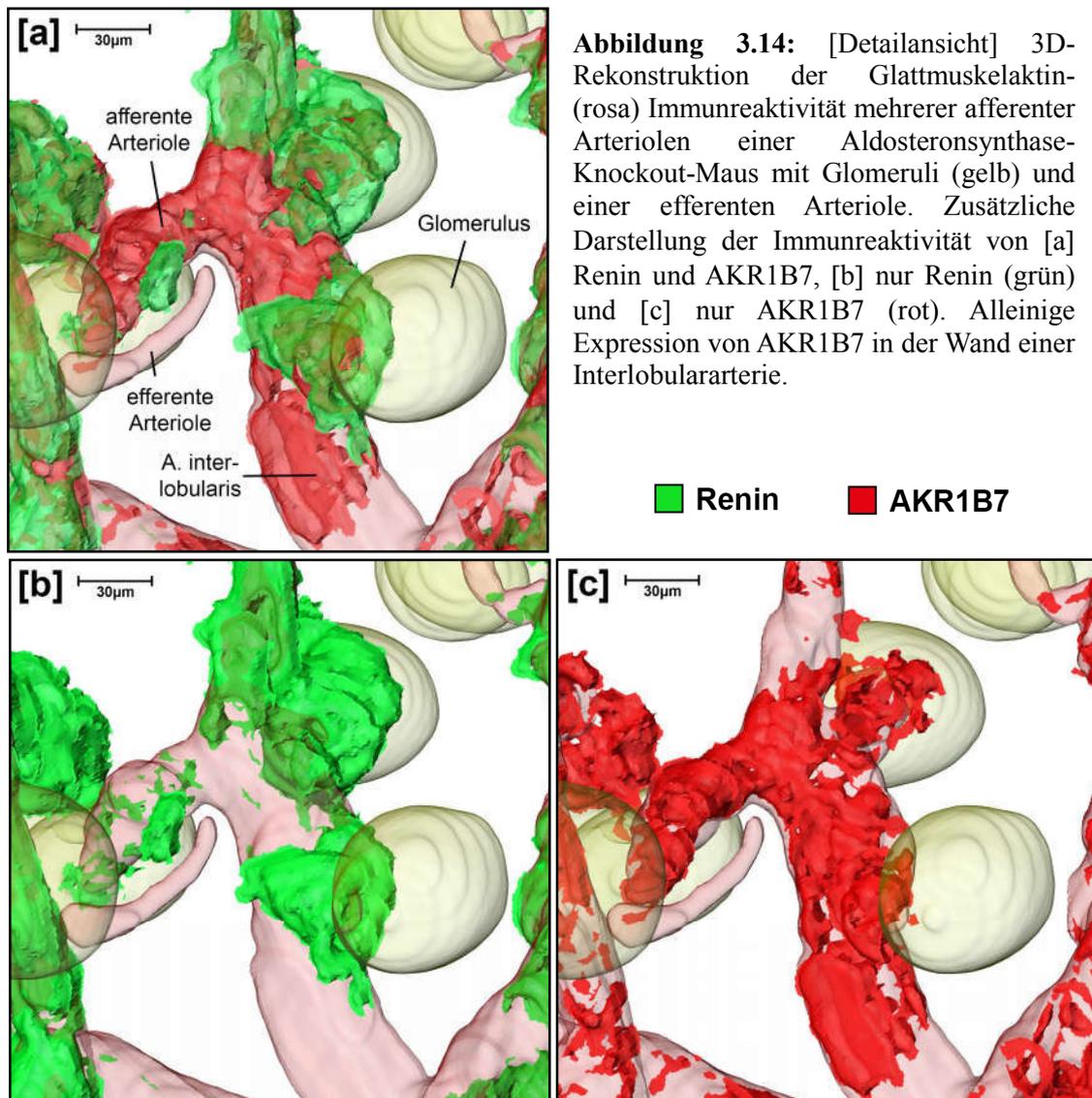


Abbildung 3.13: [Detailansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer Aldosteronsynthase-Knockout-Maus mit Glomeruli (gelb) und einer efferenten Arteriole. Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin und AKR1B7, [b] nur Renin (grün) und [c] nur AKR1B7 (rot). Starke Renin-Expression an juxtaglomerulärer Position der Glomeruli mit lediglich schwacher begleitender AKR1B7-Expression.

■ Renin ■ AKR1B7



Eine andere Situation ist in Abb. 3.14 dargestellt: Hier sind sowohl rein AKR1B7- als auch rein reninpositive Bereiche zu sehen, wobei das AKR1B7-Signal deutlich dominiert. Die AKR1B7-Expression findet sich ohne begleitende Reninexpression in der Wand der Interlobulararterie sowie mit lediglich geringer überlappender Reninexpression in der Wand einer afferenten Arteriole. Ähnliche Bereiche finden sich darüber hinaus in der Wand des arcuaten Seitenastes. Ein anderer Abschnitt der Interlobulararterie zeigt in der Abbildung umgekehrt ein Reninsignal ohne begleitendes AKR1B7-Signal.



Die mikroskopisch-histologische Betrachtung bestätigt die anhand der dreidimensionalen Rekonstruktion gewonnenen Erkenntnisse über die Renin- und AKR1B7-Verteilung. Auch hier ist eine starke Zunahme der Renin- und AKR1B7-Menge durch die retrograde Rekrutierung reninbildender Zellen zu sehen sowie eine überwiegende, aber nicht immer vorzufindende Kolokalisation beider Proteine. Neben der typischen juxtaglomerulären Position sind innerhalb der afferenten Arteriolen große zusammenhängende Bereiche zu sehen, die Renin exprimieren. Regelmäßig sind reninpositive Bereiche auch in der Wand von Interlobulararterien erkennbar. Insgesamt ist das Ausmaß der retrograden Rekrutierung und somit die Anzahl reninbildender Zellen auch im Vergleich zur Wildtyp[LS/E]-Maus deutlich erhöht. Die Expression von AKR1B7 zeigt ein ähnliches Muster, das sich häufig mit dem Reninverteilungsmuster überlappt. In Abb. 3.15 ist sowohl eine Koexpression von Renin und AKR1B7 in der Wand afferenter Arteriolen sowie größerer Gefäße zu sehen (weiße Pfeile), als auch ein alleiniges Vorkommen von AKR1B7 in der Wand größerer Gefäße (rote Pfeile).

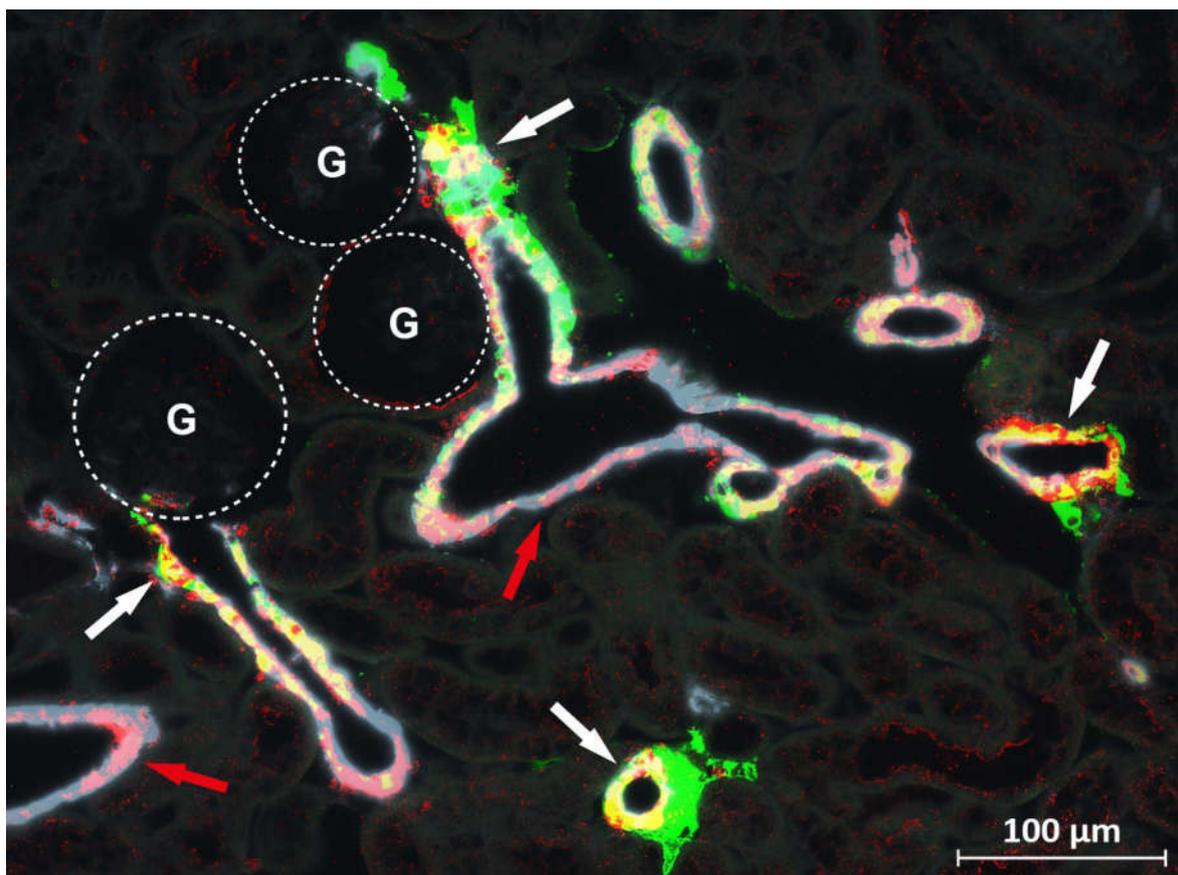


Abbildung 3.15: [Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Aldosteronsynthase-Knockout-Maus. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (rot), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weiße Pfeile: Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). Rote Pfeile: Alleinige Expression von AKR1B7 in der Wand einer Interlobulararterie. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.

Die histologischen Detailansichten zeigen ähnlich den dreidimensionalen Detailansichten drei unterschiedliche, repräsentative Ausschnitte mit charakteristischer Renin- und AKR1B7-Verteilung innerhalb der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus. In Abb. 3.16 ist die häufigste Variante zu sehen – die Kolokalisation von Renin und AKR1B7 entlang der afferenten Arteriole mit Übergreifen auf die Interlobulararterie.

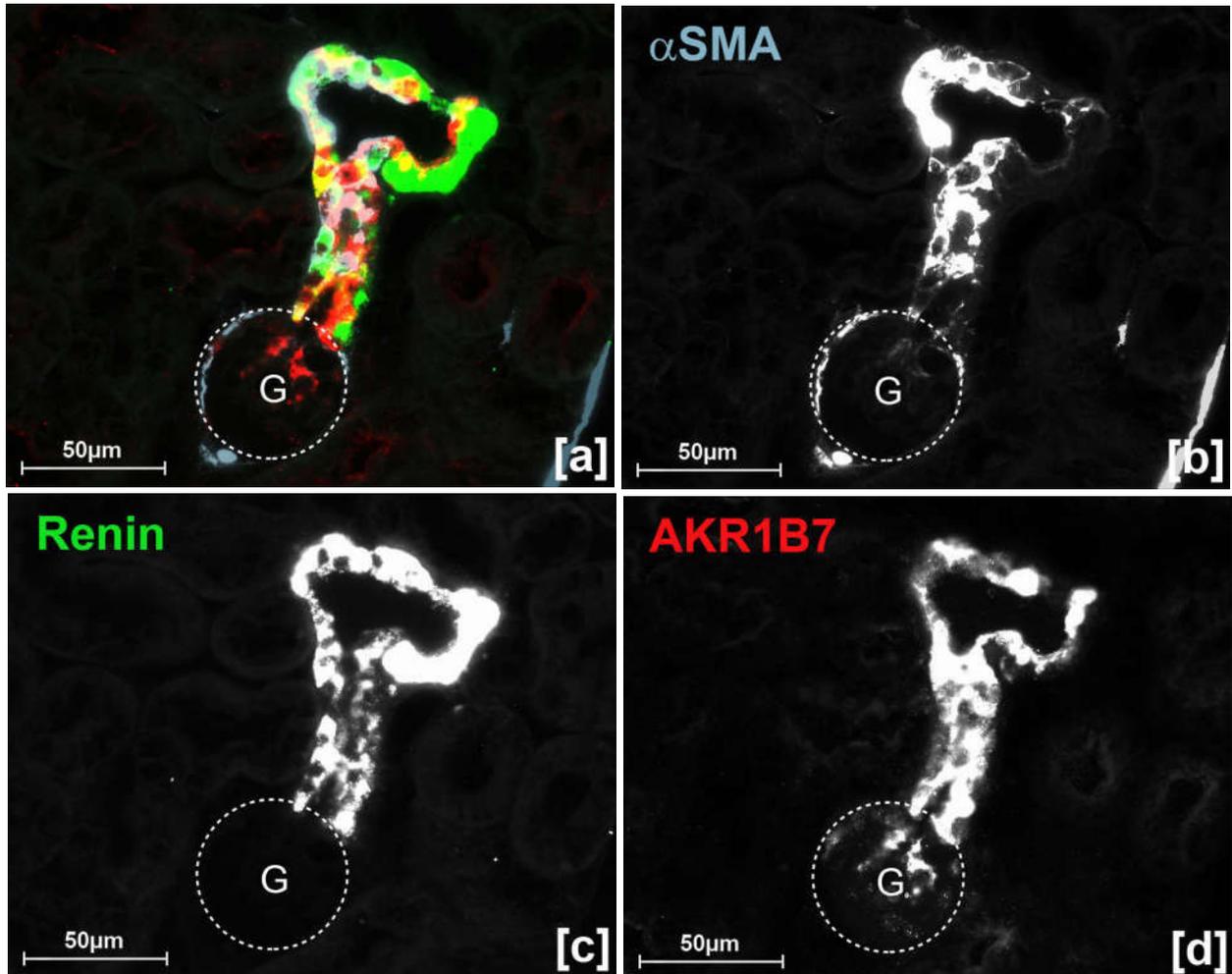


Abbildung 3.16: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Aldosteronsynthase-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. Weitgehende Kolokalisation von Renin und AKR1B7 in der Wand der Interlobulararterie und der afferenten Arteriole. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

In Abb. 3.17 ist ein Glomerulus mit stark erhöhter Reninexpression in der Wand der dazugehörigen afferenten Arteriole ohne relevante begleitende AKR1B7-Expression zu sehen. AKR1B7 kann dabei auch in der mikroskopischen Betrachtung der benachbarten histologischen Schnitte nicht detektiert werden. An manchen Stellen scheinen reninbildende Zellen mehrschichtig angeordnet zu sein und nicht nur innerhalb der Arteriolenwand, sondern auch ihr außen angelagert zu liegen.

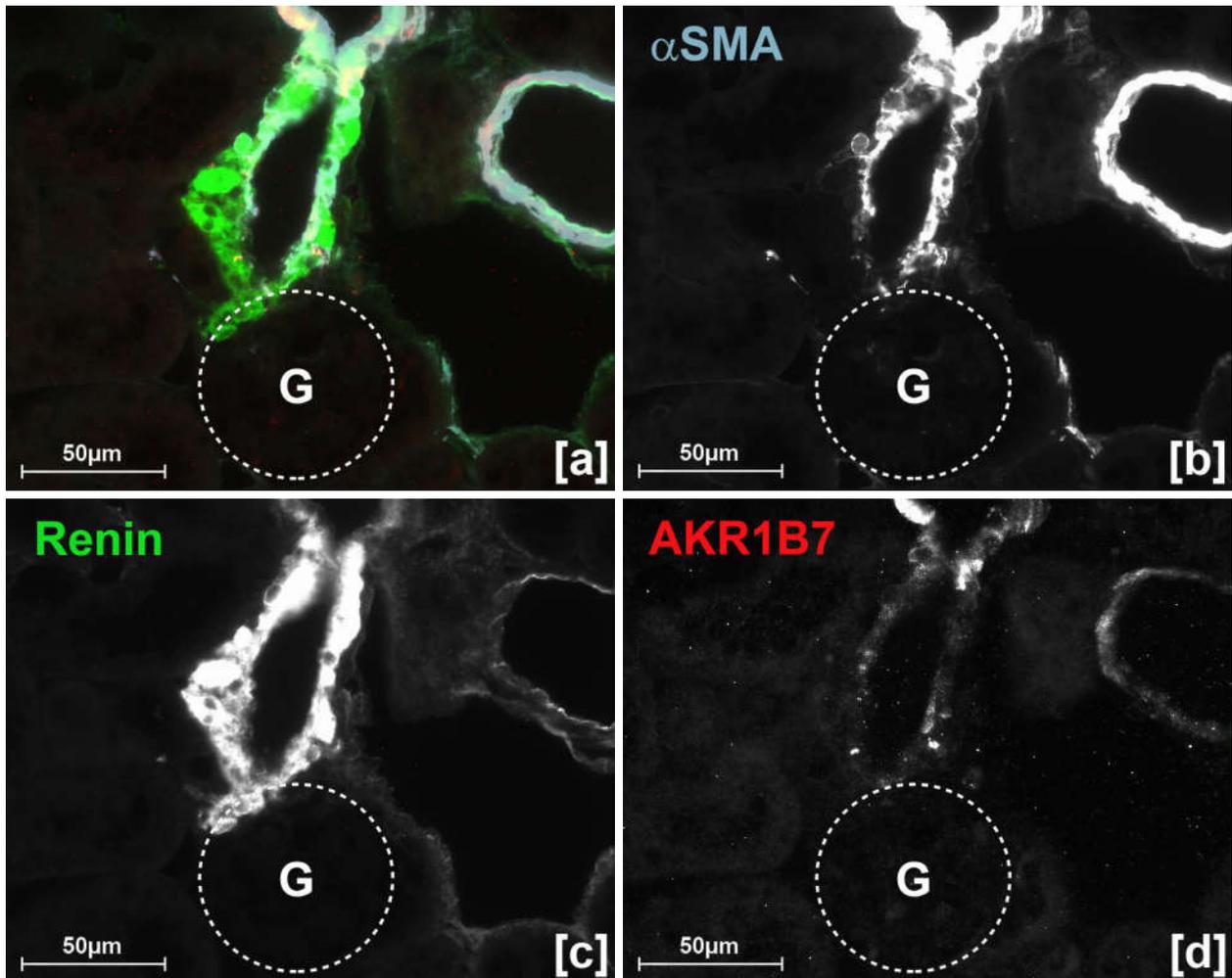


Abbildung 3.17: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Aldosteronsynthase-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. Deutliche Expression von Renin an der juxtaglomerulären Position einer afferenten Arteriole mit lediglich minimaler begleitender AKR1B7-Expression. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

Abb. 3.18 zeigt schließlich ein Mischbild, in dem sowohl eine weitgehende Kolo­kalisierung von Renin und AKR1B7 in juxtaglomerulärer Position der afferenten Arteriole zu erkennen ist, als auch das alleinige Vorkommen von AKR1B7 in der Wand einer Interlobulararterie.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Renin- und AKR1B7-Signale zu einem großen Teil eine Kolo­kalisierung an der typischen juxtaglomerulären Position sowie in anderen Gefäßabschnitten im Rahmen einer ausgeprägten retrograden Rekrutierung zeigen. Teilweise ist nur Renin ohne begleitendes AKR1B7 zu finden, was vor allem die juxtaglomeruläre Position afferenter Arteriolen betrifft. Umgekehrt ist zum Teil nur AKR1B7 ohne begleitendes Renin zu sehen, was überwiegend die Wand größerer Gefäße betrifft.

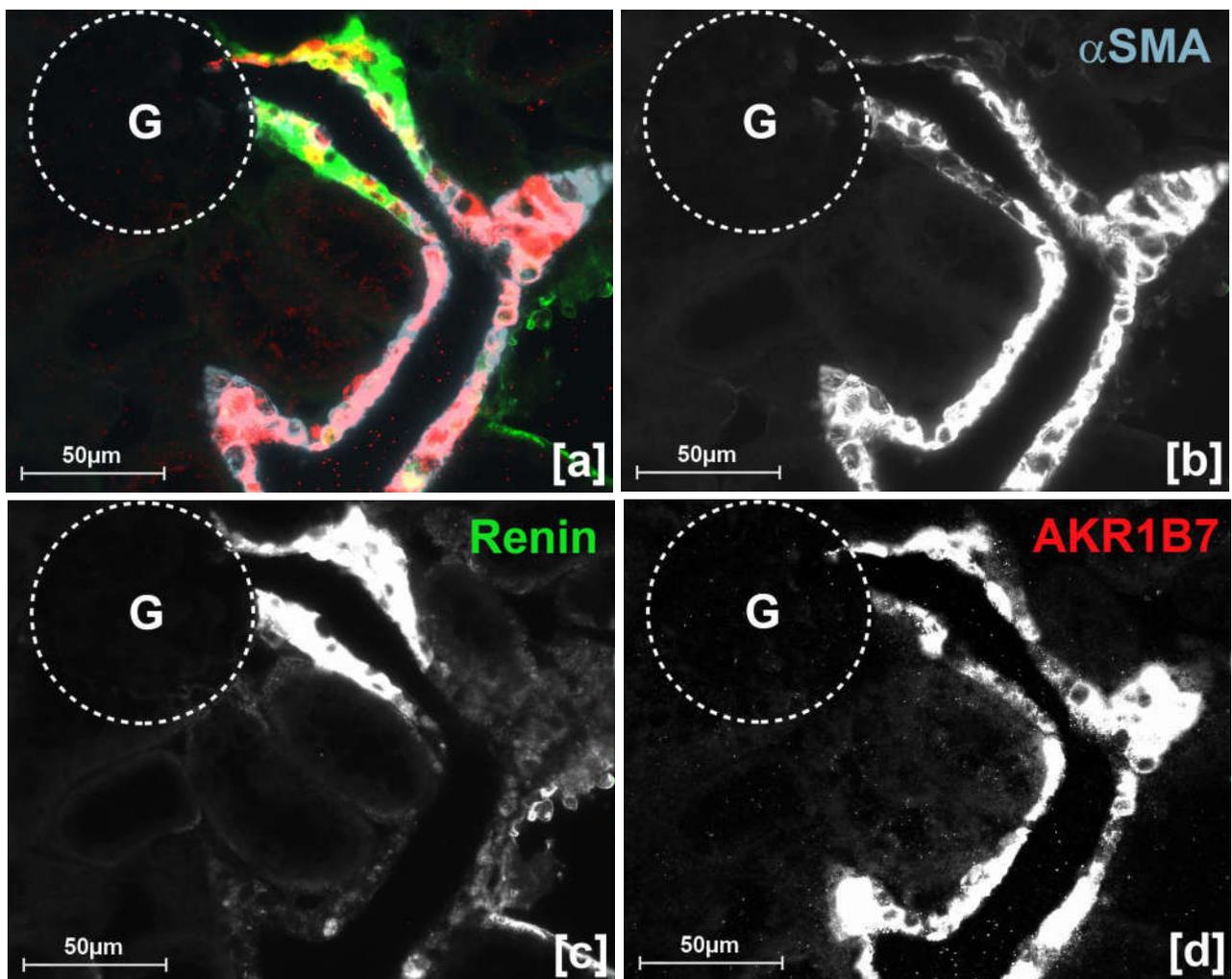


Abbildung 3.18: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. In der Wand der afferenten Arteriole weitgehende Kolo­kalisierung von Renin und AKR1B7, in der Wand der Interlobulararterie alleinige AKR1B7-Expression ohne begleitende Reninexpression. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

3.1.3 Die Connexin40-Knockout-Maus: dreidimensionale und histologische Betrachtung

Das renale Renin- und AKR1B7-Expressionsmuster bei der Cx40-Knockout-Maus wird in den Abb. 3.19 und 3.20 mit Hilfe eines 3D-rekonstruierten Gefäßbaumabschnitts dargestellt. Bei auf den ersten Blick unauffälliger Gefäßarchitektur lässt sich ein deutlich heterogenes und von der Wildtyp-Maus abweichendes Reninexpressionsmuster vorfinden. Die Gesamtmenge an Renin erscheint dabei etwas vermindert. Neben Glomeruli mit annähernd normaler bis verminderter Reninexpression an juxtaglomerulärer Position der afferenten Arteriole sind zum Teil auch komplett reninfreie afferente Arteriolen sowie ektop lokalisierte Reninansammlungen zu erkennen. Diese ektople Lage betrifft efferente Arteriolen und perivaskuläres Gewebe im Bereich von Glomeruli, am ehesten das zwischen afferenter und efferenter Arteriole liegende extraglomeruläre Mesangium. An anderen Stellen des Interstitiums, in Interlobulararterien und arcuaten Seitenast ist kein Renin zu erkennen.

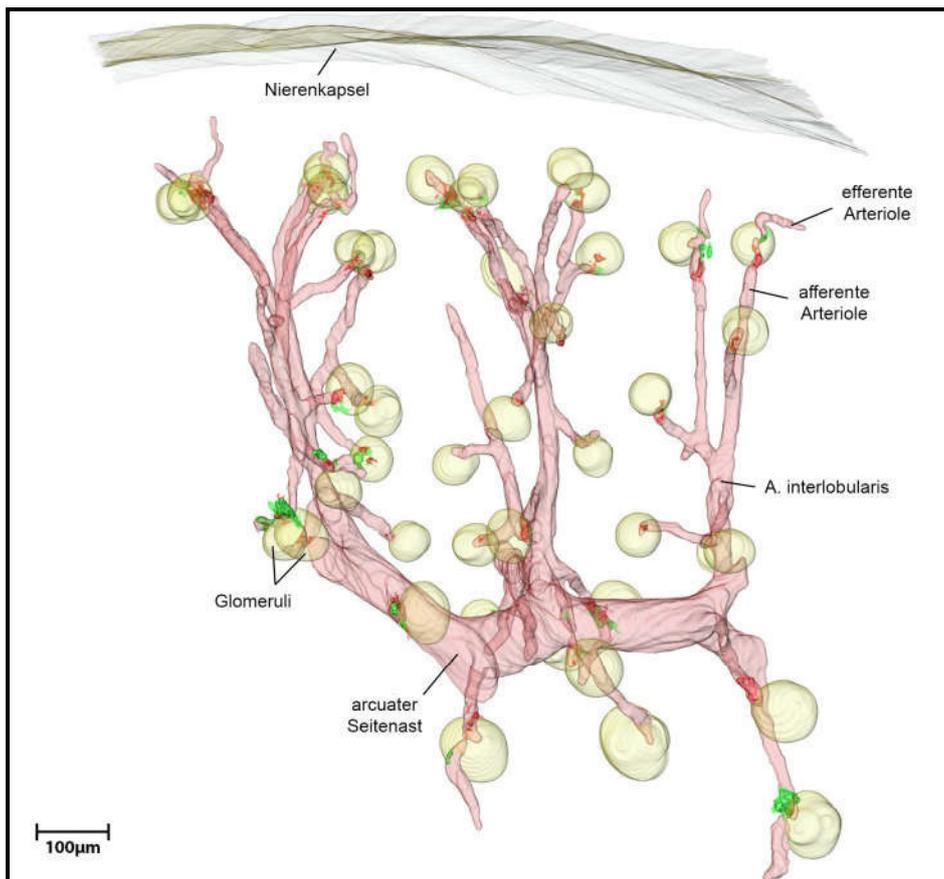


Abbildung 3.19: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa), Renin- (grün) und AKR1B7- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb).

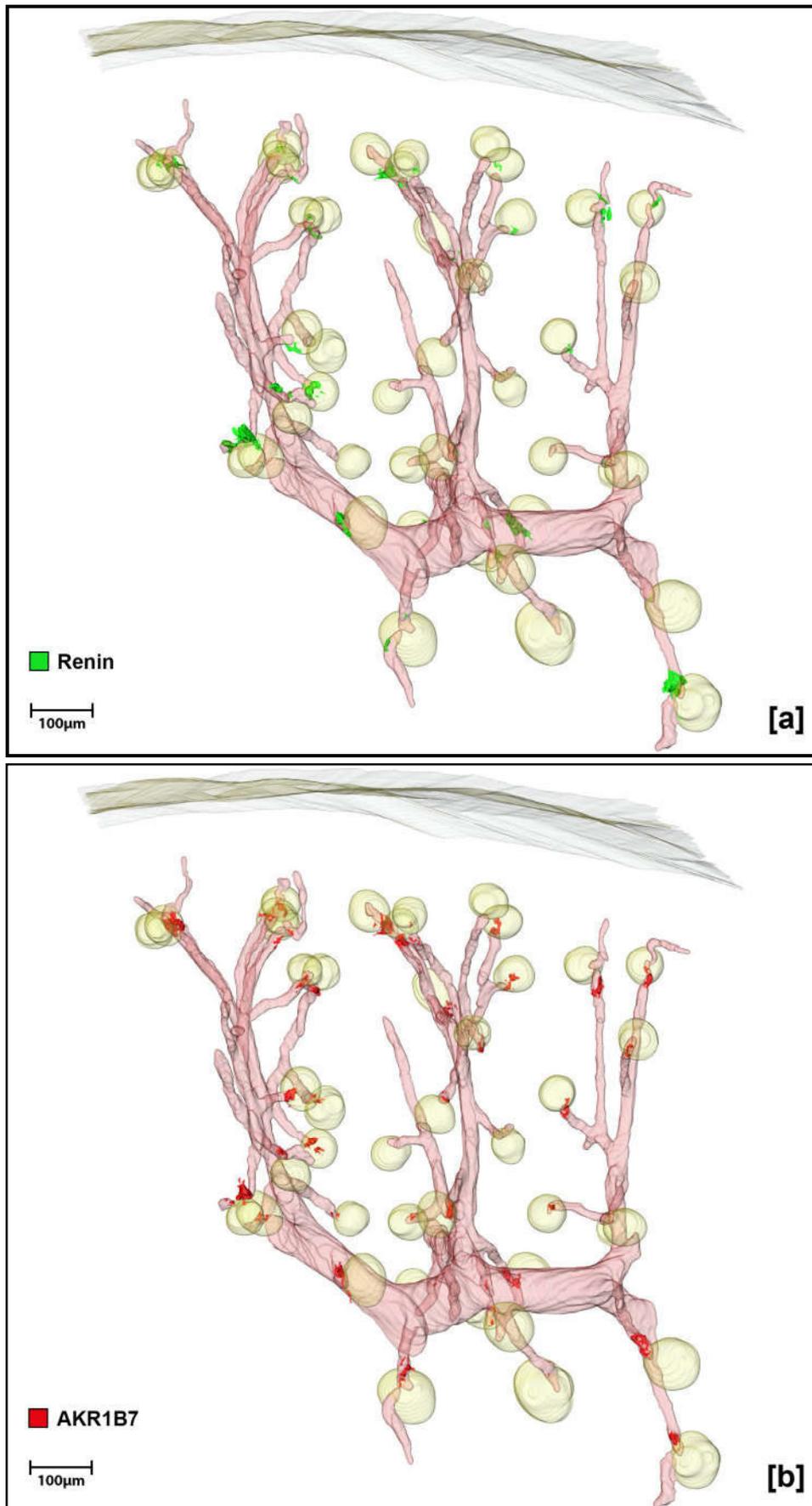
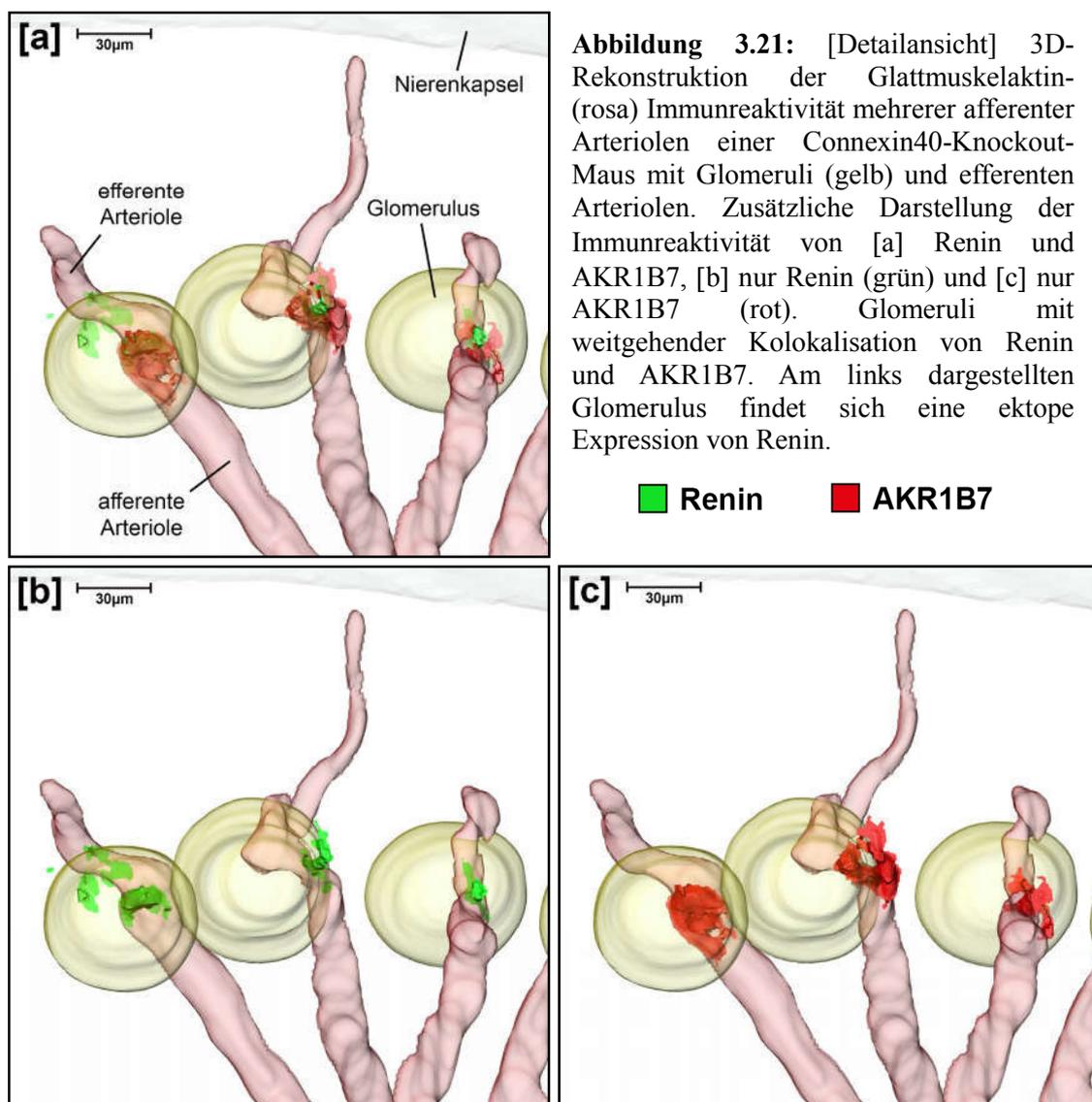


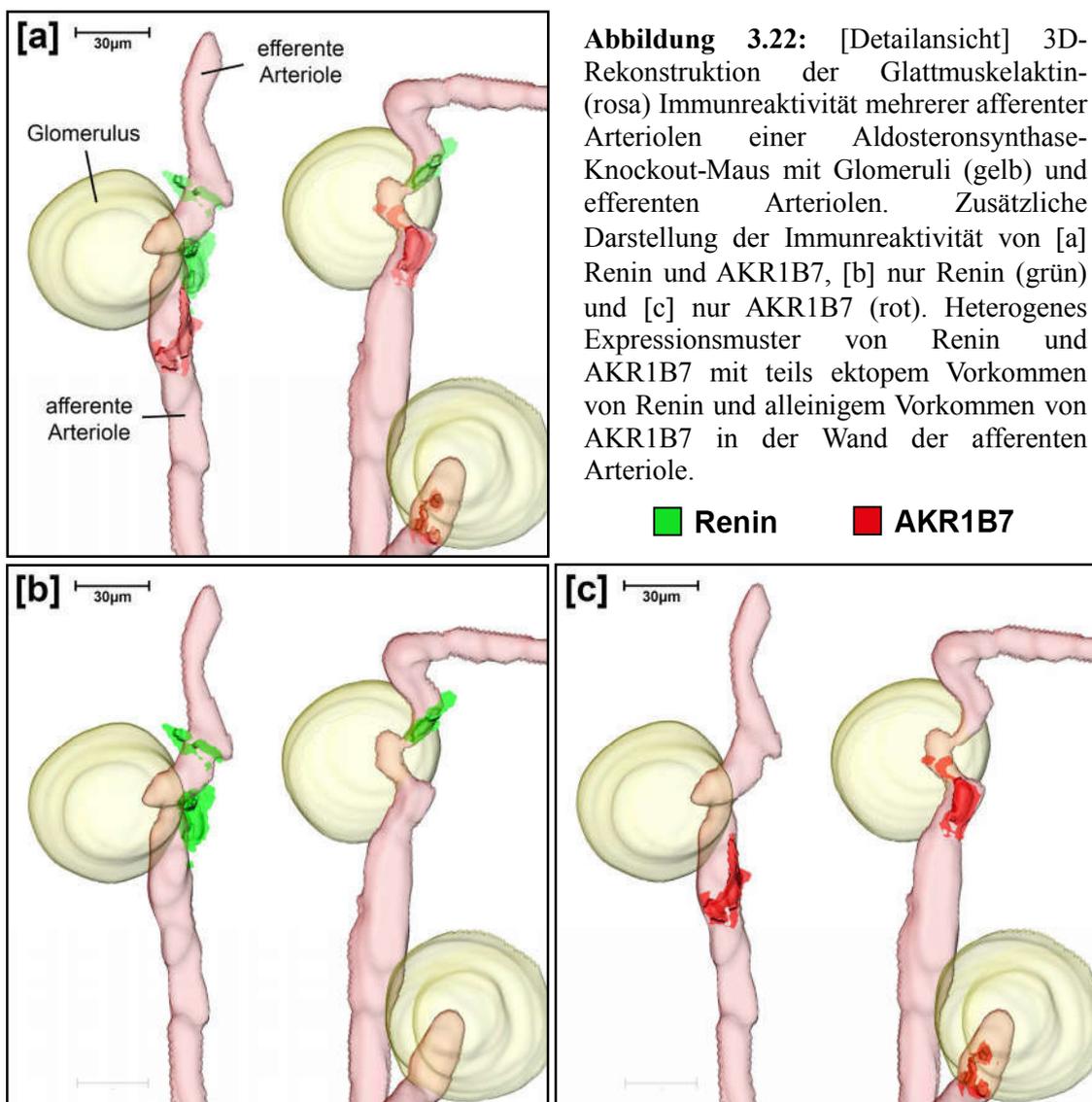
Abbildung 3.20: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb). Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin- (grün) bzw. [b] AKR1B7 (rot).

Das Immunfluoreszenzsignal von AKR1B7 zeigt ein davon leicht abweichendes Muster. Das Protein lässt sich häufig in juxtaglomerulärer Position afferenter Arteriolen nachweisen und kommt dort entweder mit Renin kolokalisiert vor oder zeigt eine von Renin abweichende (meist etwas erhöhte) Menge und Lokalisation innerhalb der Wand der afferenten Arteriole. Mitunter lässt es sich dort ganz ohne begleitendes Renin nachweisen. Insgesamt liegt bei etwa einem Drittel der untersuchten Glomeruli eine weitreichende Kolokalisation von Renin und AKR1B7 vor. Bei einem weiteren Drittel sind deutliche Unterschiede in Menge und Lokalisation beider Proteine innerhalb der Wand der afferenten Arteriole vorzufinden. Die meisten der restlichen Glomeruli zeigen unterschiedlich große AKR1B7-Ansammlungen ohne begleitende Reninexpression. An einigen wenigen Glomeruli fehlen beide Proteine komplett.



Die Heterogenität der Renin- und AKR1B7-Verteilung in der Niere der Cx40-Knockout-Maus wird anhand zweier Detailansichten verdeutlicht. Abb. 3.21 zeigt drei benachbarte Glomeruli, innerhalb derer zwar die AKR1B7-Menge höher als die Reninmenge ausfällt, die aber nichtsdestotrotz einen relativ hohen Grad an Kolokalisation beider Proteine aufweisen. An einem der Glomeruli ist Renin darüber hinaus in der Wand der efferenten Arteriole sowie periglomerulär zwischen afferenter und efferenter Arteriole nachweisbar, was einer ektopten Lage entspricht.

An den drei Glomeruli aus Abb. 3.22 ist dagegen überhaupt keine Kolokalisation von Renin und AKR1B7 festzustellen. An zwei der Glomeruli sind physiologisch lokalisierte AKR1B7-Ansammlungen sowie ektopt lokalisierte Reninansammlungen im Bereich der efferenten Arteriole sowie des extraglomerulären Mesangiums erkennbar. Am dritten Glomerulus ist ebenfalls AKR1B7 in typischer juxtaglomerulärer erkennbar, hier jedoch komplett ohne begleitende reninpositive Bereiche.



Ein ähnlich heterogenes Bild ergibt sich bei der mikroskopisch-histologischen Betrachtung. Abb. 3.23 präsentiert einen typischen Ausschnitt mit mehreren Glomeruli. Der rote Pfeil markiert einen Glomerulus mit physiologisch lokalisiertem AKR1B7-Immunfluoreszenzsignal und eindeutig ektope liegenden, ausgeprägten Reninansammlungen. Der weiße Pfeil kennzeichnet einen Glomerulus mit erkennbarer Kolokalisation von Renin und AKR1B7 und der gelbe Pfeil einen Glomerulus mit AKR1B7-Signal, jedoch ohne erkennbares dazugehöriges Reninsignal. Ein solches konnte an diesem Glomerulus auch bei Betrachtung der benachbarten Schnitte nicht detektiert werden.

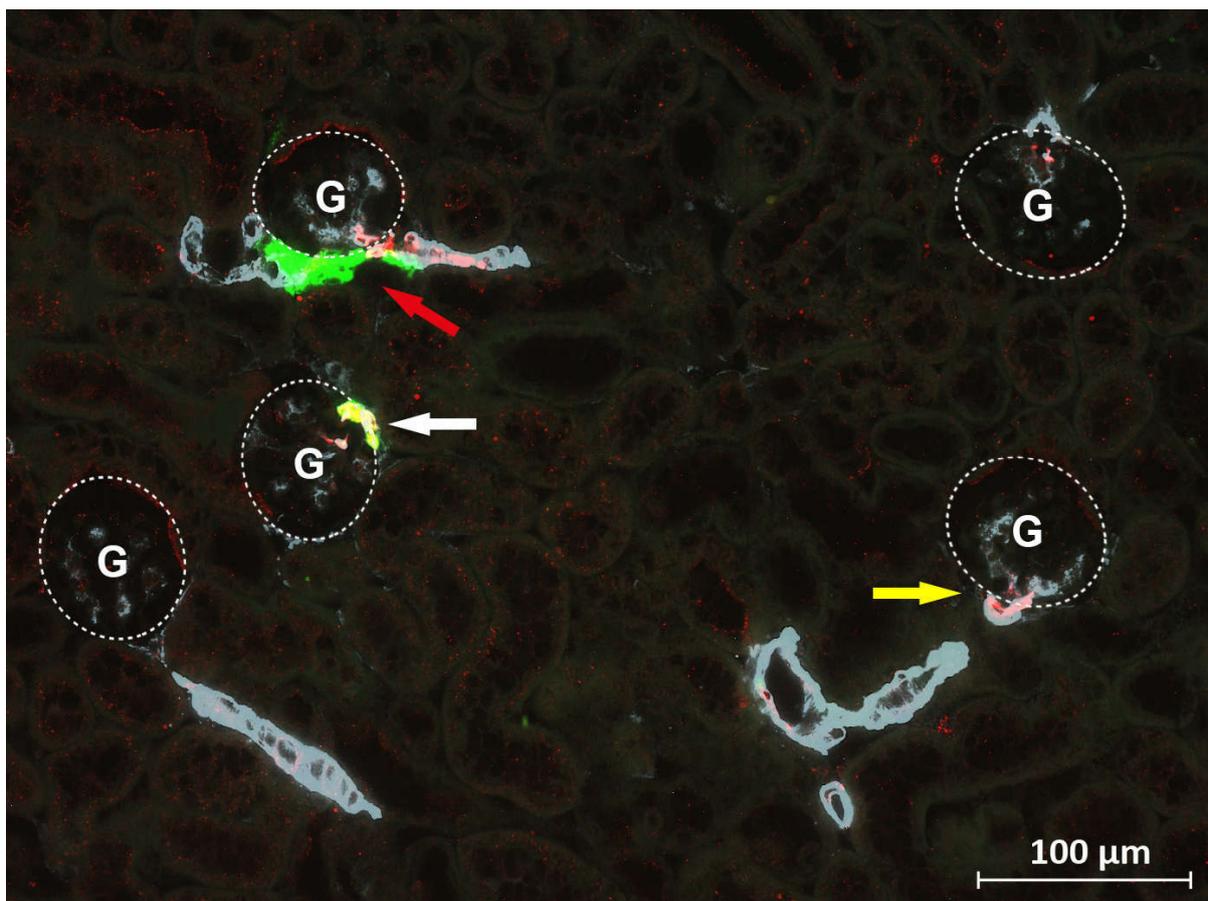


Abbildung 3.23: [Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (rot), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weißer Pfeil: Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). Roter Pfeil: Ektope Reninexpression im periglomerulären Mesangium sowie der Wand der efferenten Arteriole. Gelber Pfeil: Alleinige AKR1B7-Expression ohne begleitende Reninexpression. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.

Zwei Detailaufnahmen (Abb. 3.24 und 2.25) verdeutlichen mittels getrennter Kanaldarstellung die Variabilität der Renin- und AKR1B7-Expression innerhalb der Cx40-Knockout-Maus. Abb. 3.24 zeigt einen Glomerulus mit partieller Kolokalisation von Renin und AKR1B7 bei im Vergleich zur Reninmenge deutlich erhöhter AKR1B7-Menge. Beim in Abb. 3.25 dargestellten Glomerulus sind Renin und AKR1B7 an der typischen juxttaglomerulären Position der afferenten Arteriole weitgehend kolokalisiert. Es ist jedoch ein weiteres Reninsignal zu sehen, das im Bereich des extraglomerulären Mesangiums zwischen afferenter und efferenter Arteriole lokalisiert ist.

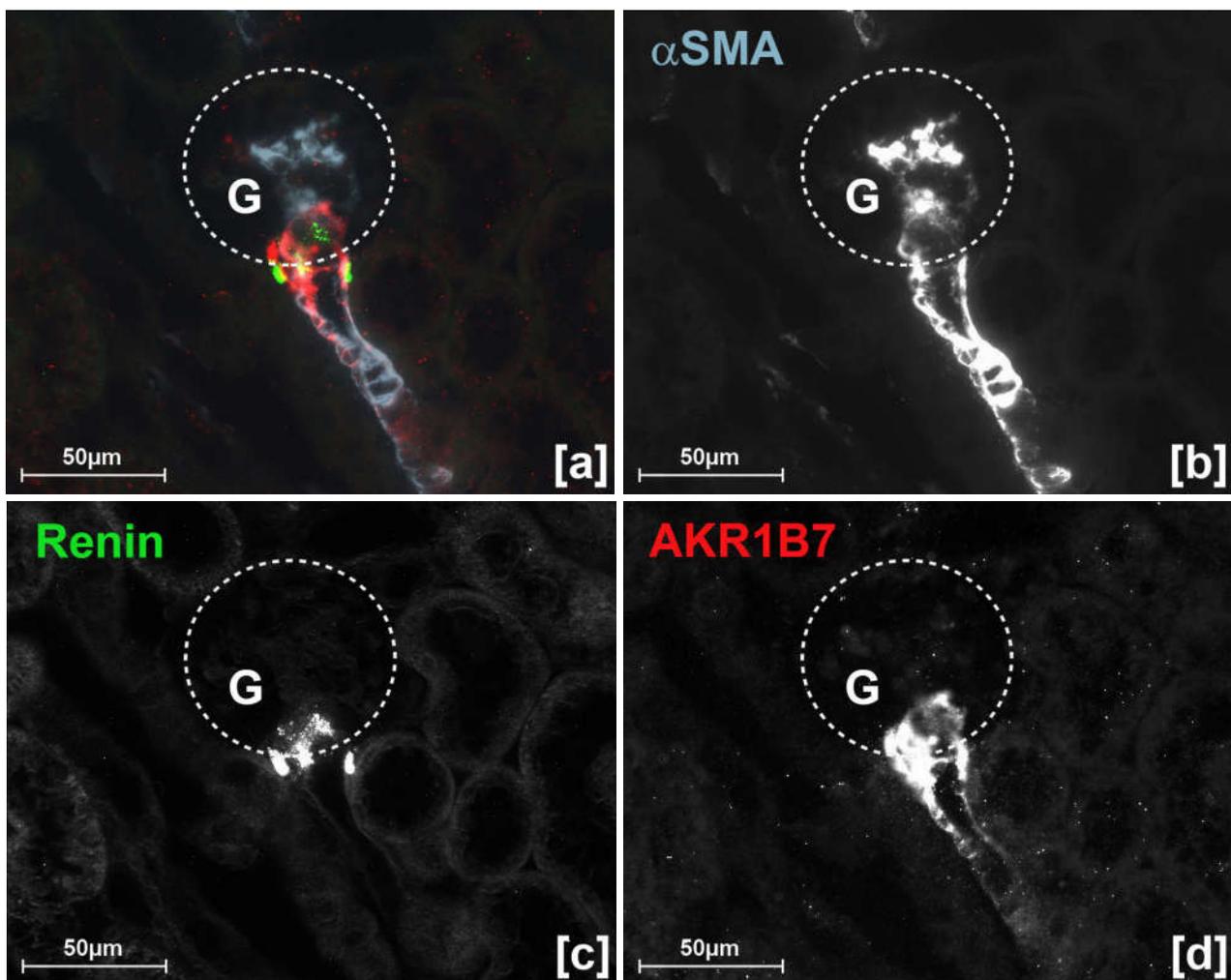


Abbildung 3.24: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. Partielle Kolokalisation von Renin und AKR1B7 an der juxttaglomerulären Position der afferenten Arteriole bei im Vergleich zur Reninmenge deutlich höherer AKR1B7-Menge. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

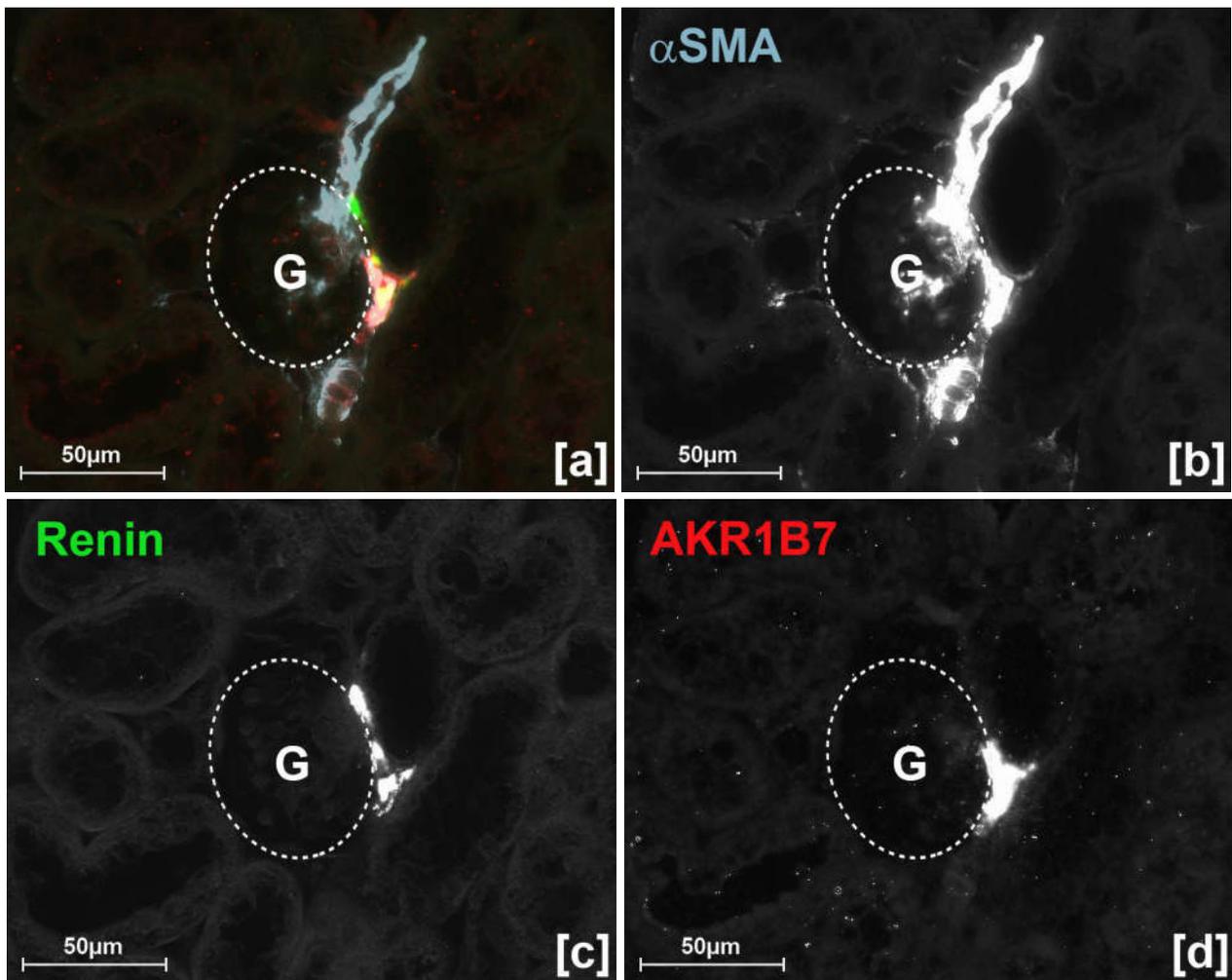


Abbildung 3.25: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. Weitgehende Kolokalisation von Renin und AKR1B7 an der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriole und alleiniges Vorkommen von Renin zwischen afferenter und efferenter Arteriole. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

Insgesamt legen die Beobachtungen nahe, dass AKR1B7 an der juxtaglomerulären Position fast jeder Arteriole lokalisiert ist und dort im Falle von gleichzeitig vorhandenem Renin eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Kolokalisation mit Renin zeigt. Ektop lokalisierte Reninansammlungen sind dagegen ausnahmslos ohne begleitendes AKR1B7 zu finden.

3.1.4 Die AKR1B7-Knockout-Maus

3.1.4.1 Die AKR1B7-Knockout-Maus unter Normalsalzdiät [NS]: dreidimensionale und histologische Betrachtung

Beim Vergleich der Gefäßbäume der AKR1B7-Knockout-Maus unter Normalkost und der Wildtyp-Maus unter Normalkost ergeben sich in Bezug auf Menge und Lokalisation von Renin keine relevanten Unterschiede. An jedem Glomerulus sind in typischer juxtaglomerulärer Position reninpositive Zellen zu finden. Im arcuaten Seitenast, den Interlobulararterien und den efferenten Arteriolen ist keine Reninexpression nachweisbar (Abb. 3.26 und 3.27).

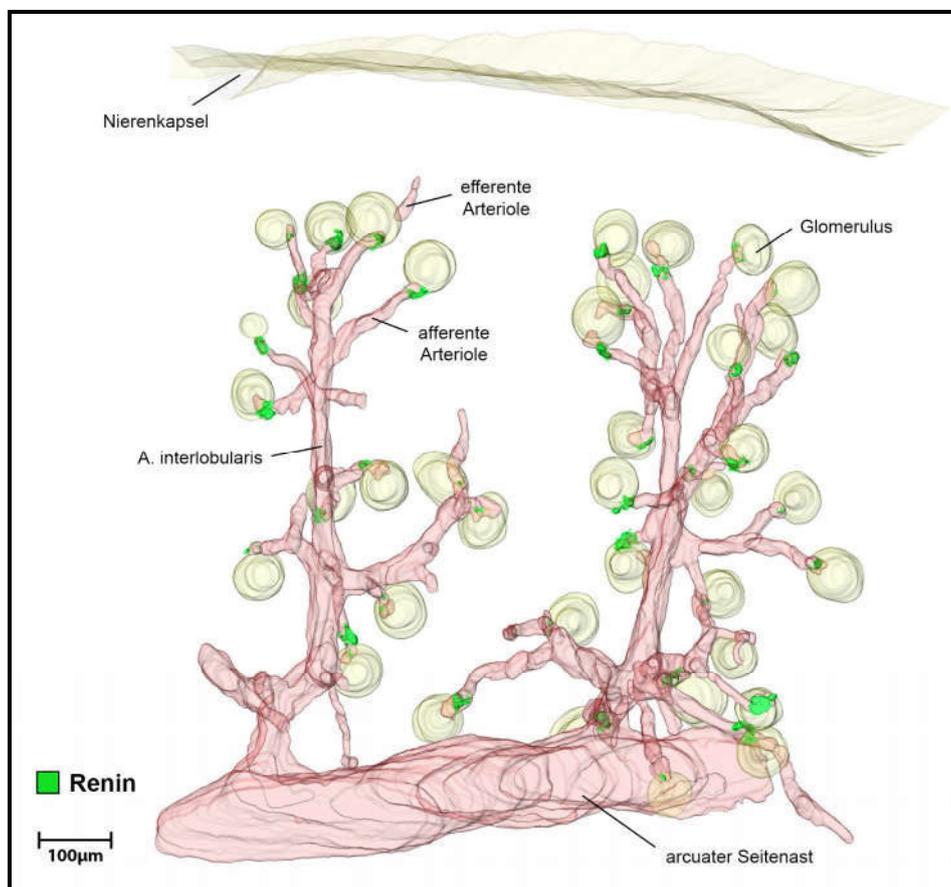


Abbildung 3.26: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) und Renin- (grün) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS] mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb).

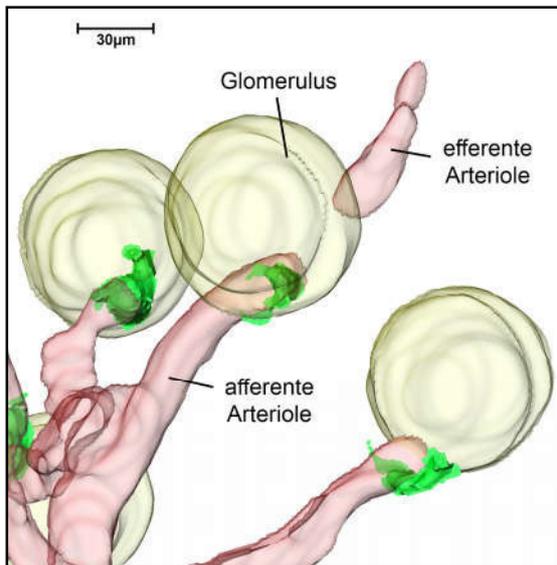


Abbildung 3.27: [Detailansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) und Renin- (grün) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS] mit Glomeruli (gelb) und einer efferenten Arteriole.

■ Renin

Diese Erkenntnisse bestätigen sich in der mikroskopisch-histologischen Untersuchung. Jede afferente Arteriole zeigt in unmittelbarer Nähe des glomerulären Gefäßpols ein Immunfluoreszenzsignal von Renin, während die restlichen Strukturen innerhalb und außerhalb der Gefäße reninfrei sind (Abb. 3.28).

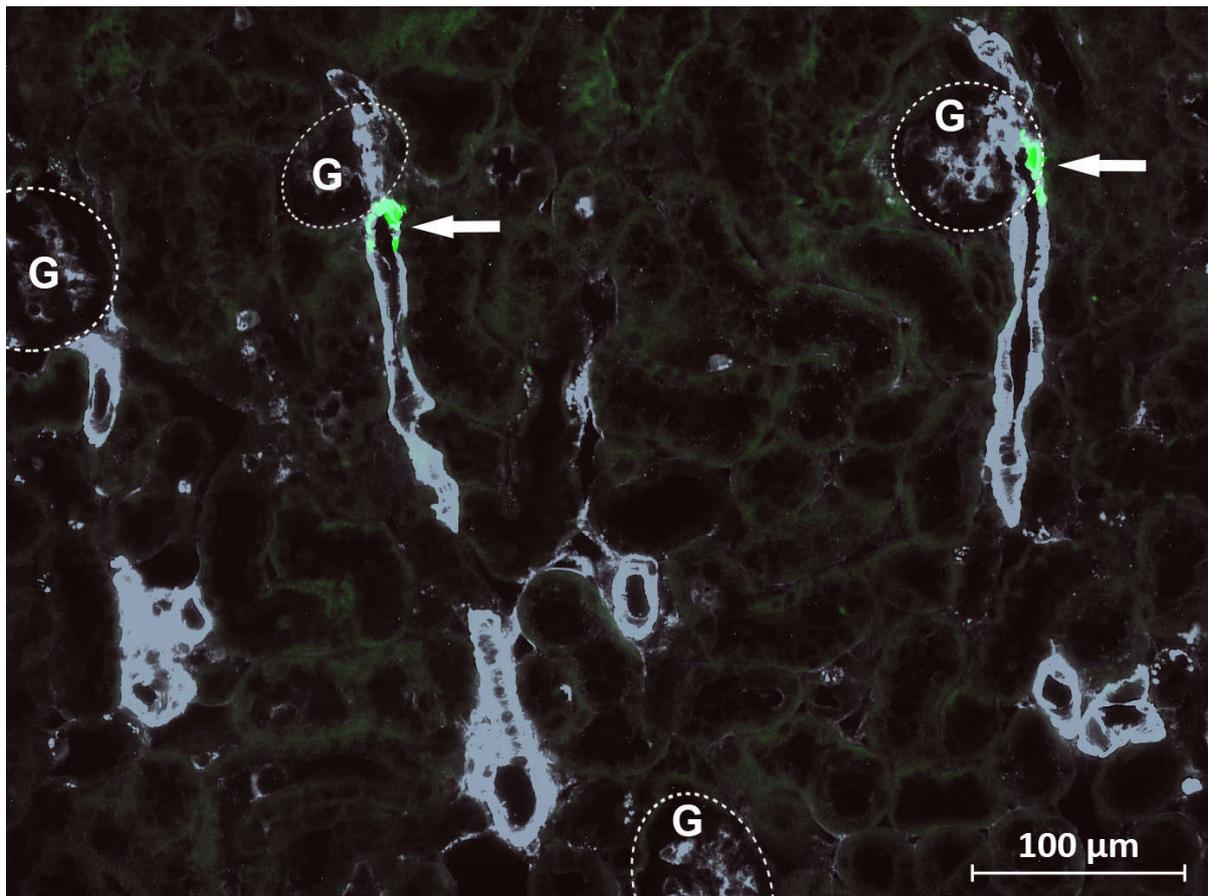


Abbildung 3.28: [Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau) und Renin (grün). Weiße Pfeile: Lokalisation der Immunreaktionen von Renin an der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.

In den Detailaufnahmen sind die kuboiden reninbildenden JG-Zellen zu erkennen, die in der Wand der afferenten Arteriole lokalisiert sind, eine regelrechte Morphologie besitzen sowie ein begleitendes Glattmuskelaktin-Immunfluoreszenzsignal aufweisen (Abb. 3.29).

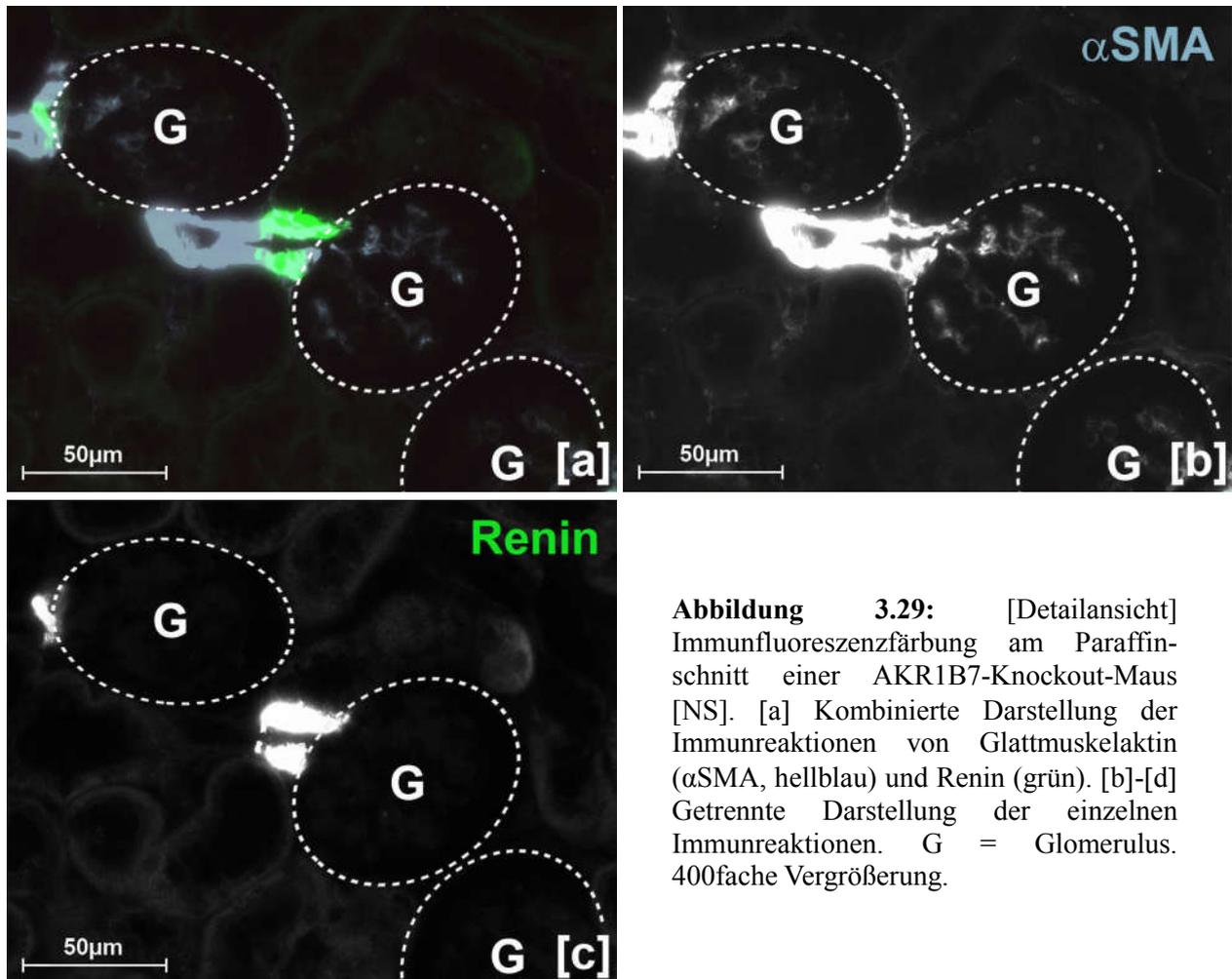


Abbildung 3.29: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau) und Renin (grün). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

3.1.4.2 Die AKR1B7-Knockout-Maus nach 10d Hochsalzdiät: histologische Betrachtung

In den mikroskopisch-histologischen Aufnahmen der AKR1B7-Knockout-Maus unter Hochsalzdiät sind im Vergleich zur Wildtyp-Maus unter Hochsalzdiät keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Reninexpression festzustellen. Wie auch bei der Wildtyp-Maus bewirkt hier die Suppression des RAAS durch die vermehrte Salzzufuhr eine Minderung der Reninmenge bei unveränderter Reninlokalisierung. Die reninpositiven Bereiche sind unter Hochsalzdiät deutlich kleiner als unter Normalkost und ausschließlich an der juxtaglomerulären Position, nicht jedoch in anderen vaskulären oder extravaskulären Strukturen zu sehen.

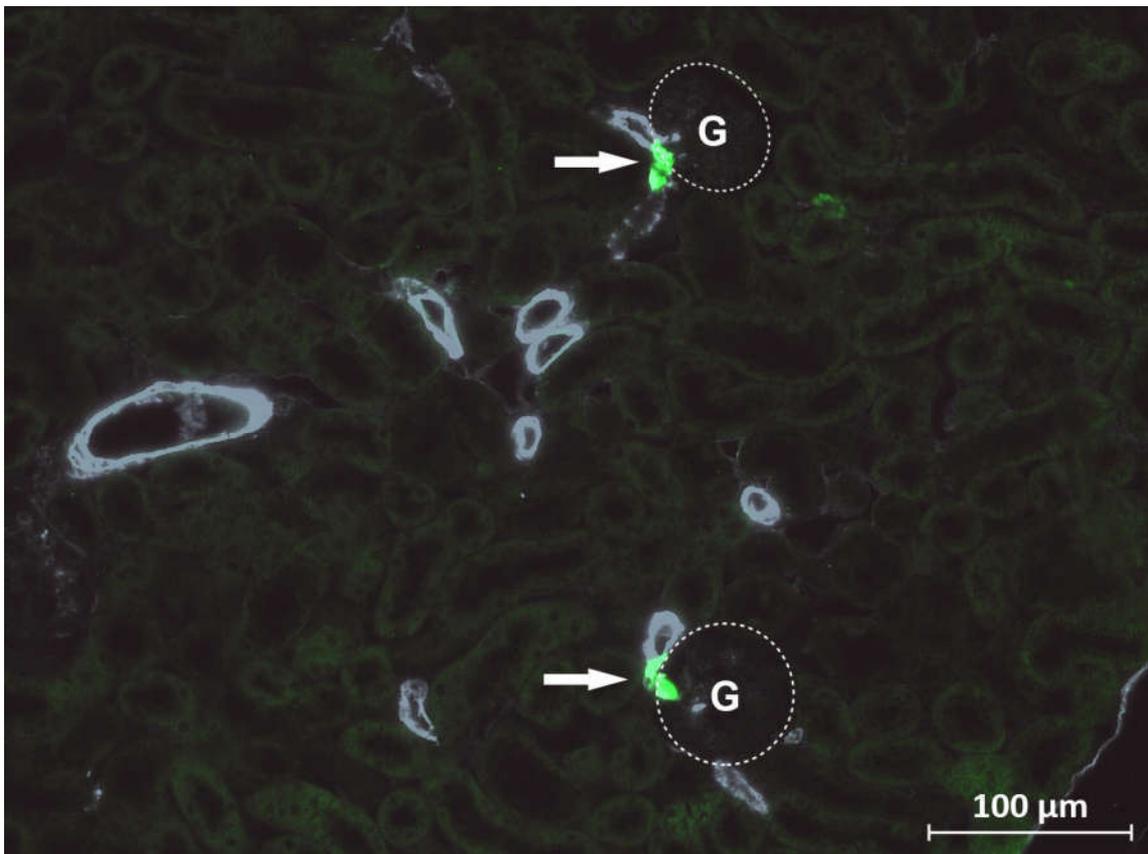


Abbildung 3.30: [Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [HS]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau) und Renin (grün). Weiße Pfeile: Lokalisation der Immunreaktionen von Renin an der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.

Die nachfolgenden Detailaufnahmen zeigen einen reninpositiven Bereich am glomerulären Gefäßpol. Die Morphologie der reninbildenden Zellen in der Wand der afferenten Arteriole ist unverändert und stellt sich kuboid dar. Es ist eine Koexpression von Glattmuskelaktin und Renin festzustellen (Abb. 3.31).

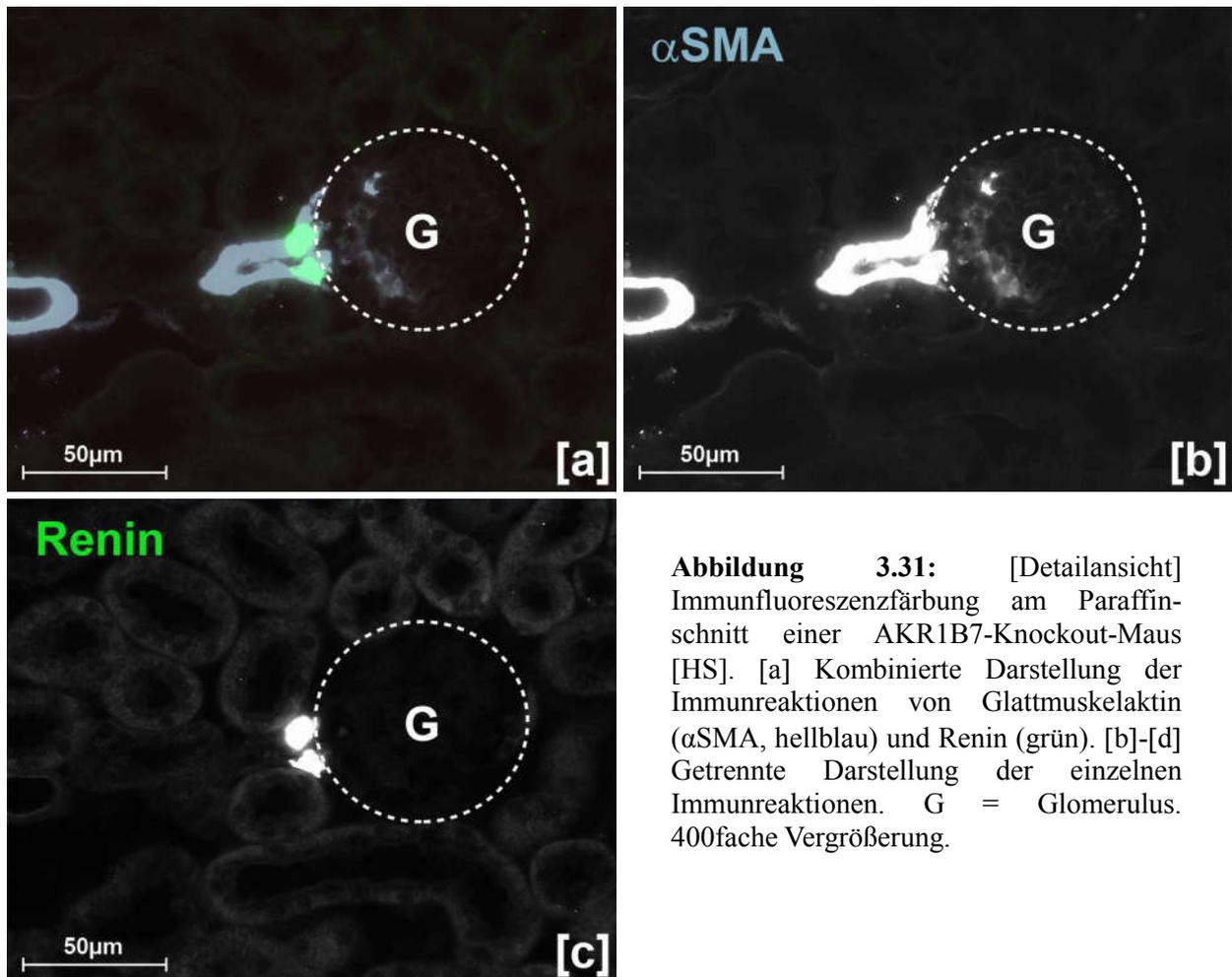


Abbildung 3.31: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [HS]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau) und Renin (grün). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

3.1.4.3 Die AKR1B7-Knockout-Maus nach 10d Niedrigsalzdiät und 7d Enalapril: histologische Betrachtung

Die mikroskopischen Aufnahmen der AKR1B7-Knockout-Maus nach Niedrigsalzdiät und Behandlung mit Enalapril demonstrieren die Veränderungen der Reninexpression nach Stimulation des RAAS bei diesem Maustyp. Analog zur Wildtyp[LS/E]-Maus zeigt die AKR1B7-Knockout-Maus eine kontinuierliche retrograde Rekrutierung reninbildender Zellen entlang der Wand der afferenten Arteriole. Das Ausmaß der Rekrutierung ist mit dem der Wildtyp[LS/E]-Maus vergleichbar – trotz vermehrter Anzahl der reninpositiven Zellen enthält jeweils nur ein kleiner Abschnitt einer afferenten Arteriole Renin. Andere Gefäßabschnitte (arcuate Haupt- und Seitenäste, Interlobulararterien, efferente Arteriolen) imponieren reninfrei (Abb. 3.32).

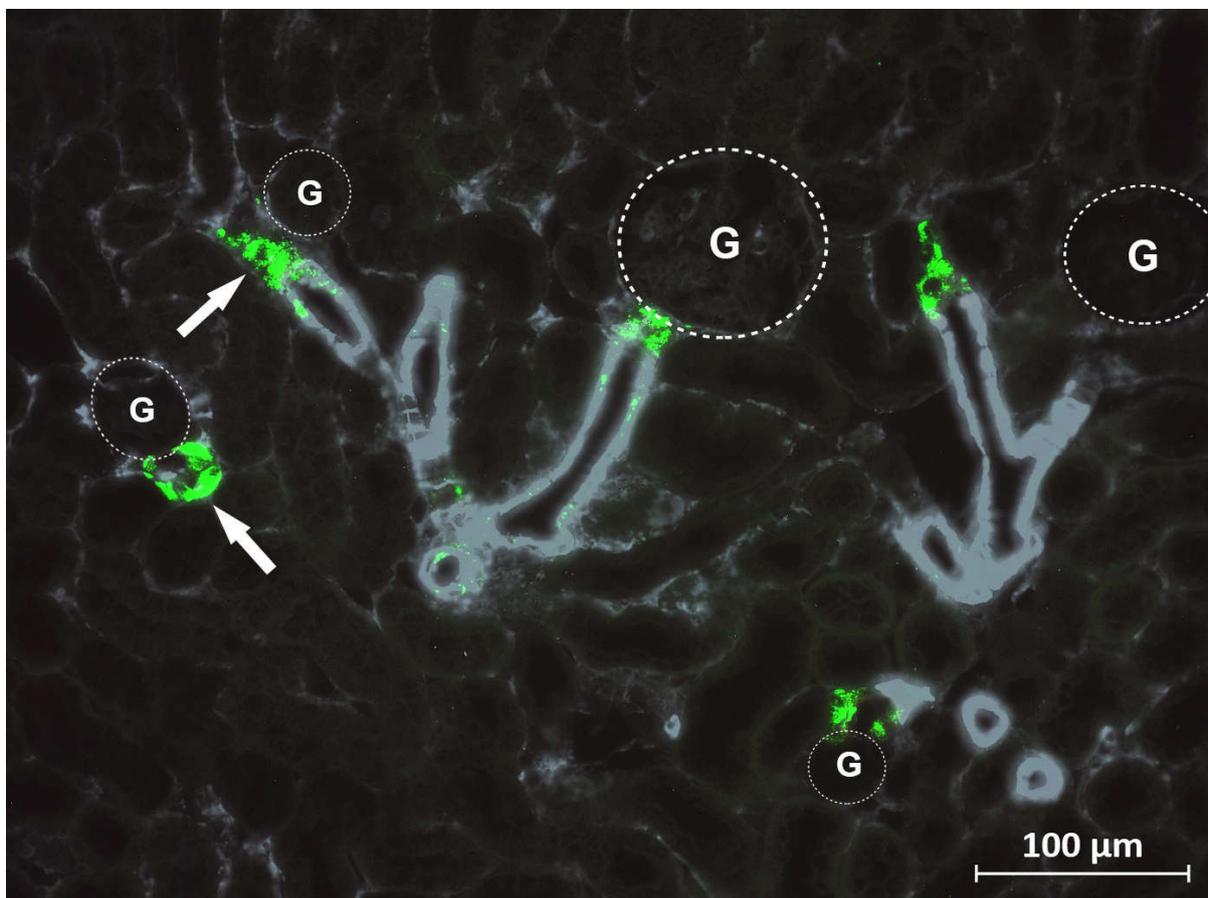


Abbildung 3.32: [Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [LS/E]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau) und Renin (grün). Weiße Pfeile: Lokalisation der Immunreaktionen von Renin an der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.

In der histologischen Detailansicht präsentiert sich eine Kolo-kalisation von Glattmuskelaktin und Renin in den rekrutierten Zellen über einen langen Abschnitt einer afferenten Arteriole. Das Ausmaß der Rekrutierung entspricht in etwa dem Ausmaß der Renin- und AKR1B7-Zunahme in der Wildtyp-Maus unter Nidrigsalzdiät und Enalapril (Abb. 3.33).

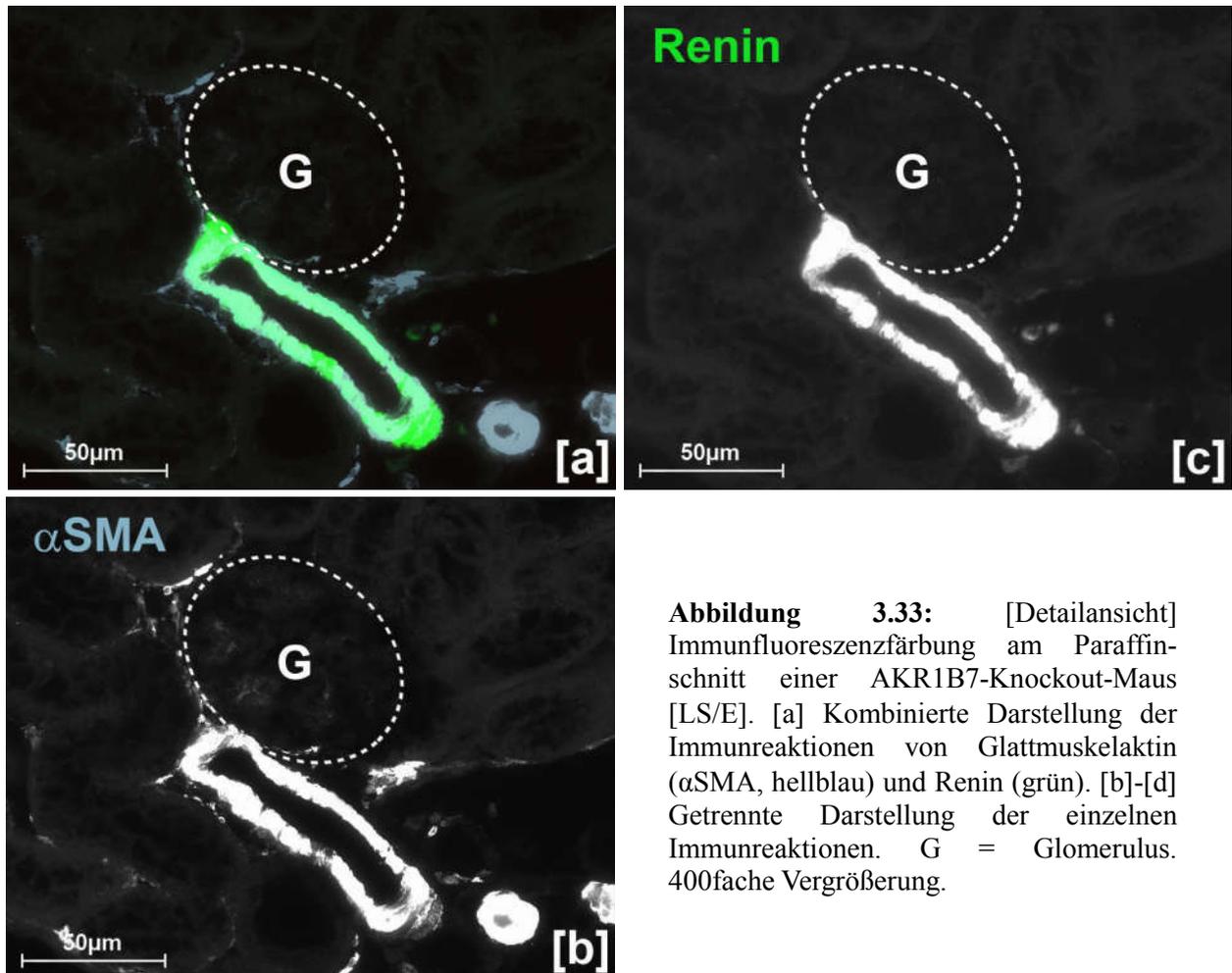


Abbildung 3.33: [Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [LS/E]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau) und Renin (grün). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

3.2 Dreidimensionale Betrachtung der Gefäßarchitektur

3.2.1 Die Wildtyp-Maus unter Normalsalzdiät [NS]

In Abb. 3.34 ist ein Gefäßbaumabschnitt einer unstimulierten Wildtyp-Maus dargestellt, der als Referenz für die nachfolgende Analyse des Gefäßbaums der AKR1B7-Knockout-Maus dienen soll. Zu sehen ist ein arcuater Seitenast mit Interlobulararterien und daraus hervorgehenden afferenten Arteriolen. Exemplarisch sind auch einige efferente Arteriolen dargestellt.

Dieser Gefäßbaum stellt den physiologischen Normalzustand der Gefäßarchitektur in der Niere dar. Die Gefäße sind gleichmäßig geformt und schlank.

Um den optischen Eindruck der Gefäßmorphologie zu objektivieren, wurden die Gefäße mit Hilfe des 3D-Rekonstruktionsprogramms Amira ausgemessen. Dafür wurden die Länge und der Durchmesser der kortikalen afferenten Arteriolen erfasst. Dabei ergab sich für die afferenten Arteriolen der Wildtyp-Maus eine durchschnittliche Länge von 95,23 μm und ein durchschnittlicher Durchmesser von 19,75 μm .

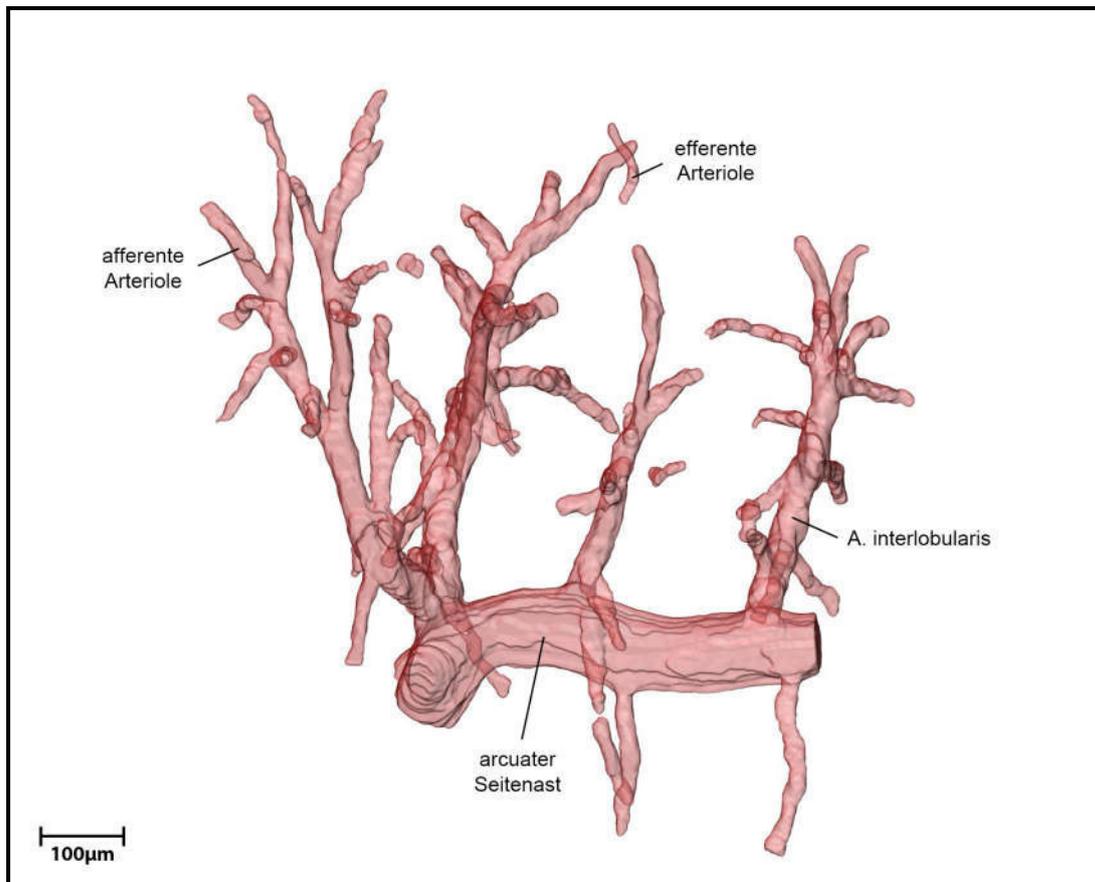


Abbildung 3.34: [Gesamtansicht]: 3D-Rekonstruktion der Glattemuskulatur-Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Wildtyp-Maus [NS].

3.2.2 Die AKR1B7-Knockout-Maus unter Normalsalzdiät [NS]

Der in Abb. 3.31 dargestellte Gefäßbaumabschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus scheint auf den ersten Blick eine regelrechte Morphologie zu besitzen. Der Verlauf der Gefäße und deren schlanke, gleichmäßige Form erscheinen unauffällig und ähneln denen der Wildtyp-Maus.

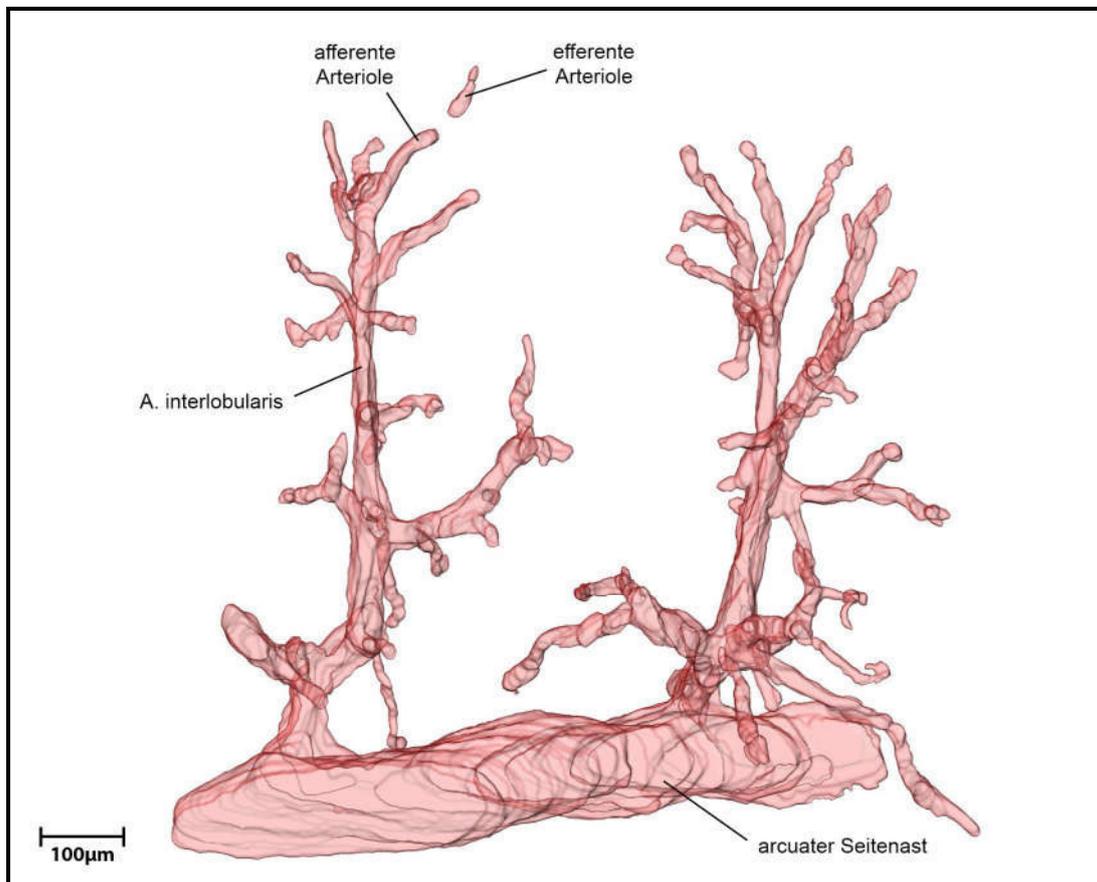


Abbildung 3.35: [Gesamtansicht]: 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin-Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS].

Die Vermessung der kortikalen afferenten Arteriolen ergibt bei der AKR1B7-Knockout-Maus eine mittlere Länge von 83,50 μm und einen mittleren Durchmesser von 17,77 μm . Der Vergleich der Messwerte von AKR1B7-Knockout- und Wildtyp-Maus ist in Abb. 3.36 dargestellt. Dabei ergibt sich hinsichtlich beider Parameter kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen.

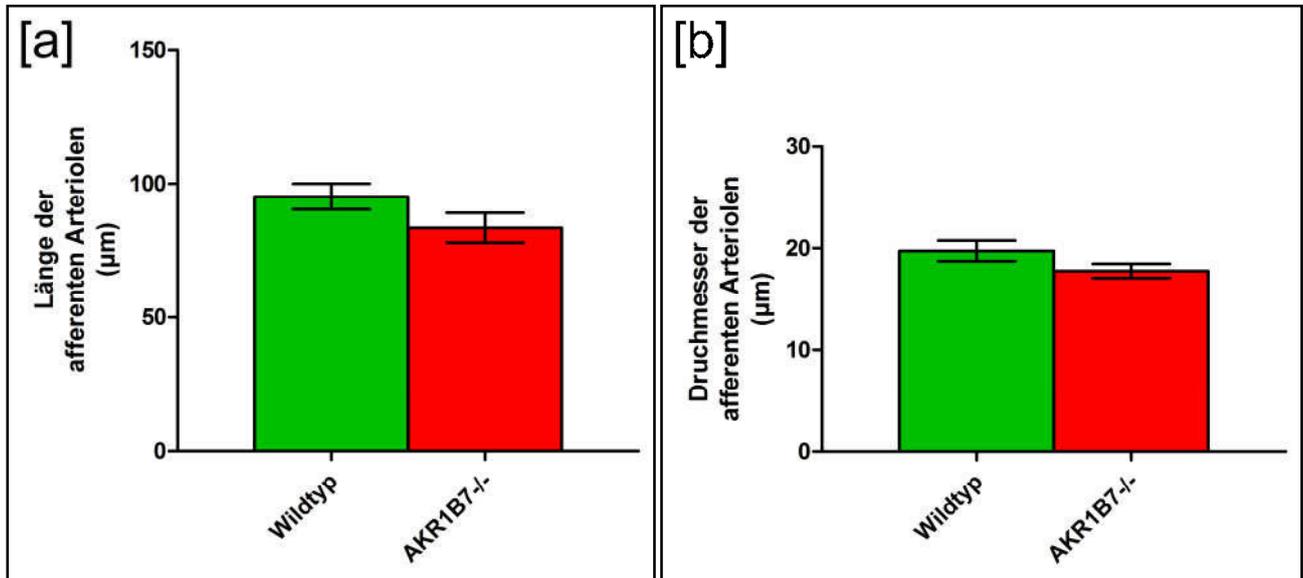


Abbildung 3.36: Graphische Gegenüberstellung [a] der mittleren Länge und [b] des mittleren Durchmessers afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AKR1B7-Knockout-Maus.

3.3 Quantitative Analyse der Reninexpression

Für die quantitative Analyse der Reninexpression erfolgte ein Vergleich des Renin-mRNA-Levels der Wildtyp- und der AKR1B7-Knockout-Mäuse jeweils für drei Diätgruppen ([NS], [HS], [LS/E]). In Abb. 3.37 ist für die insgesamt 6 Mausgruppen der Quotient aus Renin-mRNA und GAPDH-mRNA dargestellt, wobei dieser Quotient für die Wildtyp[NS]-Maus auf den Wert 1 normiert ist. In keiner der drei Diätgruppen ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und den AKR1B7-Knockout-Mäusen. Während die Unterdrückung des RAAS mittels Hochsalzdiät bei beiden Maustypen lediglich eine diskrete Minderung der Renin-mRNA-Konzentration bewirkt, zeigt sich bei Stimulation des RAAS mittels Nidrigsalzdiät und Enalapril-Behandlung beim Wildtyp ein 7-facher und beim AKR1B7-Knockout ein 6,6-facher und somit jeweils signifikanter Anstieg der Reninexpression im Vergleich zur Normalkost.

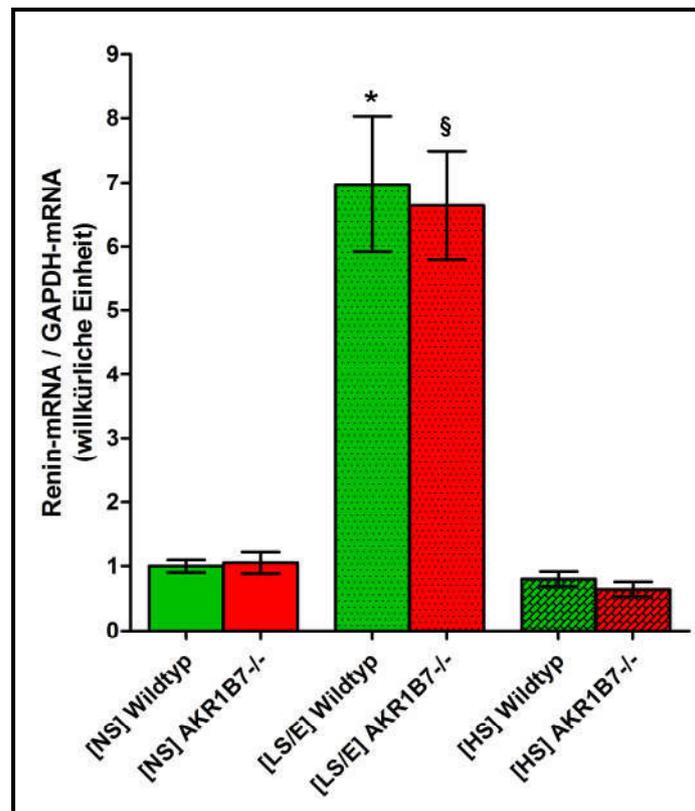


Abbildung 3.37: Graphische Darstellung der Renin-mRNA-Level der Wildtyp- und der AKR1B7-Knockout-Maus, jeweils für [NS], [HS] und [LS/E]; Normierung des [NS]Wildtyp-Werts auf 1. Untersuchung von 4 bis 8 Mäusen pro Gruppe. * Signifikanter Unterschied zu [NS]Wildtyp. § Signifikanter Unterschied zu [NS]AKR1B7^{-/-}.

3.4 Plasmareninmessung

Die Ergebnisse der Plasmareninbestimmung sind in Abb. 3.38 dargestellt. Analog zu den Ergebnissen der mRNA-Messung sind die Plasmareninkonzentrationen für die Wildtyp- und die AKR1B7-Knockout-Mäuse in jeweils 3 Diätgruppen ([NS], [HS], [LS/E]) angegeben, hier jedoch ohne Normierung in der Originaleinheit [$\text{ng}_{\text{ANG I}}/\text{h}\cdot\text{ml}$]. In keiner der Diätgruppen kann ein signifikanter Unterschied der Plasmareninkonzentration zwischen den zwei Genotypen festgestellt werden. Ähnlich wie bei der Reninexpression bewirkt eine Hochsalzdiät sowohl bei der Wildtyp- als auch bei der AKR1B7-Knockout-Maus eine nur gering ausgeprägte Minderung der Plasmareninkonzentration, während diese nach Niedrigsalzdiät und Enalapril-Behandlung signifikant um ein Vielfaches gesteigert ist (34-fach beim Wildtyp 43-fach beim AKR1B7-Knockout).

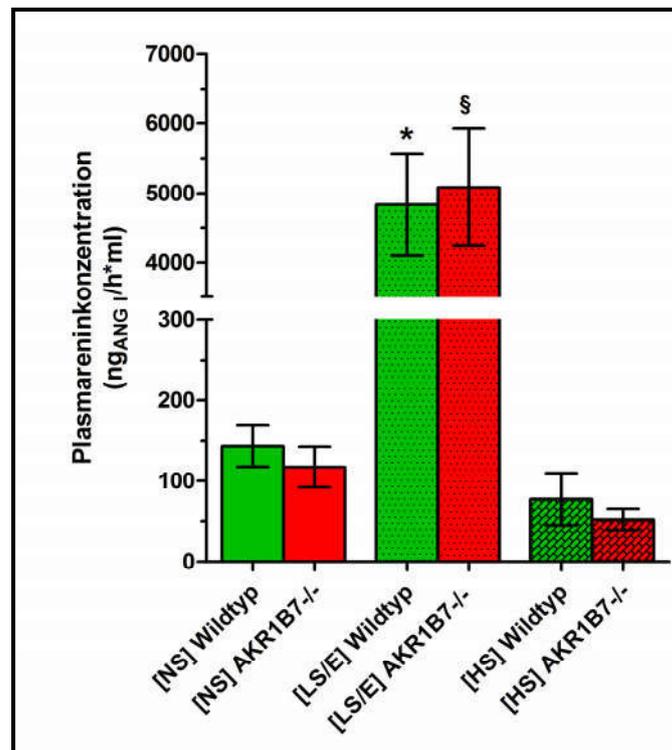


Abbildung 3.38: Graphische Darstellung der Plasmarenin-Konzentration der Wildtyp- und der AKR1B7-Knockout-Maus, jeweils für [NS], [HS] und [LS/E]. Untersuchung von 5 bis 12 Mäusen pro Gruppe. * Signifikanter Unterschied zu [NS]Wildtyp. § Signifikanter Unterschied zu [NS]AKR1B7-/-.

3.5 Blutdruckmessung

Die Ergebnisse der Blutdruckmessung sind in Abb. 3.39 dargestellt. Zu sehen ist der systolische Blutdruck der Wildtyp- sowie der AKR1B7-Mäuse. Dieser beträgt im Durchschnitt 127 ± 2 mmHg für Wildtyp-Mäuse und 124 ± 3 mmHg für AKR1B7-Knockout-Mäuse. Ein Vergleich beider Gruppen liefert keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen.

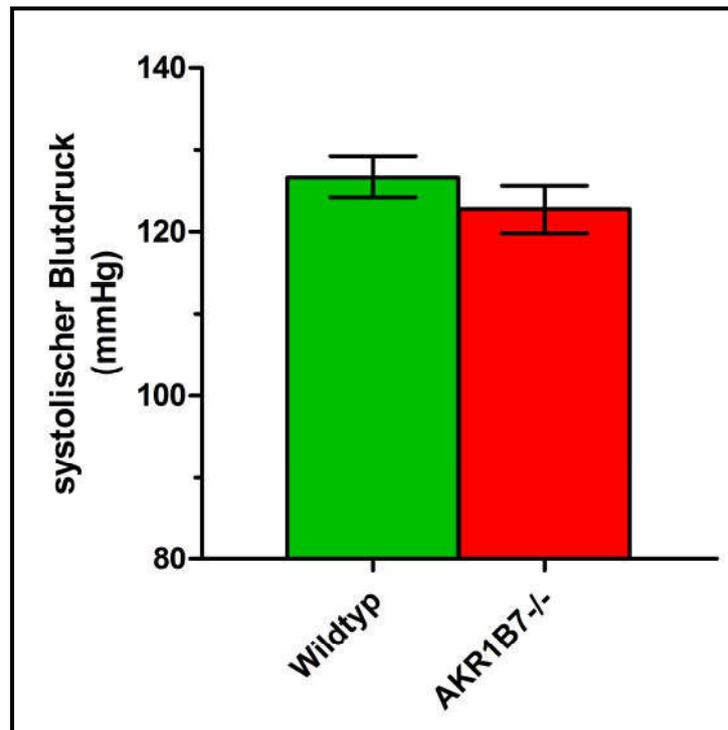


Abbildung 3.39: Graphische Darstellung der systolischen Blutdruckwerte der Wildtyp- und der AKR1B7-Knockout-Maus. Untersuchung von 6 Mäusen pro Genotyp.

4 Diskussion

4.1 Die Kolokalisation von Renin und AKR1B7

Die Analyse der Kolokalisation von Renin und AKR1B7 in der Mausniere erfolgte durch eine mikroskopisch-histologische sowie dreidimensionale Betrachtung der Expression beider Proteine. Verglichen wurden dabei Wildtyp-Mäuse unter drei unterschiedlichen Diätbedingungen (unter Normalkost, nach Hochsalzdiät sowie nach Niedrigsalzdiät und Enalapril-Gabe) sowie zwei Maustypen mit genetischen Defekten (Aldosteronsynthese-Knockout-Maus, Connexin40-Knockout-Maus), bei denen ebenfalls eine veränderte Menge und Lokalisation reninbildender Zellen zu erwarten ist. Eine vergleichende Übersicht über die Renin- und AKR1B7-Verteilung in diesen Maustypen ist in Abb. 4.1 dargestellt.

Bei allen Wildtyp-Mäusen wurde insgesamt eine hochgradige Kolokalisation von Renin und AKR1B7 gefunden. Menge und Lokalisation von AKR1B7 stimmen in der Mausniere im physiologischen Normalzustand mit der Menge und Lokalisation von Renin überein. Bei Änderung der Salzzufuhr verändert sich die Expression von AKR1B7 analog zur Reninexpression. Die beschriebenen AKR1B7-Signale, die in der Wand kleiner oder großer Gefäße ohne begleitendes Reninsignal auftreten und sich als feine Punkte oder dünne Streifen darstellen, sind nach mehrfacher Betrachtung von zu unterschiedlichen Zeitpunkten gefärbten Paraffinschnitten am ehesten als Artefakt zu werten. Dafür sprechen ihre Morphologie sowie die Lokalisation und Unregelmäßigkeit ihres Vorkommens. Solche Artefakte könnten beispielsweise durch die Fixierung des Nierengewebes, durch teilweise unspezifische Bindung von Antikörpern bei der immunhistochemischen Färbung oder durch eine Kombination aus beiden Faktoren entstanden sein. Da die immunhistochemische Färbung von AKR1B7 mit Hilfe von anti-AKR1B7-Antikörpern ausschließlich nach Fixierung des Gewebes mittels Bouin-Lösung qualitativ auswertbare Ergebnisse lieferte, war es nicht möglich, eine eventuell fixierungsbedingte Artefaktquelle durch den Vergleich von unterschiedlich fixierten, immunfluoreszenzmarkierten Schnitten zu überprüfen. Es ist zwar nicht auszuschließen, dass die genannten Signale keine Artefakte darstellen, sondern tatsächlich zusätzliche AKR1B7-Vorkommen in der Wand von Nierengefäßen markieren. Aufgrund von Morphologie, Lokalisation, Unregelmäßigkeit und schwacher Intensität dieser Signale erscheint das allerdings unwahrscheinlich.

Bei der Aldosteron-Knockout-Maus imponiert die Kolokalisation von Renin und AKR1B7 weniger streng als bei den Wildtyp-Mäusen. Obwohl beim Großteil der afferenten Arteriolen und größerer Gefäße sowohl in typischer juxttaglomerulärer Position als auch in den rekrutierten Bereichen eine sehr gute Überlappung von Renin und AKR1B7 zu sehen ist, finden sich zum Teil größere Abweichungen. Am häufigsten sind diese in Form alleiniger Reninansammlungen im juxttaglomerulären Bereich der afferenten Arteriole oder in Form alleiniger AKR1B7-Ansammlungen in der Wand größerer Gefäße zu sehen. Auch diese Unstimmigkeiten könnten

sowohl technisch bedingt als auch auf tatsächliche Unterschiede zwischen der Renin- und der AKR1B7-Expression zurückzuführen sein. Dabei erscheinen die hier vorkommenden, isolierten Renin- oder AKR1B7-Signale aufgrund ihrer deutlichen Stärke und Klarheit sowie aufgrund ihres regelmäßigen Vorkommens eher nicht wie Artefakte.

In der Niere der Connexin40-Knockout-Maus erscheint das Ausmaß der Kolokalisation von Renin und AKR1B7 noch etwas geringer. Zusammenfassend zeigt sich bei sehr inhomogenem Mischbild eine AKR1B7-Expression an fast jedem Glomerulus in juxtaglomerulärer Position mit koloklisierter oder fehlender Reninexpression. Gleichzeitig finden sich an manchen Glomeruli ektope Reninansammlungen ohne begleitende AKR1B7-Expression. Bereiche mit alleiniger Renin- oder AKR1B7-Expression zeigen - ähnlich wie bei der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus - eine leichte Diskrepanz zwischen Renin- und AKR1B7-Expression. Insgesamt ergibt sich der Eindruck, als befände sich AKR1B7 überall dort, wo unter physiologischen Bedingungen die Reninsynthese zu erwarten wäre. Renin dagegen scheint zum Teil an physiologischer Position lokalisiert zu sein, zum Teil an ektopter Position zu liegen und zum Teil komplett zu fehlen.

Diese Ergebnisse zur Kolokalisation von Renin und AKR1B7 bei verschiedenen Maustypen lassen sich unter gewissen Einschränkungen mit Ergebnissen anderer Studien vergleichen. So untersuchten zum einen Brunskill et al. (2011) und zum anderen Lin et al. (2015) die Kolokalisation der beiden Proteine in der Mausniere. In beiden Studien wurde die Koexpression von Renin und AKR1B7 bei der adulten Wildtyp-Maus sowie während der embryonalen Nierenentwicklung mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen analysiert. Brunskill et al. untersuchten zusätzlich die Wildtyp-Maus unter Captoprilgabe, Lin et al. die Wildtyp-Maus nach Hochsalzdiät, nach Niedrigsalzdiät und Captoprilgabe, die Aldosteronsynthase-Knockout-Maus sowie eine Maus mit Deletion von Dicer, einem micro-RNA-prozessierenden Enzym. Die Ergebnisse zu den wildtypischen Diättieren sowie den Tieren unter (zusätzlicher) Captoprilgabe ähneln sehr den Ergebnissen dieser Arbeit. Auch dort ist jeweils eine hochgrade Kolokalisation von Renin und AKR1B7 unter allen Diätbedingungen sowie unter medikamentöser Manipulation beschrieben. Auch bei der Aldosteronsynthase-Knockout-Maus ist von einer hochgradigen Kolokalisation beider Proteine die Rede, wobei für AKR1B7 im Vergleich zu Renin von einer geringeren Zunahme der Intensität gesprochen wird. Isoliert vorkommende Renin- oder AKR1B7-Signale werden nicht beschrieben, wobei Unterschiede auf die Verwendung anderer Methoden in diesen beiden Studien zurückzuführen sein könnten. Mitunter können abweichende Fixiermethoden, die Verwendung von Versuchstieren mit anderem genetischem Hintergrund sowie abweichende immunhistochemische Methoden (Peroxidase-Reaktion statt Immunfluoreszenz) zu leicht abweichenden Ergebnissen beim gleichen Maustyp führen. Hinsichtlich der Expression von AKR1B7 während der embryonalen Entwicklung der Mausniere, in deren Verlauf die Reninexpression ausgehend von der Wand größerer Gefäße

langsam in Richtung der typischen juxtaglomerulären Position fortschreitet, wird ebenfalls von einer hochgradigen Kolokalisation mit der Reninexpression berichtet. Selbiges gilt für die Expression von AKR1B7 bei der Dicer-Deletion, die zu einer deutlichen Abnahme reninbildender Zellen an der juxtaglomerulären Position afferenter Arteriolen führt.

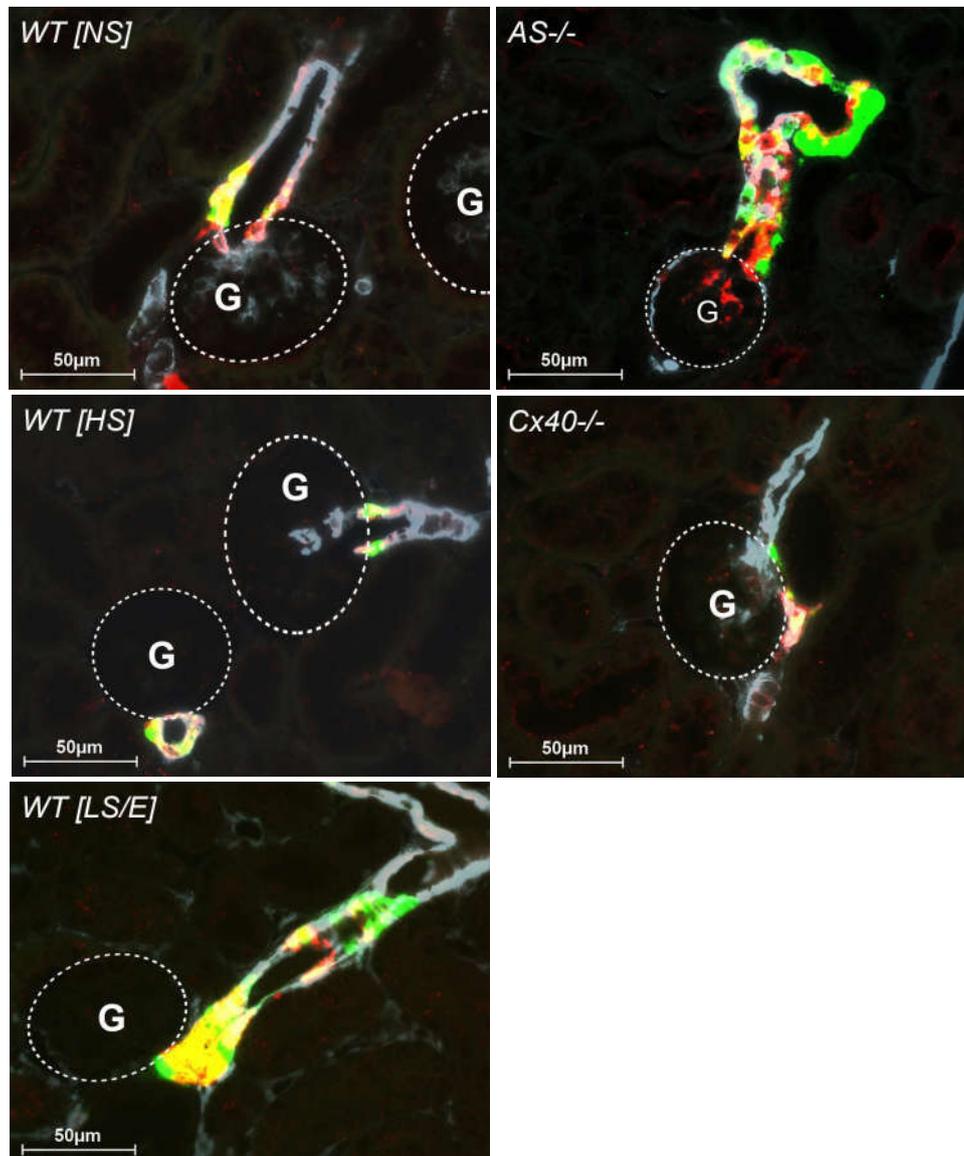


Abb. 4.1: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt jeweils einer Wildtyp-Maus (WT) unter Normalkost [NS], nach Hochsalzdiät [HS] sowie nach Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe [LS/E], einer Aldosteronsynthase-Knockout-Maus (AS^{-/-}) und einer Connexin40-Knockout-Maus (Cx40^{-/-}). Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolokalisation von Renin und AKR1B7 (gelb), von Glattmuskelaktin und AKR1B7 (rosa). G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

Trotz der Unterschiede beim Vergleich der Ergebnisse aus dieser und den oben genannten Studien lassen sich alle Erkenntnisse gut miteinander in Einklang bringen, wenn man AKR1B7 als durchschnittlich guten Marker für reninbildende Zellen betrachtet. Für Wildtyp-Mäuse unter verschiedenen Ernährungsbedingungen sowie während der Nierenentwicklung lässt sich insgesamt eine hochgradige Kolo-kalisation und somit eine sehr gute Tauglichkeit von AKR1B7 als Marker für reninbildende Zellen der Mausniere feststellen. Bei Mäusen mit genetischen Defekten ist die renale Kolo-kalisation von Renin und AKR1B7 etwas weniger zuverlässig, sodass die Verwendung von AKR1B7 als Marker für reninbildende Zellen bei diesen Maustypen mit Vorsicht erfolgen sollte. Eine Ursache für die beschriebene Diskrepanz lässt sich nur schwer ausmachen, nachdem die Funktion von AKR1B7 nach wie vor nicht vollständig erfasst ist. Möglicherweise können weitere Erkenntnisse über die Rolle von AKR1B7 in der Mausniere in Zukunft neue Erklärungsansätze für dieses Phänomen liefern.

4.2 Die Folgen von AKR1B7-Defizienz

Die Untersuchung der Folgen von AKR1B7-Defizienz erfolgte mittels qualitativer und quantitativer Methoden. Zu den qualitativen Methoden gehörte der mikroskopisch-histologische Vergleich der Reninexpression bei Wildtyp- und AKR1B7-Knockout-Mäusen unter verschiedenen Diätbedingungen sowie die dreidimensionale Analyse der renalen Gefäßarchitektur und der Reninexpression bei jeweils einer Wildtyp[NS]- und AKR1B7-Knockout[NS]-Maus. Eine vergleichende Übersicht über die Ergebnisse dieser qualitativen Untersuchungen ist in Abb. 4.2 dargestellt.

Beim mikroskopisch-histologischen Vergleich der Diättiere beider Genotypen konnte in keiner der Diätgruppen ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Reninexpression festgestellt werden. Unter Normalkost sind sowohl Menge als auch Lokalisation von Renin zwischen AKR1B7-Knockout-Maus und Wildtyp-Maus vergleichbar. Nach Niedrigsalzdiät und Enalapril-Gabe nimmt die Reninexpression bei beiden Genotypen durch die retrograde Rekrutierung reninbildender Zellen in ähnlichem Ausmaß zu, bei Hochsalzdiät ist die Reninmenge und -lokalisation bei beiden Genotypen ähnlich stark vermindert. Auch in der Analyse der Reninexpression sowie der renalen Gefäßarchitektur mittels 3D-rekonstruierter Gefäßbäume konnten zwischen Wildtyp[NS]- und AKR1B7-Knockout[NS]-Maus keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden.

Zu den quantitativen Methoden gehörte die Bestimmung des Renin-mRNA-Gehalts der Mausnieren sowie des Plasmoreninspiegels von Wildtyp- und AKR1B7-Knockout-Mäusen in jeweils drei Diätgruppen. Innerhalb der einzelnen Diätgruppen ließ sich in keiner der beiden Untersuchungen

ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen feststellen. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung des systolischen Blutdrucks und die Messung der Länge und des Durchmessers afferenter Arteriolen bei Wildtyp- und AKR1B7-Knockout-Mäusen unter Normalkost, wobei der jeweilige Vergleich zwischen den Genotypen auch hier keine signifikanten Unterschiede lieferte.

Ein limitierender Faktor dieser Studie war mit 4 bis 12 Mäusen pro Gruppe die relativ geringe Anzahl der untersuchten Tiere. Außerdem ist zu bedenken, dass auch die Messgenauigkeit der einzelnen Untersuchungen Grenzen hat. Vor allem die Ergebnisse der Blutdruckmessung bei Mäusen besitzen auf Grund der Agitiertheit der Tiere durch Lärm, mechanische Manipulation oder Temperaturschwankungen ein hohes Fehlerpotenzial. Durch Adaptation der Mäuse an die Umgebung und den Messvorgang wurde jedoch versucht, diesem Störfaktor entgegenzuwirken.

Die Analyse der unterschiedlichen Aspekte der AKR1B7-Defizienz legt nach Zusammenschau aller Befunde dennoch nahe, dass AKR1B7 keinen Einfluss auf das RAAS und die renale Gefäßarchitektur besitzt.

Darüber hinaus untersuchten Machura et al. im Jahr 2013 die Reninsekretionsrate von isoliert perfundierten Nieren wildtypischer und AKR1B7-defizienter Mäuse in Abhängigkeit mehrerer Regulatoren des RAAS. Es wurde jeweils die Reninsekretionsrate bei Perfusion mit Isoproterenol, bei zusätzlicher Gabe unterschiedlicher ANGII-Mengen sowie bei verschiedenen Perfusionsdrücken gemessen und dadurch die Ansprechbarkeit der Reninsekretion auf diese Faktoren geprüft. Dabei konnte zwischen den Nieren von Wildtyp- und AKR1B7-Knockout-Mäusen bei keiner der Manipulationen ein Unterschied hinsichtlich der Reninsekretion festgestellt werden, was gleichermaßen auf die Unabhängigkeit des RAAS von AKR1B7 hindeutet.

Machura et al. (2013) untersuchten außerdem, ob andere Enzyme der Subgruppe AKR1B bei Abwesenheit von AKR1B7 dessen Rolle übernehmen und dadurch die Unabhängigkeit der Reninsynthese von AKR1B7 vortäuschen könnten. Sie verglichen dafür die AKR1B3-, die AKR1B8- und die AKR1B16-mRNA-Menge (neben dem AKR1B7-Gen drei weitere Gene der AKR1B-Subgruppe, die bisher in der Mausniere gefunden werden konnten) in Nieren von Wildtyp- und AKR1B7-Knockout-Mäusen. Dabei konnten sie für keines der drei Gene eine signifikant veränderte mRNA-Menge bei AKR1B7-Defizienz feststellen.

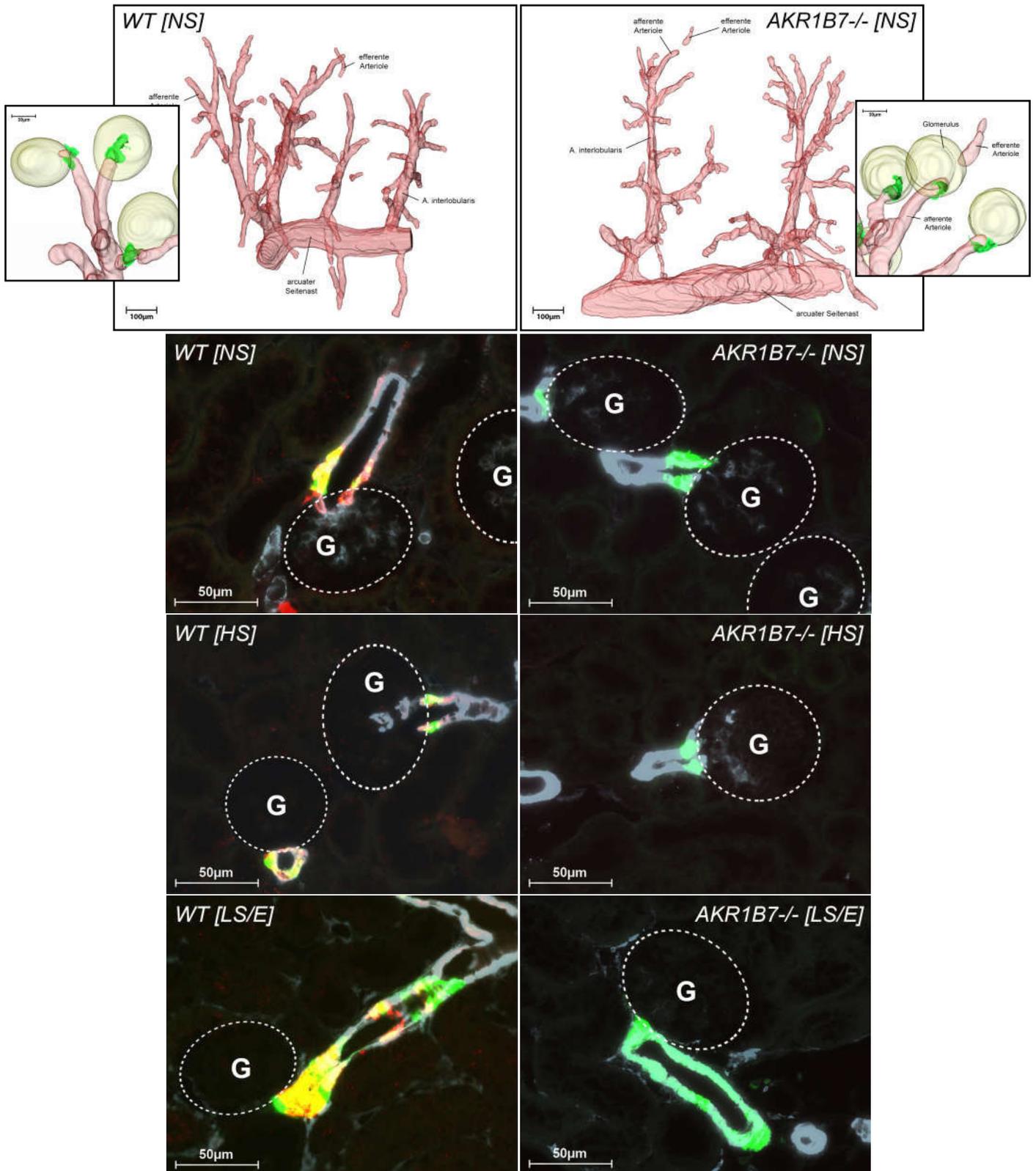


Abb. 4.2: Gegenüberstellung der Gefäßarchitektur sowie der Reninexpression bei der Wildtypmaus (WT) und bei der AKR1B7-Knockout-Maus (AKR1B7^{-/-}). Oben: 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität, in der Detailvergrößerung zusätzliche Darstellung der Renin (grün-) Immunreaktivität. Unten: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt jeweils einer Wildtyp- bzw. AKR1B7-Knockout-Maus unter Normalkost [NS], nach Hochsalzdiät [HS] sowie nach Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe [LS/E]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolokalisation von Renin und AKR1B7 (gelb), von Glattmuskelaktin und AKR1B7 (rosa). G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.

Komplementär zu den Untersuchungen dieser Studie und zu den Experimenten von Machura et al. (2013) untersuchten Brunskill et al. (2011) und Lin et al. (2015) umgekehrt den Einfluss von Renin auf die Expression von AKR1B7. In beiden Studien wurde mittels immunhistochemischer Färbung und histologischer Betrachtung die Expression von AKR1B7 in Nieren von Mäusen mit Ren1c-Knockout analysiert. Dabei konnte in beiden Analysen trotz Abwesenheit des Renin-Gens eine AKR1B7-Expression in denjenigen Zellen festgestellt werden, in denen unter physiologischen Bedingungen die Expression von Renin zu erwarten wäre. Lin et al. untersuchten darüber hinaus die AKR1B7-Expression in Nieren nach kompletter Ablation reninbildender Zellen mittels Diphtherietoxin A. In diesen Nieren konnte kein AKR1B7 nachgewiesen werden, was für eine hohe Spezifität von AKR1B7 für reninbildende Zellen spricht.

Die Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeiten von Machura, Brunskill und Lin zeigt, dass sich AKR1B7 und Renin nicht direkt gegenseitig beeinflussen.

4.3 Fazit und Ausblick

Die Untersuchungen dieser Arbeit und der Studien von Machura et al. (2013), Brunskill et al. (2011) und Lin et al. (2015) führen insgesamt zum Ergebnis, dass AKR1B7 im Durchschnitt einen guten und spezifischen Marker für reninbildende Zellen darstellt und dass sich Renin und AKR1B7 in Bezug auf ihre Expression und Sekretion nicht gegenseitig beeinflussen. Diese Entdeckungen führen zwangsläufig zur Frage, welche Rolle AKR1B7 in den reninbildenden Zellen spielen könnte. Bisher wurden mehrere unterschiedliche Vermutungen geäußert. Eine funktionelle Verbindung beider Proteine über die Prostaglandinsynthese stellte eine Möglichkeit dar. Durch bisherige Erkenntnisse über die Fähigkeit von Prostaglandinen, die Reninsynthese und –sekretion zu stimulieren sowie das Wissen über die PGF_{2α}-Synthase-Aktivität von mehreren Aldo-Keto-Reduktasen einschließlich AKR1B7 war eine solche Vermutung naheliegend. Durch den Nachweis der Unabhängigkeit der Reninsynthese von AKR1B7 wurde ein solcher Zusammenhang jedoch unwahrscheinlich und wäre nur bei gleichzeitiger kompensatorischer Erhöhung der Expression anderer Enzyme mit PGF_{2α}-Aktivität denkbar. Eine andere Möglichkeit, über die auch von Lin et al. (2015) spekuliert wurde, wäre eine protektive Rolle von AKR1B7 bei oxidativem Stress. Eine solche Funktion erfüllt AKR1B7 in der Nebenniere der Maus. Dort reduziert es Isocaproaldehyd, das als Nebenprodukt bei der Steroidhormonsynthese entsteht und mit oxidativem Stress assoziiert wird, zu weniger schädlichen Formen. Da endokrine Zellen im Allgemeinen aufgrund deren gesteigerter Proteinsynthese anfällig für oxidativen Stress sind (Lin et al, 2015), erschien eine solche Möglichkeit auch für die reninbildenden – und somit ebenfalls endokrin aktiven - Zellen

nicht unwahrscheinlich, auch wenn bislang wenig über den oxidativen Stress in reninbildenden Zellen bekannt ist. Eine solche Funktion würde aber wiederum eine gewisse Abhängigkeit des Renins von AKR1B7 bedeuten, die durch diese Studie weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

Wenn man wiederum von der gegenseitigen Unabhängigkeit von Renin und AKR1B7 ausgeht, liegt es nahe, dass beide Proteine als Teil eines übergeordneten genetischen Systems, das den Phänotyp reninbildender Zellen determiniert, gemeinsam reguliert werden. Auch wenn bisher wenig Studien zu dieser Frage existieren, konnten bereits zwei Faktoren gefunden werden, die an der Koregulation von Renin und AKR1B7 beteiligt sind. So konnten zum einen Lin et al. 2015 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Koregulation von Renin und AKR1B7 durch cAMP feststellen. Zum anderen zeigten Castellanos-Rivera et al. 2015, dass die Deletion von RBP-J, dem Haupteffektor des Notch-Signalwegs, zu einer starken Abnahme renin- und AKR1B7-positiver Zellen führt und somit auch an deren Koregulation beteiligt zu sein scheint.

Um Aussagen darüber treffen zu können, welche weiteren Faktoren zur Regulation von Renin und AKR1B7 beitragen und um mehr über die Rolle von AKR1B7 in den reninbildenden Zellen der Niere bzw. den Grund der Kolo-kalisation von Renin und AKR1B7 zu erfahren, bedarf es weiterer Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Nach der Entdeckung eines hohen Expressionslevels der Aldo-Keto-Reduktase AKR1B7 in den reninbildenden Zellen der Mausniere kamen mitunter die Fragen auf, welche Rolle das Enzym in diesen Zellen spielen könnte und inwieweit AKR1B7 und Renin einer wechselseitigen Abhängigkeit unterliegen. Desweiteren war von zentralem Interesse, ob AKR1B7 als Marker für reninbildende Zellen fungieren könnte. Im Rahmen dieser Arbeit sollte beleuchtet werden, inwieweit sich Renin- und AKR1B7-Expression entsprechen und welchen Einfluss AKR1B7 auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ausübt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde das Ausmaß der Kolo-kalisation von Renin und AKR1B7 in der Mausniere untersucht. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen und dreidimensionaler Rekonstruktionen von renalen Gefäßbäumen die Expressionsmuster der beiden Proteine in Nieren unterschiedlicher Maustypen miteinander verglichen. Dabei wurden einerseits adulte, unbehandelte Wildtyp-Mäuse untersucht und andererseits Mäuse, bei denen aufgrund einer modifizierten Salzzufuhr oder aufgrund genetischer Defekten die renale Reninexpression ein vom physiologischen Zustand abweichendes Muster zeigt. Dabei konnte bei Wildtyp-Mäusen unter allen Diätarten eine weitgehende Kolo-kalisation von Renin und AKR1B7 festgestellt werden. Bei Mäusen mit genetischen Defekten präsentierte sich zwar kein identisches, aber dennoch hochgradig überlappendes Expressionsmuster von Renin und AKR1B7.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung eines möglichen Einflusses von AKR1B7 auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Hierzu wurden AKR1B7-Knockout-Mäuse gezüchtet und hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Reninexpression, der Reninsynthese, der renalen Gefäßarchitektur sowie des systolischen Blutdrucks miteinander verglichen. In keiner der durchgeführten Untersuchungen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und AKR1B7-Knockout-Mäusen festgestellt werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Aldo-Keto-Reduktase AKR1B7 im Durchschnitt einen gut geeigneten Marker für die reninbildenden Zellen der Mausniere darstellt, ohne die Reninsynthese und -sekretion zu beeinflussen. Welche Rolle das Enzym in diesen Zellen spielt und inwiefern Renin und AKR1B7 Bestandteile eines übergeordneten Regulationssystems des RAAS darstellen, muss im Rahmen weiterer Studien geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aida, K., Ikegishi, Y., Chen, J., Tawata, M., Ito, S., Maeda, S., & Onaya, T.** (2000). Disruption of aldose reductase gene (*Akr1b1*) causes defect in urinary concentrating ability and divalent cation homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications*, 277(2), 281-286.
- Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrancois-Martinez, A. M., Veyssiere, G., & Jean, C. I.** (1999). Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *Journal of endocrinology*, 160(1), 147-154.
- Aitken, R. J.** (1994). A free radical theory of male infertility. *Reproduction, Fertility and Development*, 6(1), 19-23.
- Anderhuber, F. & Weiglein, A.** (1992). Zur Nomenklatur der Nierengefäße. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 174(3), 229-234.
- Ardaillou, R.** (1999). Angiotensin II receptors. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 10, S30-9.
- Bader, M., & Ganten, D.** (2000). Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *Journal of Molecular Medicine*, 78(3), 130-139.
- Barajas, L.** (1979). Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 237(5), F333-F343.
- Barajas, L., Liu, L., & Powers, K.** (1992). Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 70(5), 735-749.
- Baumann, C., Davies, B., Peters, M., Kaufmann-Reiche, U., Lessl, M., & Theuring, F.** (2007). AKR1B7 (mouse vas deferens protein) is dispensable for mouse development and reproductive success. *Reproduction*, 134(1), 97-109.
- Boivin, V., Jahns, R., Gambaryan, S., Ness, W., Boege, F., & Lohse, M. J.** (2001). Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney international*, 59(2), 515-531.
- Brockstedt, E., Peters-Kottig, M., Badock, V., Hegele-Hartung, C., & Lessl, M.** (2000). Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology*, 141(7), 2574-2581.
- Brunskill, E. W., Sequeira-Lopez, M. L. S., Pentz, E. S., Lin, E., Yu, J., Aronow, B. J., ... & Gomez, R. A.** (2011). Genes that confer the identity of the renin cell. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(12), 2213-2225.
- Carey, R. M., McGrath, H. E., Pentz, E. S., Gomez, R. A., & Barrett, P. Q.** (1997). Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *Journal of Clinical Investigation*, 100(6), 1566.
- Casellas, D., Dupont, M., Bouriquet, N., Moore, L. C., Artuso, A., & Mimran, A.** (1994). Anatomic pairing of afferent arterioles and renin cell distribution in rat kidneys. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 267(6), F931-F936.
- Castrop, H., Huang, Y., Hashimoto, S., Mizel, D., Hansen, P., Theilig, F., ... & Schnermann, J.** (2004). Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, 114(5), 634-642.
- Castrop, H., Höcherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V., & Wagner, C.** (2010). Physiology of kidney renin. *Physiological Reviews*, 90(2), 607-673.
- Chao, H. H., Waheed, A., Pohlmann, R., Hille, A., & Von Figura, K.** (1990). Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *The EMBO journal*, 9(11), 3507.

- Chen, L., Kim, S. M., Oppermann, M., Faulhaber-Walter, R., Huang, Y., Mizel, D., ... & Briggs, J. P.** (2007). Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein Gs α in juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(1), F27-F37.
- Chiu, T., & Reid, I. A.** (1996). Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278(2), 793-799.
- Chiu, Y. J., Hu, S. H., & Reid, I. A.** (1999). Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290(1), 16-19.
- Cohen, Y., Rahamimov, R., Naveh-Manly, T., Silver, J., & Rahamimoff, R.** (1997). Where is the "inverting factor" in hormone secretion from parathyroid cells?. *The American journal of physiology*, 273(3 Pt 1), E631-7.
- Comportl, M.** (1998). Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology. *Free radical research*, 28(6), 623-635.
- Constantopoulos, G., Carpenter, A., Satoh, P. S., & Tchen, T. T.** (1966). Formation of Isocaproaldehyde in the Enzymatic Cleavage of Cholesterol Side Chain by Adrenal Extract*. *Biochemistry*, 5(5), 1650-1652.
- Davis, J. & Freeman, R. H.** (1976). Mechanisms regulating renin release. *Physiological Reviews*, 56(1), 1-56.
- De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. & Unger, T. H.** (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews*, 52(3), 415-472.
- Delbridge, L. M., Morgan, T. O., & Harris, P. J.** (1995). Effects of endothelin-1 on the contractility of cardiomyocytes from the spontaneously hypertensive rat. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 22(10), 755-762.
- Della Bruna, R., Kurtz, A., Corvol, P., & Pinet, F.** (1993). Renin mRNA quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells. Short-term effects of cAMP on renin mRNA and secretion. *Circulation research*, 73(4), 639-648.
- Dianzani, M. U., Barrera, G., & Parola, M.** (1999). 4-Hydroxy-2, 3-nonenal as a signal for cell function and differentiation. *Acta Biochimica Polonica*, 46(1), 61-75.
- 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., Gross, K. W., Piccini, N., & Wilson, C. M.** (1984). Evolution and variation of renin genes in mice. *Genetics*, 108(3), 651-667.
- Dzau, V. J., Burt, D. W., & Pratt, R. E.** (1988). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 255(4), F563-F573.
- Faust, P. L., Chirgwin, J. M., & Kornfeld, S.** (1987). Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *The Journal of cell biology*, 105(5), 1947-1955.
- Friis, U. G., Jensen, B. L., Sethi, S., Andreasen, D., Hansen, P. B., & Skøtt, O.** (2002). Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circulation research*, 90(9), 996-1003.

- Fuchs, S., Germain, S., Philippe, J., Corvol, P., & Pinet, F.** (2002). Expression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promoter/LacZ transgenic mouse. *The American journal of pathology*, 161(2), 717-725.
- Fuchs, S., Philippe, J., Corvol, P., & Pinet, F.** (2003). Implication of Ref-1 in the repression of renin gene transcription by intracellular calcium. *Journal of hypertension*, 21(2), 327-335.
- Fyhrquist, F., & Saijonmaa, O.** (2008). Renin - angiotensin system revisited. *Journal of internal medicine*, 264(3), 224-236.
- Gambaryan, S., Häusler, C., Markert, T., Pöhler, D., Jarchau, T., Walter, U., ... & Lohmann, S. M.** (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.
- Grewal, A. S., Bhardwaj, S., Pandita, D., Lather, V., & Singh Sekhon, B.** (2015). Updates on aldose reductase inhibitors for management of diabetic complications and non-diabetic diseases. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(2), 120-162.
- Grobecker, H.** (1999): *Angiotensin-II-Receptor-Antagonisten: Pharmakologie und therapeutische Anwendung*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. S.17-27.
- Grünberger, C., Obermayer, B., Klar, J., Kurtz, A., & Schweda, F.** (2006). The Calcium Paradoxon of Renin Release Calcium Suppresses Renin Exocytosis by Inhibition of Calcium-Dependent Adenylate Cyclases AC5 and AC6. *Circulation research*, 99(11), 1197-1206.
- Hackenthal, E., Schwertschlag, U., & Seyberth, H. W.** (1980). Prostaglandins and renin release studies in the isolated perfused rat kidney. *Progress in biochemical pharmacology*, 17, 98-107.
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., & Taugner, R.** (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiological reviews*, 70(4), 1067-1116.
- Hanner, F., Sorensen, C. M., Holstein-Rathlou, N. H., & Peti-Peterdi, J.** (2010). Connexins and the kidney. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(5), R1143-R1155.
- Hees, H., & Sinowatz, F.** (2000). *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie (3. Aufl.)*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag. S. 68, S. 285-298.
- Hers, H. G.** (1956). Le mécanisme de la transformation de glucose en fructose par les vésicules séminales. *Biochimica et biophysica acta*, 22(1), 202-203.
- Holm, I., Ollo, R., Panthier, J. J., & Rougeon, F.** (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. R., Kaissling, B., Putnik, K., Pfeifer, M., Krämer, B. K., Riegger, G. A., & Kurtz, A.** (1997). Beta - adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *Journal of hypertension*, 15(12), 1471-1479.
- Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V., & Penning, T. M.** (2003). The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-biological interactions*, 143, 621-631.
- Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M., & Trevor, M.** (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Journal*, 326(3), 625-636.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O.** (2002). *Histologie (5. Aufl.)*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. S.326-346.

- Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J. C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., ... & Urade, Y.** (2009). Prostaglandin f2 α synthase activities of aldo-keto reductase 1b1, 1b3 and 1b7. *Journal of biochemistry*, 145(2), 161-168.
- Karp, G.** (2005). *Molekulare Zellbiologie* (4. Aufl.). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. S.342-343.
- Keeton, T. K., & Campbell, W. B.** (1980). The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacological Reviews*, 32(2), 81-227.
- King, J. A., & Fray, J. C.** (1994). Hydrogen and potassium regulation of (pro) renin processing and secretion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 267(1), F1-F12.
- Kinoshita, J. H., & Nishimura, C.** (1988). The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes/metabolism reviews*, 4(4), 323-337.
- Klar, J., Sandner, P., Müller, M. W., & Kurtz, A.** (2002). Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflügers Archiv*, 444(3), 335-344.
- Klinke, R., Pape, H.-C., Silbernagl, S.** (2005). *Physiologie* (5. Aufl.). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. S.283-329.
- Kurtz, A.** (1989). Cellular control of renin secretion. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 113* (pp. 1-40). Springer Berlin Heidelberg.
- Kurtz, A.** (1997). Membrane and secretory properties of renal juxtaglomerular granular cells. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 24(7), 536-540.
- Kurtz, A., & Wagner, C.** (1998). Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 275(6), F849-F862.
- Kurtz, L., Schweda, F., de Wit, C., Kriz, W., Witzgall, R., Warth, R., ... & Wagner, C.** (2007). Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(4), 1103-1111.
- Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Rivero-Lezcano, O. M., Sameshima, J. H., Marcilla, A., Robbins, K. C., ... & Mele, E.** (1994). Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol. Chem.* 269: 17359, 17362.
- Lambert-Langlais, S., Pointud, J. C., Lefrançois-Martinez, A. M., Volat, F., Manin, M., Coudore, F., ... & Delarue, C.** (2009). Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F 2 α are regulators of adrenal endocrine functions. *PLoS one*, 4(10), e7309.
- Lau, E. T., Cao, D., Lin, C., Chung, S. K., & Chung, S. S.** (1995). Tissue-specific expression of two aldose reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochemical Journal*, 312(2), 609-615.
- Lefrançois-Martinez, A. M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., ... & Jean, C.** (1999). Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 32875-32880.
- Levens, N. R., Peach, M. J. & Carey, R. M.** (1981). Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the control of renal function. *Circulation Research*, 48(2), 157-167.
- Lüllmann-Rauch, R.** (2006). *Taschenlehrbuch Histologie* (2. Aufl.). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. S.440-456.

- Makhanova, N., Lee, G., Takahashi, N., Lopez, M. L. S., Gomez, R. A., Kim, H. S., & Smithies, O.** (2006). Kidney function in mice lacking aldosterone. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(1), F61-F69.
- Martinez, A., Aigueperse, C., Val, P., Dussault, M. H., Tournaire, C., Berger, M., ... & Martinez, A. M. L.** (2001). Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. *Chemico-biological interactions*, 130, 903-917.
- Mercure, C., Ramla, D., Garcia, R., Thibault, G., Deschepper, C. F. & Reudelhuber, T. L.** (1998). Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS letters*, 422(3), 395-399.
- Minuth, M., Hackenthal, E., Poulsen, K., Rix, E., & Taugner, R.** (1981). Renin immunocytochemistry of the differentiating juxtaglomerular apparatus. *Anatomy and embryology*, 162(2), 173-181.
- Morris, B. J.** (1992). Molecular biology of renin I: Gene and protein structure, synthesis and processing. *Journal of hypertension*, 10(3), 209-214.
- Moyes, C. D. & Schulte, P. M.** (2008). *Tierphysiologie*. München: Pearson Deutschland GmbH. S.320-337.
- Neubauer, B., Machura, K., Chen, M., Weinstein, L. S., Oppermann, M., Sequeira-Lopez, M. L., ... & Wagner, C.** (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.
- Oates, P. J., & Mylari, B. L.** (1999). Aldose reductase inhibitors: therapeutic implications for diabetic complications. *Expert opinion on investigational drugs*, 8(12), 2095-2119.
- Ortiz-Capisano, M. C., Ortiz, P. A., Harding, P., Garvin, J. L., & Beierwaltes, W. H.** (2007). Adenylyl cyclase isoform v mediates renin release from juxtaglomerular cells. *Hypertension*, 49(3), 618-624.
- Pan, L., Black, T. A., Shi, Q., Jones, C. A., Petrovic, N., Loudon, J., ... & Gross, K. W.** (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.
- Pastel, E., Pointud, J. C., Loubeau, G., Dani, C., Slim, K., Martin, G., ... & Lefrançois-Martinez, A. M.** (2015). Aldose Reductases Influence Prostaglandin F2 α Levels and Adipocyte Differentiation in Male Mouse and Human Species. *Endocrinology*, 156(5), 1671-1684.
- Paul, M., Mehr, A. P., & Kreutz, R.** (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews*, 86(3), 747-803.
- Persson, P. B.** (2003). Renin: origin, secretion and synthesis. *The Journal of physiology*, 552(3), 667-671.
- Peters, J., & Clausmeyer, S.** (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., Fintha, A., Fuson, A. L., Tousson, A., & Chow, R. H.** (2004). Real-time imaging of renin release in vitro. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 287(2), F329-F335.
- Pizzimenti, S., Laurora, S., Briatore, F., Ferretti, C., Dianzani, M. U., & Barrera, G.** (2002). Synergistic effect of 4-hydroxynonenal and PPAR ligands in controlling human leukemic cell growth and differentiation. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(3), 233-245.
- Reddi, V., Zaglul, A., Pentz, E. S., & Gomez, R. A.** (1998). Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(1), 63-71.

- Reid, I. A., & Chiu, Y. J.** (1995). Nitric oxide and the control of renin secretion. *Fundamental & clinical pharmacology*, 9(4), 309-323.
- Rížner, T. L., & Penning, T. M.** (2014). Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids*, 79, 49-63.
- Sauter, A., Machura, K., Neubauer, B., Kurtz, A., & Wagner, C.** (2008). Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney international*, 73(1), 43-51.
- 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.
- Scholz, H., Hamann, M., Götz, K. H., & Kurtz, A.** (1994). Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflügers Archiv*, 428(2), 173-178.
- Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O., & Kurtz, A.** (2007). Renin release. *Physiology*, 22(5), 310-319.
- Schweda, F., & Kurtz, A.** (2004). Cellular mechanism of renin release. *Acta physiologica Scandinavica*, 181(4), 383-390.
- Schwertschlag, U., Seyberth, H. W., Müller, H., Grunewald, R., Erlenmaier, T., Rohs, H. G., & Hackenthal, E.** (1980). Intrarenal conversion of prostaglandin F₂ alpha into prostaglandin E₂ and renin release in the isolated perfused rat kidney. *Clinical science (London, England: 1979)*, 59, 117s-119s.
- Seery, L. T., Nestor, P. V., & FitzGerald, G. A.** (1998). Molecular evolution of the aldo-keto reductase gene superfamily. *Journal of molecular evolution*, 46(2), 139-146.
- Sequeira López, M. L., Gomez, R. A.** (2010). Novel mechanisms for the control of renin synthesis and release. *Current hypertension reports*, 12(1), 26-32.
- Silbernagl, S. & Despopoulos, A.** (2007). *Taschenatlas Physiologie* (7. Aufl.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S.186.
- Skinner, S. L., McCubbin, J. W., & Page, I. H.** (1964). Renal baroreceptor control of acute renin release in normotensive, nephrogenic and neurogenic hypertensive dogs. *Circulation research*, 15(6), 522-531.
- Söhl, G., & Willecke, K.** (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research*, 62(2), 228-232.
- Steckelings, U.** (2011). *Der Angiotensin-AT₂-Rezeptor: Untersuchungen zu Expression, physiologischen Wirkungen und zum therapeutischen Potential einer pharmakologischen Stimulation* (Doctoral dissertation, Medizinische Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin).
- Taragnat, C., Berger, M., & Jean, C.** (1986). Identification and androgen - dependence of proteins in the mouse vas deferens. *International journal of andrology*, 9(4), 299-311.
- Taragnat, C., Berger, M., & Jean, C. L.** (1988). Preliminary characterization, androgen-dependence and ontogeny of an abundant protein from mouse vas deferens. *Journal of reproduction and fertility*, 83(2), 835-842.
- Taugner, R., Bührle, C. P., Hackenthal, E., Mannek, E., & Nobiling, R.** (1984). Morphology of the Juxtaglomerular Apparatus and Secretory Mechanisms. In *Issues in Glomerulonephritis and Renin System* (pp. 76-101). Karger Publishers.

- Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., ... & Zhu, Y. Z.** (1996). Angiotensin receptors. *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, 14(5), S95-103.
- Vander, A. J.** (1967). Control of renin release. *Physiological Reviews*, 47(3), 359-382.
- Volat, F. E., Pointud, J. C., Pastel, E., Morio, B., Sion, B., Hamard, G., ... & Martinez, A.** (2012). Depressed levels of prostaglandin F2 α in mice lacking Akr1b7 increase basal adiposity and predispose to diet-induced obesity. *Diabetes*, 61(11), 2796-2806.
- Wagner, C. & Kurtz, A.** (1998). Regulation of renal renin release. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 7(4), 437-442.
- Wagner, C., Jensen, B. L., Krämer, B. K., & Kurtz, A.** (1998). Control of the renal renin system by local factors. *Kidney International*, 54, S78-S83.
- Wagner, C., Hinder, M., Krämer, B. K., & Kurtz, A.** (1999). Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension*, 34(5), 1101-1105.
- Weisert, J.** (1990). *Zur mikroskopischen Anatomie der Niere von Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Hamster: eine vergleichende Literaturstudie.* na. S.6-7, S.72-83.
- Welsch, U. & Deller, T.** (2010). *Lehrbuch Histologie* (3. Aufl.). München: Elsevier, Urban&FischerVerlag. S.383-402.
- Wölfle, S. E., Schmidt, V. J., Hoepfl, B., Gebert, A., Alcoléa, S., Gros, D., & de Wit, C.** (2007). Connexin45 cannot replace the function of connexin40 in conducting endothelium-dependent dilations along arterioles. *Circulation research*, 101(12), 1292-1299.
- Yi, P., Zhan, D., Samokyszyn, V. M., Doerge, D. R., & Fu, P. P.** (1997). Synthesis and ³²P-postlabeling/high-performance liquid chromatography separation of diastereomeric 1, N 2-(1, 3-propano)-2'-deoxyguanosine 3'-phosphate adducts formed from 4-hydroxy-2-nonenal. *Chemical research in toxicology*, 10(11), 1259-1265.
- Yu, Y., Lucitt, M. B., Stubbe, J., Cheng, Y., Friis, U. G., Hansen, P. B., ... & FitzGerald, G. A.** (2009). Prostaglandin F2 α elevates blood pressure and promotes atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(19), 7985-7990.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Feinstruktur der Niere. Links: Lage der Tubulussegmente in Abhängigkeit von der Position des Nephrons. Tubulussegmente: Pars contorta (gelb) und Pars recta (orange) des Tubulus proximalis, Tubulus intermedius (braun), Pars recta (hellgrün) und Pars contorta (dunkelgrün) des Tubulus distalis, Verbindungsstück (lila), Sammelrohrsystem (hell-blau). AStr. = Außenstreifen, IStr = Innenstreifen. Rechts: Gefäßarchitektur. a = Vas afferens. e = Vas efferens. (Abbildung modifiziert nach Lüllmann-Rauch, 2006)	
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der Signalkaskade des RAAS. ACE = Angiotensin-converting Enzyme. ADH = Antidiuretisches Hormon.	
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der Reninsynthese und –sekretion (Abbildung nach Schweda et al., 2007)	
Abb. 1.4:	Schematische Darstellung eines Glomerulus. Der juxtaglomeruläre Apparat besteht aus den granulierten JG-Zellen, der Macula densa, der afferenten und efferenten Arteriole und dem extra-glomerulären Mesangium. (Abbildung modifiziert nach Welsch & Deller, 2010)	
Abb. 1.5:	Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege, die die Reninfreisetzung beeinflussen. AC5/6 = Adenylatzyklase 5/6. AMP = Adenosinmonophosphat. ANP = Atriales Natriuretisches Peptid. ATP = Adenosintriphosphat. Ca ²⁺ = Calcium. cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat. cGKII = cGMP-dependent protein kinase type II. cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat. DAG = Diacylglycerol. GC-A = Guanylatzyklase A. GP = Glykoprotein. IP3 = Inositoltriphosphat. NO = Stickstoffmonoxid. sGC = lösliche (soluble) Guanylatzyklase. GTP = Guanosintriphosphat. PDE3a = Phosphodiesterase 3a. PIP2 = Phosphatidyl-Inositolbisphosphat. PKA = Proteinkinase A. PKC = Proteinkinase C. PLC = Phospholipid C. (Abbildung nach Castrop et al., 2009)	
Abb. 2.1:	Bildstapelgenerierung (Abbildung nach Machura et al., 2009)	
Abb. 2.2:	Farbkanaltrennung (Abbildung modifiziert nach Machura et al., 2009)	
Abb. 3.1:	[Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa), Renin- (grün) und AKR1B7- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Wildtyp-Maus [NS] mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb).	
Abb. 3.2:	[Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Wildtyp-Maus [NS] mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb). Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin- (grün) bzw. [b] AKR1B7 (rot).	
Abb. 3.3:	[Detailansicht] 3D- Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer Wildtyp-Maus [NS] mit Glomeruli (gelb) und einer efferenten Arteriole. Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin und AKR1B7, [b] nur Renin (grün) und [c] nur AKR1B7 (rot).	

Abb. 3.4:	[Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [NS]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weiße Pfeile: Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.	
Abb. 3.5:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [NS]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.6:	[Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [HS]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (rot), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weiße Pfeile: Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.	
Abb. 3.7:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [HS]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.8:	[Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [LS/E]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (rot), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weiße Pfeile: Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.	
Abb. 3.9:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Wildtyp-Maus [LS/E]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.10:	[Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa), Renin- (grün) und AKR1B7- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb).	
Abb. 3.11:	[Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb). Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin- (grün) bzw. [b] AKR1B7 (rot).	
Abb. 3.12:	[Detailansicht] 3D- Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit Glomeruli (gelb). Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin und AKR1B7, [b] nur Renin (grün) und [c] nur AKR1B7 (rot). Weitgehende Kolokalisation von Renin und AKR1B7.	

Abb. 3.13:	[Detailansicht] 3D- Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit Glomeruli (gelb) und einer efferenten Arteriole. Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin und AKR1B7, [b] nur Renin (grün) und [c] nur AKR1B7 (rot). Starke Renin-Expression an juxtaglomerulärer Position der Glomeruli mit lediglich schwacher begleitender AKR1B7-Expression.	
Abb. 3.14:	[Detailansicht] 3D- Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit Glomeruli (gelb) und einer efferenten Arteriole. Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin und AKR1B7, [b] nur Renin (grün) und [c] nur AKR1B7 (rot). Alleinige Expression von AKR1B7 in der Wand einer Interlobulararterie.	
Abb. 3.15:	[Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (rot), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weiße Pfeile: Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). Rote Pfeile: Alleinige Expression von AKR1B7 in der Wand einer Interlobulararterie. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.	
Abb. 3.16:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. Weitgehende Kolokalisation von Renin und AKR1B7 in der Wand der Interlobulararterie und der afferenten Arteriole. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.17:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. Deutliche Expression von Renin an der juxtaglomerulären Position einer afferenten Arteriole mit lediglich minimaler begleitender AKR1B7-Expression. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.18:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. In der Wand der afferenten Arteriole weitgehende Kolokalisation von Renin und AKR1B7, in der Wand der Interlobulararterie alleinige AKR1B7-Expression ohne begleitende Reninexpression. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.19:	[Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa), Renin- (grün) und AKR1B7- (rot) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb).	

Abb. 3.20:	[Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb). Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin- (grün) bzw. [b] AKR1B7 (rot).	
Abb. 3.21:	[Detailansicht] 3D- Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer Connexin40-Knockout-Maus mit Glomeruli (gelb) und efferenten Arteriolen. Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin und AKR1B7, [b] nur Renin (grün) und [c] nur AKR1B7 (rot). Glomeruli mit weitgehender Kolokalisation von Renin und AKR1B7. Am links dargestellten Glomerulus findet sich eine ektopische Expression von Renin.	
Abb. 3.22:	[Detailansicht] 3D- Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer Aldosteronsynthese-Knockout-Maus mit Glomeruli (gelb) und efferenten Arteriolen. Zusätzliche Darstellung der Immunreaktivität von [a] Renin und AKR1B7, [b] nur Renin (grün) und [c] nur AKR1B7 (rot). Heterogenes Expressionsmuster von Renin und AKR1B7 mit teils ektopem Vorkommen von Renin sowie alleinigem Vorkommen von AKR1B7 in der Wand der afferenten Arteriole.	
Abb. 3.23:	[Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (rot), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Weißer Pfeil: Kolokalisation der Immunreaktionen von Renin und AKR1B7 (gelb). Roter Pfeil: Ektopische Reninexpression im periglomerulären Mesangium sowie der Wand der efferenten Arteriole. Gelber Pfeil: Alleinige AKR1B7-Expression ohne begleitende Reninexpression. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.	
Abb. 3.24:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. Partielle Kolokalisation von Renin und AKR1B7 an der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriole bei im Vergleich zur Reninmenge deutlich höherer AKR1B7-Menge. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.25:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer Connexin40-Knockout-Maus. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. Weitgehende Kolokalisation von Renin und AKR1B7 an der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriole und alleiniges Vorkommen von Renin zwischen afferenter und efferenter Arteriole. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.26:	[Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) und Renin- (grün) Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS] mit Darstellung der Glomeruli und der Nierenkapsel (gelb).	
Abb. 3.27:	[Detailansicht] 3D- Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) und Renin- (grün) Immunreaktivität mehrerer afferenter Arteriolen einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS] mit Glomeruli (gelb) und einer efferenten Arteriole.	

Abb. 3.28:	[Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau) und Renin (grün). Weiße Pfeile: Lokalisation der Immunreaktionen von Renin an der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.	
Abb. 3.29:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau) und Renin (grün). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.30:	[Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [HS]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau) und Renin (grün). Weiße Pfeile: Lokalisation der Immunreaktionen von Renin an der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.	
Abb. 3.31:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [HS]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau) und Renin (grün). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.32:	[Übersicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [LS/E]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau) und Renin (grün). Weiße Pfeile: Lokalisation der Immunreaktionen von Renin an der juxtaglomerulären Position der afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. 200fache Vergrößerung.	
Abb. 3.33:	[Detailansicht] Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [LS/E]. [a] Kombinierte Darstellung der Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (α SMA, hellblau) und Renin (grün). [b]-[d] Getrennte Darstellung der einzelnen Immunreaktionen. G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 3.34:	[Gesamtansicht]: 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin-Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer Wildtyp-Maus [NS].	
Abb. 3.35:	[Gesamtansicht]: 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin-Immunreaktivität im repräsentativen Gefäßbaumabschnitt einer AKR1B7-Knockout-Maus [NS].	
Abb. 3.36:	Graphische Gegenüberstellung der [a] mittleren Länge und [b] des mittleren Durchmessers afferenter Arteriolen der Wildtyp- und der AKR1B7-Knockout-Maus.	
Abb. 3.37:	Graphische Darstellung der Renin-mRNA-Level der Wildtyp- und der AKR1B7-Knockout-Maus, jeweils für [NS], [HS] und [LS/E]; Normierung des [NS]Wildtyp-Werts auf 1. Untersuchung von 4 bis 8 Mäusen pro Gruppe. * Signifikanter Unterschied zu [NS]Wildtyp. § Signifikanter Unterschied zu [NS]AKR1B7/-.	

Abb. 3.38:	Graphische Darstellung der Plasminogen-Konzentration der Wildtyp- und der AKR1B7-Knockout-Maus, jeweils für [NS], [HS] und [LS/Ena]. Untersuchung von 5 bis 12 Mäusen pro Gruppe. * Signifikanter Unterschied zu [NS]Wildtyp. § Signifikanter Unterschied zu [NS]AKR1B7-/-.	
Abb. 3.39:	Graphische Darstellung der systolischen Blutdruckwerte der Wildtyp- und der AKR1B7-Knockout-Maus. Untersuchung von 6 Mäusen pro Genotyp.	
Abb. 4.1:	Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt jeweils einer Wildtyp-Maus (WT) unter Normalkost [NS], nach Hochsalzdiät [HS] sowie nach Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe [LS/E], einer Aldosteronsynthase-Knockout-Maus (AS-/-) und einer Connexin40-Knockout-Maus (Cx40-/-). Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolokalisation von Renin und AKR1B7 (gelb), von Glattmuskelaktin und AKR1B7 (rosa). G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	
Abb. 4.2:	Gegenüberstellung der Gefäßarchitektur sowie der Reninexpression bei der Wildtypmaus (WT) und bei der AKR1B7-Knockout-Maus (AKR1B7-/-). Oben: 3D-Rekonstruktion der Glattmuskelaktin- (rosa) Immunreaktivität, in der Detailvergrößerung zusätzliche Darstellung der Renin (grün-) Immunreaktivität. Unten: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt jeweils einer Wildtyp- bzw. AKR1B7-Knockout-Maus unter Normalkost [NS], nach Hochsalzdiät [HS] sowie nach Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe [LS/E]. Immunreaktionen von Glattmuskelaktin (hellblau), Renin (grün) und AKR1B7 (rot). Kolokalisation von Renin und AKR1B7 (gelb). G = Glomerulus. 400fache Vergrößerung.	

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Chemische und biologische Größen und Einheiten		AT₁	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
		AT₂	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
bp	Basenpaare	ATP	Adenosintriphosphat
I.E.	internationale Einheit	BSA	bovine serum albumin
M	molar	bzw.	beziehungsweise
pH	pH-Wert	Ca²⁺	Calcium
U	enzymatische Einheit (Unit)	cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
		cDNA	copy deoxyribonucleic acid
Physikalische Größen und Einheiten		sGKII	cGMP-dependent protein kinase type II
°C	Grad Celsius	cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton	CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
g	Erdbeschleunigung (gravity)	CREB	cAMP response element-binding protein
g	Gramm	Cx	Connexin
h	Stunde(n)	Cy2/5	Carbocyanin 2/5
l	Liter	DAG	Diacylglycerol
min	Minute(n)	dd H₂O	zweifach entionisiertes Wasser
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule	DEPC	Diethylpyrocarbonat
s	Sekunde(n)	DNA	Desoxyribonukleinsäure
V	Volumen	DNase	Desoxyribonuklease
Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten		dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
k	kilo (10 ³)	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
m	milli (10 ⁻³)	et al.	und andere (et alii)
μ	micro (10 ⁻⁶)	G	Glomerulus
n	nano (10 ⁻⁹)	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
p	pico (10 ⁻¹²)	GC-A	Guanylatzyklase A
Sonstiges		gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
3D	dreidimensional	GP	Glykoprotein
4-HNE	4-Hydroxynonenal	GTP	Guanosintriphosphat
[HS]	high salt	H₂KPO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
[LS/E]	low salt/Enalapril	H₂O	zweifach entionisiertes Wasser
[NS]	normal salt	bidest	
%	Prozent	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
αSMA	α smooth muscle actin	HCl	Chlorwasserstoff
A(a).	Arteria(e)	HS	Pferdeserum (horse serum)
Abb.	Abbildung	Ig	Immunglobulin
AC5/6	Adenylatzyklase 5/6	i.p.	intraperitoneal
ACE	Angiotensin-converting Enzyme	IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	JGA	juxtaglomerulärer Apparat
ADH	Antidiuretisches Hormon	JG-Zelle	juxtaglomeruläre Epitheloidzelle
AKR	Aldo-Keto-Reduktase	K⁺	Kalium
AMP	Adenosinmonophosphat	K₂HPO₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
ANGI	Angiotensin I	KG	Körpergewicht
ANGII	Angiotensin II	MD	Macula densa
ANP	Atriales natriuretisches Peptid	mRNA	messenger ribonucleic acid
AS	Aldosteronsynthase		

MVDP	Mouse vas deferens Protein	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Na⁺	Natrium		
Na₂HPO₄	di-Natriumhydrogenphosphat	RBP-J	Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin kappa J Region
NaCl	Natriumchlorid		
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat		
		RGB	Rot-Grün-Blau
NaOH	Natriumhydrogencarbonat	RIA	Radioimmunoassay
NO	Stickstoffmonoxid	RNA	Ribonukleinsäure
PBS	phosphate buffered saline	RNase	Ribonuklease
PCR	Polymerasekettenreaktion	RT	Raumtemperatur
PDE3a	Phosphodiesterase 3a	RT	Reverse Transkriptase
PGF	Prostaglandin F	sGC	lösliche (soluble) Guanylatzyklase
PIP2	Phosphatidyl-Inositolbisphosphat	TRIS	Tris-(hydroxy-methyl-)aminomethan
PKA	Proteinkinase A		
PKC	Proteinkinase C	TRITC	Tetramethylrhodamin
PLC	Phospholipase C	V(v).	Vena(e)

Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden am 09.01.2013 im American Journal of Physiology publiziert:

Machura, K., Iankilevitch, E., Neubauer, B., Theuring, F., & Kurtz, A. (2013). The aldo-keto reductase AKR1B7 coexpresses with renin without influencing renin production and secretion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 304(5), F578-F584.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich von Herzen all denjenigen danken, die während der letzten Monate zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

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

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Katharina Machura für die fachliche Anleitung, die kompetente Betreuung in Theorie und Praxis und für ihre fortwährende Hilfsbereitschaft bedanken.

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

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Mann Nikolai und bei meiner gesamten Familie für ihr Verständnis sowie die moralische und technische Unterstützung bedanken.

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde von Prof. Dr. Armin Kurtz angeregt und in ihrer Ausarbeitung überwacht.

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

Regensburg, 20.01.2017

Elina Benkowitsch