

# Die funktionelle Rolle des tubulären Renin-Systems



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Anna Ramona Federlein

aus Weiden i.d.Opf.

im Jahr 2018

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 09.05.2018

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Frank Schweda,  
Institut für Physiologie,  
Universität Regensburg

Unterschrift:

---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen der Nierenanatomie und -funktion.....	1
1.1.1	Das Nephron und seine Funktionen .....	2
1.2	Renin-Angiotensin-System .....	8
1.2.1	Reninsynthese und -sekretion .....	10
1.2.2	Regulation der Reninsynthese und -sekretion.....	10
1.2.2.1	Blutdruck.....	11
1.2.2.2	Salzhaushalt .....	11
1.2.2.3	Sympathisches Nervensystem .....	12
1.2.2.4	Angiotensin II .....	12
1.2.2.5	Weitere Hormone, Autokaide und lokale sezernierte Faktoren .....	12
1.2.3	Zelluläre Faktoren .....	13
1.2.4	Lokales renales Renin-Angiotensin-System.....	14
1.2.5	Prorenin-Rezeptor .....	16
1.3	Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems für die Nierenentwicklung .....	17
1.4	Tubuläres Renin-Angiotensin-System und Diabetes mellitus.....	18
1.4.1	Diabetes mellitus .....	18
1.4.2	Diabetische Nephropathie.....	20
1.4.3	Rolle des lokalen Renin-Angiotensin-Systems beim Diabetes mellitus.....	22
2	Fragestellung und Zielsetzung.....	25
3	Methoden .....	26
3.1	Versuchstiere .....	26
3.1.1	Haltung der Versuchstiere.....	26
3.1.2	Verwendete Mauslinien.....	26
3.1.3	Generierung der Mauslinien.....	27
3.2	Genotypisierung.....	30
3.2.1	Gewinnung der genomischen DNA.....	30
3.2.2	PCR Analyse der genomischen DNA .....	31

3.2.3	Gelelektrophorese .....	32
3.3	Induktion des Knockouts bei Pax8/TetO-Cre Mäusen.....	32
3.4	Behandlungsmodelle .....	32
3.4.1	Streptozotocin.....	32
3.4.2	Diurese .....	33
3.4.3	SGLT2 Blockade .....	33
3.5	Histologie .....	33
3.5.1	Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd.....	33
3.5.2	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	34
3.5.3	Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten.....	34
3.5.4	Einbetten und Anfertigung von Paraffinschnitten .....	35
3.5.5	Immunfluoreszenzfärbungen von Paraffinschnitten .....	36
3.5.6	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	37
3.5.7	Periodic Acid Schiff (PAS) Reaktion .....	37
3.6	RNA Scope: <i>In Situ</i> Hybridisierung .....	38
3.7	Mikroskopie.....	39
3.7.1	Licht-/Fluoreszenzmikroskopie .....	39
3.7.2	Konfokale Mikroskopie .....	40
3.7.3	Transmissionselektronenmikroskopie.....	40
3.8	Mikrodissektion .....	41
3.9	RNA-Isolation und -Analyse .....	42
3.9.1	Isolation der Messenger-RNA aus renalem Gewebe.....	42
3.9.2	Isolation der Messenger-RNA aus Zellen .....	43
3.9.3	RNA Quantifizierung.....	43
3.9.4	cDNA-Synthese .....	43
3.9.5	Quantitative Real-Time PCR.....	44
3.10	Blutanalysen .....	45
3.10.1	Blutentnahme .....	45
3.10.2	Bestimmung der Plasmakonzentration von Prorenin und aktiven Renin.....	45
3.11	Urinanalysen.....	47

3.11.1	Spontanurin .....	47
3.11.2	Stoffwechselläufig .....	47
3.11.3	Bestimmung der Uringlukosekonzentration .....	47
3.11.4	Bestimmung der Reninkonzentration im Urin .....	47
3.11.5	Bestimmung der Albuminausscheidung .....	48
3.11.6	Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin .....	48
3.11.7	Bestimmung der Natrium- und Kalium-Ausscheidung.....	48
3.12	Bestimmung der Gewebekonzentration von Prorenin und aktiven Renin.....	49
3.13	Telemetrische Blutdruckmessung .....	50
3.14	Zellkultur .....	50
3.14.1	Stimulation mit Glukose und Succinat .....	51
3.15	Statistische Auswertung .....	51
4	Ergebnisse .....	52
4.1	Wahl des geeigneten Mausmodells für die Untersuchung des tubulären Renin-Systems .....	52
4.1.1	Charakterisierung der sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Maus .....	52
4.1.1.1	Untersuchung der Nierenentwicklung .....	53
4.1.1.2	Histologische Charakterisierung der Aquaporin2-Cre Mauslinie .....	55
4.1.2	Charakterisierung der tubulusspezifischen Renin Knockout-Maus.....	56
4.1.2.1	Untersuchung der renalen Renin mRNA Expression der Tubulus-Renin WT und KO Mäuse .....	58
4.1.2.2	Physiologische Parameter der Tubulus-Renin KO und WT Mäuse .....	59
4.1.3	Schlussfolgerung zu den Mausmodellen .....	59
4.2	Rolle des tubulären Renin-Angiotensin-Systems beim Diabetes mellitus.....	60
4.2.1	Tubuläre Reninexpression bei Diabetes mellitus: Proteinexpression .....	60
4.2.2	Tubuläre Reninexpression bei Diabetes mellitus: mRNA Expression .....	64
4.2.2.1	BAC Ren-GFP Mausmodell.....	64
4.2.2.2	RNAscope.....	65
4.2.3	Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung des tubulären Renins beim Diabetes mellitus.....	66

4.2.3.1	Immunfluoreszenzfärbungen von Tubulus-Renin KO und WT Mäusen...	67
4.2.3.2	Renin mRNA Expression in verschiedenen Nierenkompartimenten .....	68
4.2.3.3	Prorenin und aktives Renin im Nierengewebe.....	70
4.2.3.4	Renin-Exkretion im Urin.....	72
4.2.3.5	Prorenin und aktives Renin im Plasma .....	72
4.2.3.6	Untersuchung der Albuminausscheidung .....	73
4.2.3.7	Histologische Untersuchungen.....	74
4.2.3.8	Blutdruck bei STZ-Diabetes.....	77
4.2.4	Untersuchung möglicher Mediatoren der erhöhten RAS-Aktivität beim Diabetes.....	78
4.2.4.1	Diurese.....	78
4.2.4.2	SGLT2 Blockade.....	81
4.2.4.3	<i>In vitro</i> Stimulation der tubulären Reninexpression durch Glukose und Succinat.....	83
5	Diskussion.....	86
5.1	Wahl des geeigneten Mausmodells .....	86
5.1.1	Rolle des Sammelrohr-Renins bei der Nierenentwicklung – sammelrohrspezifische Renin KO Maus .....	86
5.1.2	Tubulusspezifische Renin KO Maus.....	88
5.2	Rolle des lokalen Renin-Systems bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie .....	89
5.2.1	Rolle des lokalen Renin-Systems bei den STZ-diabetischen tubulusspezifischen Renin WT und KO Mäusen.....	92
5.2.2	Mögliche Wirkungsmechanismen der gesteigerten lokalen Reninsynthese	96
5.2.3	Mögliche Ursachen für die gesteigerte lokale Reninsynthese .....	100
5	Zusammenfassung .....	103
6	Literatur .....	105
8	Anhang.....	120
8.1	Materialien und Geräte .....	120
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	127
8.3	Tabellenverzeichnis.....	129

8.4	Abkürzungsverzeichnis.....	129
8.5	Veröffentlichungen.....	134
8.6	Kongressbeiträge.....	134
8.7	Eidesstattliche Erklärung .....	135
9	Danksagung.....	136

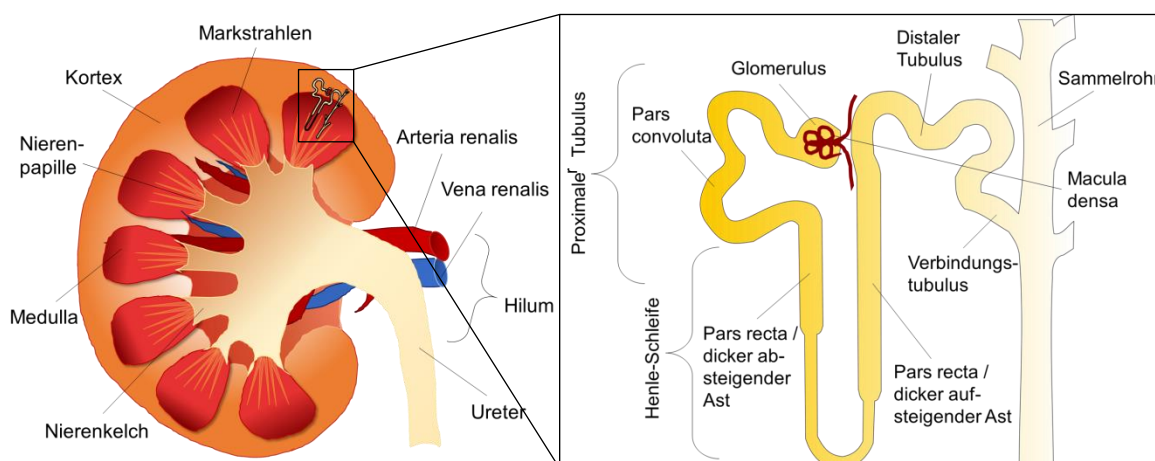




# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen der Nierenanatomie und -funktion

Die Nieren erfüllen lebensnotwendige Funktionen und sind daher für den menschlichen Organismus unverzichtbar. So scheiden sie Stoffwechselendprodukte mit dem Urin aus und kontrollieren die Elektrolyt- und Wasserhomöostase, sowie den Säure-Basen-Haushalt. Die Nieren können aber auch auf endokrinem Weg wichtige Körperfunktionen steuern, indem sie das für die Blutbildung essentielle Hormon Erythropoietin und das Vitamin D-Hormon Calcitriol, welches bei der Kontrolle des Kalziumstoffwechsels von Bedeutung ist, in die Blutzirkulation freisetzen. Außerdem wird in den Nieren die Protease Renin gebildet, die maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks und der Elektrolytbilanzierung beteiligt ist [1]. Die Nieren befinden sich beim Menschen paravertebral unterhalb des Zwerchfells im Retroperitonealraum. Wie in Abb. 1.1 gezeigt, befindet sich an der medialen Seite der Nieren eine Einstülpung, das so genannte Hilum. Dort tritt die Nierenarterie (Arteria renalis) in die Niere ein und die Nierenvene (Vena renalis) und der Ureter verlassen sie. Das Nierengewebe lässt sich makroskopisch in die hellere Nierenrinde (Kortex) und das dunklere Mark (Medulla) unterteilen. Die Medulla besteht aus etwa 10-12 pyramidenförmigen Untereinheiten, die an der Basis mit dem Kortex in Verbindung stehen. Die Spitze jeder Pyramide ragt als Nierenpapille in die Nierenkelche. Über feine Mündungen auf den Papillae, den Ductus papillares, gelangt der Harn ins Nierenbecken und wird über den Ureter zur Blase geleitet und dort gesammelt [1, 2]



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der Anatomie einer Niere im Querschnitt (Ansicht von ventral) und der Aufbau eines Nephrons.

### 1.1.1 Das Nephron und seine Funktionen

Das Nephron (Abb. 1.1) ist die kleinste funktionelle Einheit der Niere. Jede Niere besitzt etwa eine Million solcher Nephrone, die aus einem Glomerulus (Nierenkörperchen) und dem daran angeschlossenen Tubulussystem bestehen. Der Glomerulus ist aus einem kapillären Gefäßknäuel, mit einem zu- (Vas afferens) und einem ableitenden Blutgefäß (Vas efferens) und einer ihn umgebenden Kapsel (Bowman Kapsel) aufgebaut (Abb. 1.3). Pro Minute werden die Nieren von etwa 600 ml Blutplasma durchströmt, von dem ein konstanter Anteil (20%) als Ultrafiltrat in den Kapselraum der Bowman Kapsel filtriert wird (Primärharn). Der abgepresste Primärharn gelangt aus dem Kapselraum in das Tubulussystem und wird dort während der Passage durch Resorption und Sekretion letztlich zum Endharn [1].

Die Wand der Glomeruluskapillaren besteht aus Kapillarendothelzellen und einer angelagerten Basalmembran. Das Endothel der glomerulären Kapillaren zeichnet sich im Vergleich zum Endothel anderer Blutgefäße durch eine Besonderheit aus: Es ist fenestriert, also von ca. 60 nm großen Poren unterbrochen [3], die ca. 20-50% der gesamten endothelialen Fläche ausmachen [4]. Auf der anderen Seite der Basalmembran werden die Gefäße durch die Fußfortsätze der Podozyten bedeckt (Abb. 1.3). Diese hoch-differenzierten, komplexen Epithelzellen stellen den Feinfilter der glomerulären Filtrationsbarriere dar. Die podozytären Fußfortsätze sind interdigitierend miteinander verzahnt und so durch 30-40 nm breite Filtrationsschlitze voneinander getrennt [5], die durch ein Diaphragma, die sogenannte Schlitzmembran, miteinander verbunden sind. Die Einheit aus fenestriertem Endothel, glomerulärer Basalmembran sowie podozytärer Schlitzmembran bildet zusammen die **glomeruläre Filtrationsbarriere**. Jede der genannten Schichten trägt zur Größen- und Ladungsselektivität der Filtrationsbarriere bei [6]. Gelöste Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 6 kDa können die Filtrationsbarriere nahezu ungehindert passieren, sie werden also frei filtriert. Die Konzentration dieser Stoffe, z.B. Elektrolyte, Bikarbonat, Glukose, Peptidhormone und Aminosäuren, ist daher im Primärharn genauso hoch wie im Plasma. Die Filtration von Blutzellen und großen Plasmaproteinen mit einem Molekulargewicht von über 80 kDa (z.B. Immunglobuline) wird durch die Filtrationsbarriere unterbunden, d.h. sie gelangen nicht in den Primärharn. Mittlere Moleküle, mit einem Molekulargewicht zwischen 6 und 80 kDa, können in Abhängigkeit ihrer Größe filtriert werden. Die Filtrierbarkeit ist aber nicht nur von der Größe des Moleküls abhängig, auch seine Form und vor allem seine Ladung spielen eine Rolle. Negativ geladene Moleküle werden von den negativen Fixladungen des glomerulären Filters abgestoßen und passieren diesen erheblich schwerer als positiv geladene Moleküle. Da die meisten Plasmaproteine negativ geladen sind, wird ihre Filtration durch die Ladung zusätzlich erschwert [7].

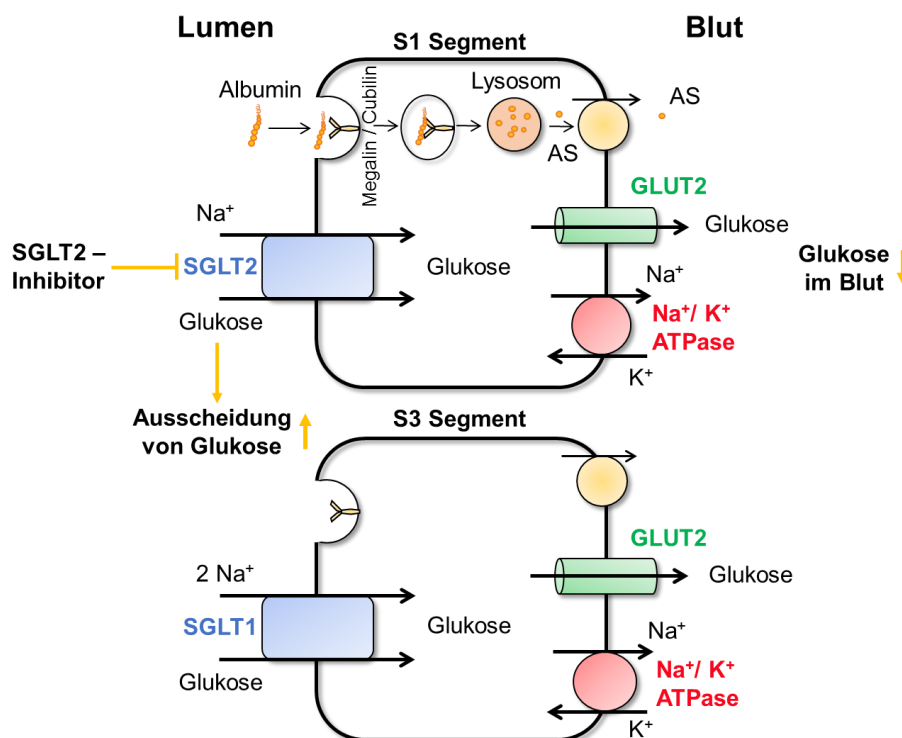
Albumin, der Hauptbestandteil der Plasmaproteine, besitzt als Indikator einer glomerulären Schädigung große klinische Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen wird Albumin,

dessen Molekulargewicht knapp unterhalb der Filtrationsgrenze liegt (66 kDa), nur minimal mit dem Urin ausgeschieden. Wegen seiner hohen Konzentration im Plasma gelangt trotz der geringen Durchlässigkeit eine signifikante Menge in den Primärharn. Diese filtrierte Menge wird bei einem gesunden Menschen zu 99% durch die proximalen Tubuli reabsorbiert [8], so dass letztendlich weniger als 30 mg Albumin pro Tag im Endharn erscheinen. Bei Schädigung der Filtrationsbarriere gelangen größere Mengen an Albumin in den Primärharn, was zu einem begrenzten Umfang durch verstärkte Resorption ausgeglichen werden kann. Wird die Transportkapazität des proximalen Tubulus jedoch überschritten, kommt es zu einer vermehrten Ausscheidung von Albumin im Urin. Eine Albuminurie liegt vor, wenn mehr als 30 mg Albumin pro Tag im Endharn ausgeschieden werden. Von einer Proteinurie spricht man, wenn die Proteinausscheidung mindestens 150 mg / Tag beträgt [6, 9].

Die Kapillaren des Glomerulus werden vom Mesangium gestützt, das aus den intra- und extraglomerulären Mesangialzellen besteht (Abb.1.3). Bei den Mesangialzellen handelt es sich um spezialisierte, kontraktile Zellen, die unter anderem Proteine phagozytisch aufnehmen und intrazellulär abbauen können.

Das Tubulussystem der Niere besteht aus mehreren morphologisch und funktionell unterschiedlichen Abschnitten, deren Hauptaufgabe die Bildung des Endharns aus dem Primärharn ist, also eine Anpassung der Harnzusammensetzung an den Bedarf zu erzielen. Das primäre Ultrafiltrat fließt zunächst in den **proximalen Tubulus**, welcher sich aus einem gewundenen Teil (Pars convoluta) und einem geraden Teil (Pars recta) zusammensetzt. Der proximale Tubulus weist eine sehr große Transportkapazität auf und ein Großteil des filtrierten Wassers und der Solute wird bereits hier wieder rückresorbiert. Treibende Kraft dieser Transportprozesse ist der elektrochemische Gradient für Natrium aus dem Extrazellulärraum in die Zelle. Dieser wird durch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase an der basolateralen Zellmembran aufrechterhalten, die Natrium im Austausch gegen Kalium aus der Zelle ins Interstitium pumpt [7]. So werden Monosaccharide, wie Glukose im proximalen Tubulus über die luminale Zellmembran durch Na<sup>+</sup>-gekoppelte Symporter in die Zelle transportiert (Abb. 1.2). Ohne für die Energiegewinnung eingesetzt zu werden, passiert die Glukose die Zelle und gelangt basolateral über einen Uniporter (GLUT2) aus der Zelle in das peritubuläre Interstitium. Der luminale Glukosetransport wird durch zwei unterschiedlich sättigbare Transportprozesse bewerkstelligt. Der Natrium-Glukose Cotransporter 2 (SGLT2) transportiert mit geringer Affinität Natrium und Glukose im Verhältnis 1 zu 1 in die proximale Tubuluszelle, wohingegen SGLT1, ein hochaffiner Transporter, den Transport von Glukose an zwei Na<sup>+</sup>-Ionen koppelt. Der SGLT2 wird vor allem in der ersten Hälfte des proximalen Tubulus exprimiert (S1 und S2 Segment) und bewältigt mit relativ geringem Energieaufwand die Resorption des größten Teils der filtrierten Glukose (90%), was in etwa 180 g pro Tag entspricht [10]. SGLT1 arbeitet gegen Ende des proximalen Tubulus, im geraden S3 Segment

[11] und ermöglicht durch seine hohe Affinität und die große treibende Kraft, die energieaufwändige Resorption der restlichen Glukose (10%) [12].



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Transportprozesse im proximalen Tubulus.** Über  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Symporter (SGLT 1 & 2) gelangt Glukose in die Zelle und diffundiert über den Uniporter GLUT2 ins Blut. Inhibierung des luminalen Transporters SGLT2 führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Glukose im Urin und einer Absenkung der Konzentration im Blut. Die basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pumpt unter ATP-Verbrauch 3  $\text{Na}^+$ -Ionen im Austausch gegen 2  $\text{K}^+$ -Ionen aus der Zelle. Proteine wie Albumin werden über den Megalin/Cubilin-Rezeptorkomplex erkannt, in Endozytosevesikeln aufgenommen, in Lysosomen zu Aminosäuren abgebaut und basolateral in den Blutkreislauf abgegeben.

Die maximale Transportrate der Niere für Glukose (Nierenschwelle) wird normalerweise bei einer Plasmakonzentration von 10 mmol / l erreicht. Im Nüchternzustand liegt die Glukoseplasmakonzentration im Bereich von 5 mmol / l, die Nierenschwelle wird somit erst bei Verdoppelung der Glukoseplasmakonzentration überschritten. Bei Patienten mit unbehandeltem Diabetes mellitus ist die Glukosekonzentration im Plasma auf das Vielfache der Norm erhöht. Dies führt zwangsläufig zu einem Anstieg der glomerulär filtrierte Glukosemenge, so dass die Resorptionskapazität der Tubuli rasch überschritten wird und die Glukose im Urin erscheint (Glukosurie). Die nichtresorbierte Glukose behindert aus osmotischen Gründen die Resorption von Wasser, was eine osmotische Diurese zur Folge hat [1].

SGLT2-Inhibitoren wirken über die Blockade des  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Glukosetransportes im proximalen Tubulus. Sie blockieren den SGLT2, verringern die Rückresorption von Glukose [13] und steigern entsprechend die renale Glukoseausscheidung (Abb. 1.2). So kann

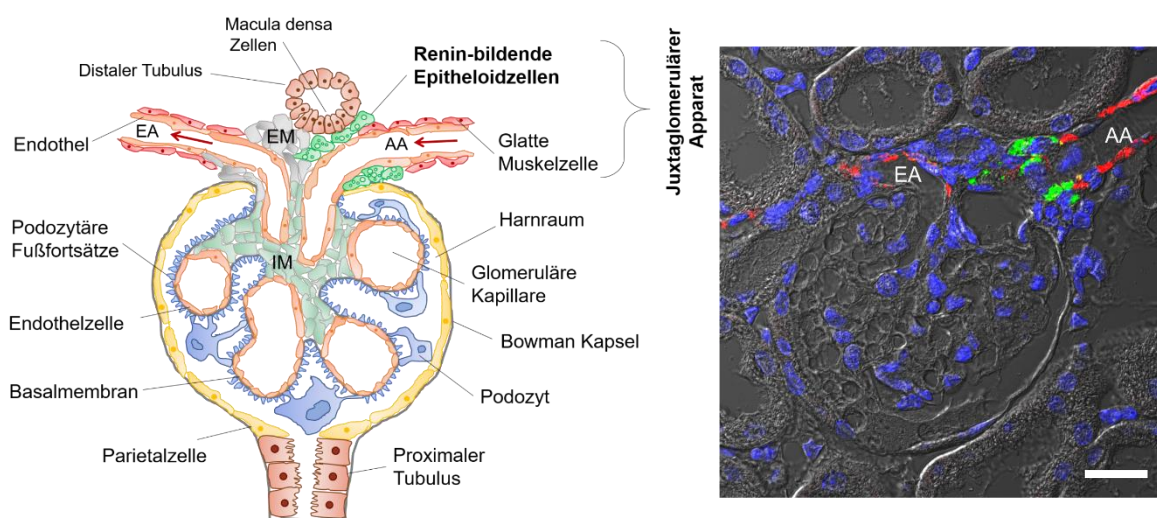
insulinunabhängig die Plasmaglukose-konzentration gesenkt werden. Einsatz finden diese SGLT2-Inhibitoren vor allem bei der Behandlung des Diabetes Typ 2 [14].

Weitere  $\text{Na}^+$ -abhängige Transportprozesse koppeln den Transport von Natrium über die luminale Zellmembran an die Resorption von Aminosäuren, Laktat sowie Phosphat und Sulfat. Der quantitativ bedeutsamste  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Transportprozess im proximalen Tubulus ist jedoch der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (NHE3), der  $\text{H}^+$ -Ionen im Austausch gegen Natrium aus der Zelle transportiert. Die  $\text{H}^+$ -Ionen reagieren im Tubuluslumen mit filtriertem  $\text{HCO}_3^-$  zu  $\text{CO}_2$ . Das gebildete  $\text{CO}_2$  diffundiert in die Zelle und wird dort, unter Vermittlung von Karboanhydrase, wieder in  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  umgewandelt und kann die Zelle verlassen. Durch die genannten Mechanismen wird der größte Teil an filtriertem  $\text{HCO}_3^-$  resorbiert. Insgesamt werden so im proximalen Tubulus etwa 2/3 des filtrierten Kochsalzes und Wassers resorbiert, es findet hier also ein Massentransport statt [1].

Die Resorption von Proteinen, wie z.B. Albumin, erfolgt im proximalen Tubulus durch Endozytose. Glomerulär filtriertes Albumin wird luminal von Endozytoserezeptoren erkannt, in Lysosomen aufgenommen und basolateral wieder in den Blutkreislauf abgegeben (Abb. 1.2) [15].

Die nachfolgende **Henle-Schleife** dient in erster Linie der Harnkonzentrierung. Durch die schleifenförmige Anordnung entsteht ein Gegenstromsystem, das zum Aufbau der hohen Osmolaritäten im Nierenmark beiträgt.

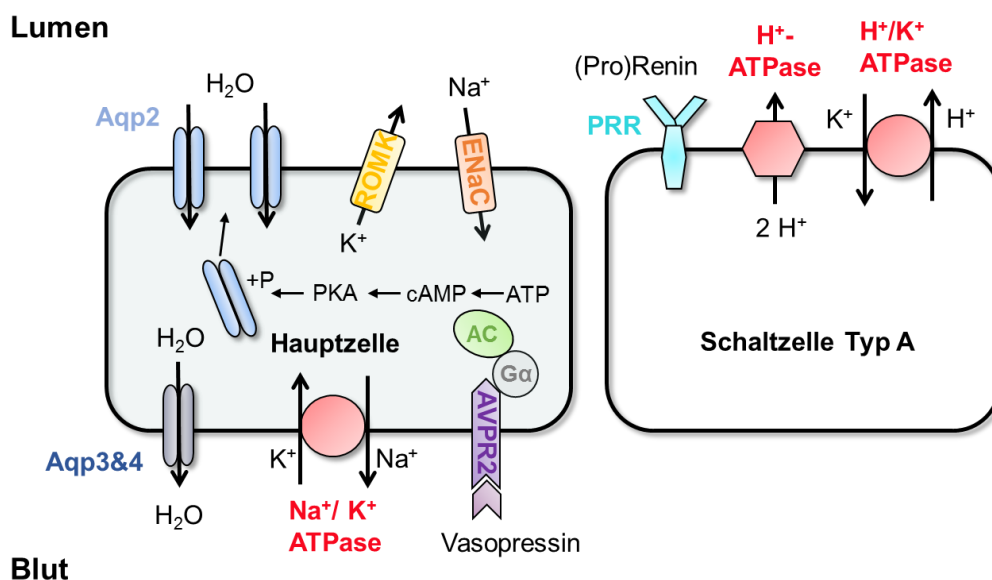
Das Ende der aufsteigenden Henle-Schleife, bzw. der Übergang zum distalen Tubulus, bildet eine Kontaktstelle mit dem Gefäßpol des eigenen Glomerulus. Diese Region des Nierenkörperchens wird auch **juxtaglomerulärer Apparat** (JGA) genannt (Abb. 1.3). Seine Aufgabe ist unter anderem, einen übermäßigen Salz- und Wasserverlust zu verhindern, indem er die glomeruläre Filtration an die Transportkapazität des proximalen Tubulus und der Henle-Schleife anpasst. Diese fein eingestellte Koordination zwischen glomerulärer Filtration und tubulärer Resorption wird auch tubuloglomerulärer Feedback (TGF) genannt. Die Macula densa-Zellen, die in direktem Kontakt mit den extraglomerulären Mesangiumszellen stehen (Abb. 1.3), messen die  $\text{NaCl}$ -Konzentration des Harns und passen die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), über eine Vasokonstriktion oder Vasodilatation des Vas afferens, an. Außerdem ist der JGA, genauer gesagt, die Epitheloidzellen der Wand des Vas afferens, der Hauptbildungsort des Enzyms Renin, welches maßgebend an der Regulation des Blutdrucks und des Extrazellulärvolumens beteiligt ist. Die Sekretion von Renin kann von unterschiedlichen Faktoren, wie einem verminderten Blutdruck in der afferenten Arteriole, einer Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren des Sympathikus oder einer niedrigen Salzkonzentration im Bereich der Macula densa (MD) ausgelöst werden.



**Abb. 1.3:** Links: **Schematische Darstellung eines Glomerulus** (EA: efferente Arteriole, AA: afferente Arteriole, EM: extraglomeruläres Mesangium, IM: intraglomeruläres Mesangium. Rechts: **Immunhistochemische Aufnahme eines Glomerulus** mit afferenter und efferenter Arteriole. Grün: Renin (juxtaglomeruläre Zellen); Rot: Glattmuskelaktin (glatte Muskelzellen). Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

Von der MD gelangt die Tubulusflüssigkeit in den distalen Teil des Nephrons, gegliedert in den distalen Tubulus, das Verbindungsstück und das Sammelrohr. Das Sammelrohr lässt sich weiter in ein kortikales und ein medulläres Segment aufgliedern. Diese Abschnitte sind für die akkurate Feinabstimmung des Endharns verantwortlich [16]. Die renale Salz- und Wasser-Ausscheidung wird an die physiologischen Vorgänge im Körper und die über die Nahrung aufgenommenen Elektrolyte angepasst. Der an die dicke aufsteigende Henle-Schleife anschließende **distale Tubulus** ist wieder wasserdurchlässig und trägt, im Vergleich zum proximalen Nephron, nur zu einem geringen Anteil (5-10%) zu der Resorption des filtrierten NaCl bei [16]. Diese Resorption erfolgt über einen Thiazid-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Symporter (NCC) in der apikalen Membran, der elektroneutral Natrium und Chlorid aus dem Tubuluslumen in die Zelle transportiert. Calbindin, ein Kalzium-bindendes Protein, wird bei Mäusen in der Niere selektiv im distalen Tubulus und dem Verbindungsstück exprimiert [17]. Es dient daher in der folgenden Arbeit als Marker für diesen Tubulusabschnitt. Calbindin bindet in der distalen Tubuluszelle das eingeströmte Kalzium und beschleunigt somit dessen Diffusion durch das Zytosol. Im Anschluss an den distalen Tubulus folgt das Verbindungsstück. Hier löst der epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC) den NCC als wesentlichen apikalen Natrium-Importweg ab.

Das Endstück des Nephrons bildet das **Sammelrohr**, wobei jeweils die distalen Tubuli mehrerer Nephrone in ein gemeinsames Sammelrohr münden und so letztendlich die Tubulusflüssigkeit über etwa 300 Sammelrohre das Nierenbecken erreicht. Das Sammelrohr besteht aus zwei Zelltypen, den Hauptzellen, die den Großteil des Epithels bilden und den Schaltzellen (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Sammelrohrzellen.** Die Bindung von Vasopressin an dessen Rezeptor löst in der Hauptzelle des Sammelrohrs den Einbau von Aquaporin2-Kanälen in die apikale Membran aus und bewirkt somit den Einstrom von Wasser aus dem Lumen in die Zelle. Basolateral gelangt das Wasser über die Aquaporin3 & 4 Kanäle ins Blut. Das über ENaC aufgenommene Natrium wird basolateral über die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aus der Zelle transportiert. Kalium verlässt über den ROMK-Kanal die Hauptzelle. Die Schaltzelle von Typ A sezerniert Protonen über die H<sup>+</sup>-ATPase oder die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase der apikalen Zellmembran. Luminal lokalisiert ist in der Schaltzelle der Prorenin-Rezeptor (PRR), ein akzessorischer Bestandteil der H<sup>+</sup>-ATPase.

Für die Hauptzellen charakteristisch sind zum einen, die amiloridempfindlichen und durch Aldosteron steuerbaren epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanäle (ENaC) und die K<sup>+</sup>-Kanäle (ROMK) in der luminalen Zellmembran. Über hormonelle Regulation wird in den Hauptzellen des Sammelrohrs, die Urinosmolarität und der Natrium-Gehalt eingestellt. Das antidiuretische Hormon Vasopressin (ADH) stimuliert den Einbau von Aquaporin2 (Aqp2) in die apikale Membran der Hauptzellen. ADH wird im Hypothalamus produziert und bei Volumenmangel und v.a. bei einer erhöhten Plasmaosmolarität über den Hypophysenhinterlappen in den Blutkreislauf sezerniert. ADH bindet an die in den Hauptzellen des Sammelrohrs exprimierten V2-Rezeptoren. Der V2-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der die Adenylatzyklasen (AC) 3 und 6 aktiviert. Das entstandene cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche letztendlich den Aqp2-Kanal phosphoryliert und so dessen Einbau in die apikale Membran stimuliert [18]. Wasser kann nun entlang des Osmolaritätsgradienten vom Lumen ins Interstitium strömen, die intratubuläre Osmolarität steigt also an und der Harn wird konzentriert. Bei ausbleibender Stimulation verlagert sich der Kanal, in Vesikeln gespeichert, wieder ins Zellinnere zurück. Da Aqp2 in der Niere nur in den Hauptzellen exprimiert wird,

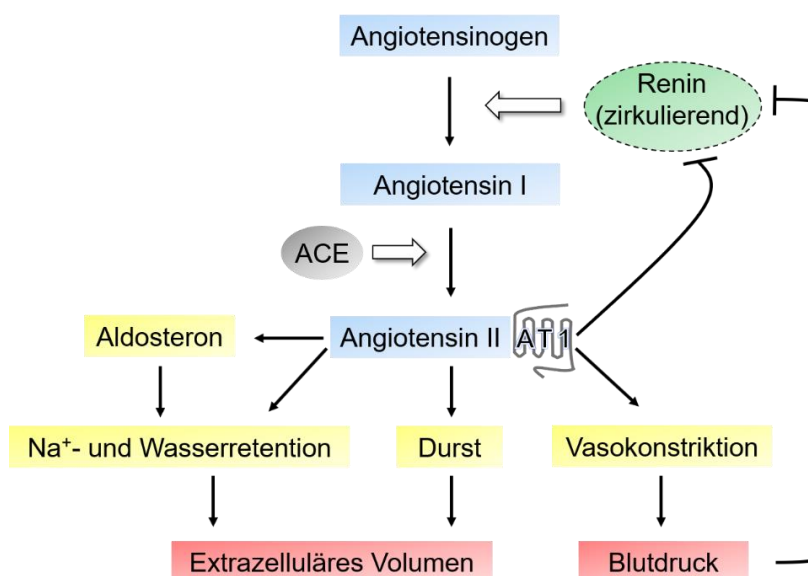
wird es in der folgenden Arbeit als Marker für diesen Zelltyp herangezogen [19]. Basolateral wird die transzelluläre Wasserresorption über Aquaporin3 (Aqp3) und Aquaporin4 (Aqp4) ermöglicht [20, 21]. Das Mineralokortikoid Aldosteron, das aus der Zona glomerulosa der Nebenniere freigesetzt wird, bindet an den intrazellulären Mineralokortikoid-Rezeptor und fördert im Sammelrohr vor allem die Resorption von Natrium. Dies erfolgt über die Transkription und Plasmamembran-lokalisierung des ENaC und die Aktivierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase [22, 23]. Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase erzeugt den elektrochemischen Gradienten, der die Triebkraft für die Aufnahme von Natrium darstellt. Der vermehrte Transport von Natrium aus dem tubulären Lumen über das Epithel hat auch eine vermehrte Wasserrückresorption zur Folge, die zu einem Anstieg des Blutvolumens und damit des Blutdrucks führt.

Der zweite Zelltyp im Sammelrohr sind die Schaltzellen. Sie sezernieren entweder Protonen (Typ A) oder Bicarbonat (Typ B) und regulieren somit den Säure-Basen-Haushalt. Die Typ A-Schaltzellen (Abb. 1.4) sind auf die Ausscheidung von Protonen über die H<sup>+</sup>-ATPase oder die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase der apikalen Zellmembran spezialisiert. Durch die Entdeckung des Prorenin-Rezeptors als ein akzessorisches Protein der H<sup>+</sup>-ATPase rückte auch die Rolle des Renins bei der Steuerung der Typ-A Schaltzellen in den Blickpunkt. Genau wie die H<sup>+</sup>-ATPase, wird der Prorenin-Rezeptor ubiquitär exprimiert und ist somit eine wichtige Komponente Renin- und Prorenin-abhängiger Prozesse (siehe Punkt 1.2.5). Charakteristisch für die Typ B-Schaltzelle ist das Sezernieren von Bicarbonat, welches vorwiegend durch den luminalen Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher Pendrin, basolaterale Cl<sup>-</sup>-Kanäle und eine basolaterale Protonenpumpe (H<sup>+</sup>-ATPase) bewerkstelligt wird [24].

## 1.2 Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (Abb. 1.5), kurz RAS, reguliert den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des Körpers und wirkt somit in entscheidender Weise auf den Blutdruck ein. Neben dieser physiologischen Rolle kommt dem RAS auch eine wesentliche Bedeutung bei Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen, z.B. bei der diabetischen Nephropathie, zu. Entsprechend gehören RAS-Inhibitoren, die die Aktivität oder die Wirkung des Systems hemmen, zur Standardtherapie bei diesen Erkrankungsgruppen. Die Aspartyl-Protease Renin spaltet, von dem hauptsächlich in der Leber gebildeten Glykoprotein Angiotensinogen, das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) ab. Dieses wird anschließend durch das, vor allem im Lungenepithel exprimierte, Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) um zwei Aminosäuren zu Angiotensin II (ANG II) verkürzt. ANG II als eigentlicher Mediator des RAS, besitzt zahlreiche biologische Wirkungen, die in der Kontrolle des Extrazellulärvolumens und des Blutdrucks zusammenspielen. Die klassischen Wirkungen von ANG II werden über die Aktivierung des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors (AT<sub>1</sub>) vermittelt [1].





**Abb. 1.5: Schematische Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Systems.** Angiotensinogen wird mit Hilfe von Renin in ANG I umgesetzt und anschließend durch das ACE um zwei Aminosäuren verkürzt, so dass ANG II entsteht. ANG II als eigentliches Effektorhormon vermittelt seine physiologische Wirkung indem es eine Vasokonstriktion der glatten Muskulatur, die Natrium- und Wasser-Retention in der Niere, die Sekretion von Aldosteron, sowie Durst und Salz hunger auslöst. Letztendlich wirkt das RAS regulierend auf das Blutvolumen und somit den Blutdruck. Das zirkulierende RAS wird über negative Rückkopplungsmechanismen reguliert.

So stimuliert ANG II im proximalen Tubulus direkt die Natriumresorption über die Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (NHE3) in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen [25]. ANG II erhöht die Synthese und Sekretion von Aldosteron in der Nebennierenrinde und bewirkt dadurch in den Verbindungstubuli und in den Sammelrohren die Reabsorption von Natrium und gleichzeitig die Sekretion von Kalium und Protonen. Da der Wasserhaushalt eng an den Elektrolythaushalt gekoppelt ist, reguliert Aldosteron maßgeblich die Volumenhomöostase und damit den Blutdruck des Körpers [26]. Ferner aktiviert ANG II die Sekretion von ADH aus dem Hypophysenhinterlappen und erhöht dadurch die Wasserreabsorption in den Sammelrohren. Zentral bewirkt ANG II Durstgefühl und Salzappetit und führt so letztendlich zu einer Zunahme des Extrazellulärvolumens. Weiter induziert ANG II eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen, und bewirkt damit auch unmittelbar einen Anstieg des Blutdrucks. Dieser Blutdruckanstieg wird mittelfristig durch die Erhöhung des Extrazellulärvolumens unterstützt [7].

Das im Blut zirkulierende Renin, welches zumindest unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich in den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet wird, ist der limitierende Faktor für die Synthese von ANG II, da sowohl Angiotensinogen als auch ACE, zumindest beim Menschen, im Überschuss vorhanden sind. Folglich ist die Synthese- und Sekretionsrate von Renin der Ansatzpunkt vieler negativer Feedback-Schleifen zur Regulation des RAS. Beispielsweise wirken ein hoher systemischer Blutdruck oder eine erhöhte tubuläre Kochsalzkonzentration hemmend auf die Synthese und Sekretion

von Renin. Auch ANG II selbst blockiert, durch direkte negative Rückkopplung über AT<sub>1</sub>-Rezeptoren, die Reninfreisetzung aus den JG-Zellen [27-29].

### 1.2.1 Reninsynthese und -sekretion

In der Niere erfolgt die Synthese von Renin unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich in den juxtaglomerulären (JG) -Zellen. Hier findet die Transkription des auf Chromosom 1 gelegenen Ren1<sup>c</sup>-Gens statt. Im Gegensatz zu anderen Säugetierarten besitzen manche Labormäusestämme (z.B. 129 Sv, Swiss) zwei Renin-Gene, Ren1<sup>d</sup> und Ren2. Es wird davon ausgegangen, dass Ren2 aus einer Genduplikation des Ren1 hervorgegangen ist [30, 31]. Alle Reningene codieren für Proteine mit sehr großer Sequenzhomologie. Aufgrund geringer Unterschiede der Aminosäuresequenz werden sie jedoch unterschiedlich glykosyliert [32]. Anders als Ren1<sup>c</sup> und Ren1<sup>d</sup>, besitzt das Ren2 Genprodukt keine Glykosylierungsstellen. Da die Glykosylierung als Erkennungssignal für die Sortierung in den Weg der regulierten Exozytose dient, wird das Ren2 Protein nicht durch regulierte Exozytose sezerniert, sondern nur konstitutiv freigesetzt [33]. Renin wird zunächst als Prä-Prorenin mit einer molekularen Masse von 48 kDa translatiert. Durch die Abspaltung der Präsequenz, welche das Signalpeptid für die Translokation ins endoplasmatische Retikulum darstellt, entsteht das enzymatisch inaktive Prorenin. Nach dem Transport durch den Golgi-Apparat, wird Prorenin im weiteren Verlauf entweder konstitutiv sezerniert oder durch das Anhängen eines Mannose-6-Phosphatrests glykosyliert [33, 34], anschließend in lysosomenähnliche Vesikel verpackt und dort für die regulierte Exozytose gespeichert [35]. Lediglich 25% des synthetisierten Prorenins wird den Speichergranula zugeführt und dort in aktives Renin umgewandelt [36, 37]. Die Aktivierung zu Renin geschieht im Inneren der Vesikel durch die Abspaltung der 43 Aminosäuren-langen, N-terminalen Pro-Sequenz. Dieser Aktivierungsprozess ist noch nicht vollständig geklärt, die Beteiligung von Cathepsin B oder den Prohormon-Konvertasen, die sich zusammen mit Prorenin in den Vesikeln finden lassen, wird diskutiert [27, 38, 39]. Die Proteolyse wird durch den in den Vesikeln vorliegenden niedrigen pH-Wert von 4 - 6 begünstigt. Das aktive Renin (36 – 41 kDa) wird dann bei Bedarf, über regulierte Exozytose aus den Speichervesikeln freigesetzt [29].

### 1.2.2 Regulation der Reninsynthese und -sekretion

Als Schlüsselenzym des RAS unterliegt die Synthese und Sekretion von Renin einer präzisen Steuerung. So wird gewährleistet, dass der Körper auf Blutdruckänderungen und Störungen des Salz- und Wasserhaushalts adäquat reagieren kann. Aus diesem Grund wird die Reninfreisetzung durch eine Vielzahl von intrarenal gebildeten und systemischen Faktoren reguliert. Unter der Vielzahl von Regulationsfaktoren kommt hier dem arteriellen Blutdruck,

dem Kochsalzbestand bzw. der Kochsalzaufnahme des Körpers und dem sympathischen Nervensystem die größte Bedeutung zu [29, 40].

### 1.2.2.1 Blutdruck

Der Blutdruck ist ein zentraler Regulator der Aktivität des RAS. Ein Anstieg des arteriellen Blutdrucks inhibiert, als Teil einer negativen Feedback-Schleife die Synthese und Sekretion von Renin, während ein Abfall zu einer Stimulation der Reninfreisetzung aus den JG-Zellen führt [41]. Für die Vermittlung des Signals wird ein Barorezeptor verantwortlich gemacht, der in der Niere selbst lokalisiert zu sein scheint [42]. Es wird vermutet, dass der Dehnungsreiz, ausgelöst durch erhöhten renalen Perfusionsdruck, zu einem Kalzium-Influx in die Gefäßmuskelzellen und JG-Zellen des juxtaglomerulären Apparats führt. Der Anstieg des intrazellulären Kalziums stellt zum einen ein inhibitorisches Signal für die Reninfreisetzung dar, zugleich führt die Zunahme der Kalziumkonzentration zu einer Kontraktion der glatten Muskelzelle und bewirkt so eine Vasokonstriktion des Vas afferens. Experimente mit isolierten JG-Zellen bestätigten eine verminderte Expression und Sekretion von Renin, als Antwort auf eine mechanische Dehnung [43, 44].

### 1.2.2.2 Salzhaushalt

Ein weiterer wichtiger Faktor der Regulation des RAS ist der Salzhaushalt des Körpers. Kochsalzarme Ernährung aktiviert die Synthese und Sekretion von Renin, während eine erhöhte Aufnahme von Kochsalz, einen inhibierenden Effekt zeigt [45]. Für die Vermittlung der Salz-abhängigen Veränderung der RAS-Aktivität werden verschiedene Mechanismen und Faktoren diskutiert [40]. Akute Veränderungen der Kochsalzkonzentration werden vermutlich über den intrarenalen MD-Mechanismus gesteuert. MD-Zellen sind spezialisierte Epithelzellen des distalen Tubulus, die in direktem Kontakt mit der afferenten Arteriole des jeweiligen Nephrons stehen. Sie detektieren die tubuläre Kochsalzkonzentration mittels der Transportaktivität des in ihrer apikalen Zellmembran gelegenen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Transporters NKCC2 und leiten ein Signal an die Renin-produzierenden Zellen der afferenten Arteriole weiter [46, 47]. Potentielle Mediatoren für die Signalweiterleitung zu den Renin-produzierenden Zellen sind Adenosin/ATP [48, 49], bzw. Prostaglandine [50] und Stickstoffmonoxid (NO) [51]. Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) und NO wirken kurzfristig stimulierend auf die Reninsekretion [52, 53]. Das Abbauprodukt von ATP, Adenosin, hemmt hingegen die Reninsekretion und bewirkt außerdem eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriole [54, 55].

### 1.2.2.3 Sympathisches Nervensystem

Katecholamine, wie Adrenalin und Noradrenalin sind physiologisch wichtige direkte Stimulatoren der Reninsekretion. Entsprechend führt eine Aktivitätssteigerung der sympathischen Nerven zu einer erhöhten Freisetzung von Renin.  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren wurden durch Ligandenbindungsstudien, *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie auf JG-Zellen nachgewiesen [56-58]. Die aus den sympathischen Nervenenden freigesetzten Katecholamine binden an die  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren der JG-Zellen und führen so zu einer Aktivierung von Adenylatzyklen. Dies hat einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Folge, was letztendlich zu einer verstärkten Expression und Sekretion von Renin führt [59-61]. Die pharmakologische Blockade der  $\beta_1$ -Rezeptoren oder renale Denervation führen hingegen zu einer erheblich verringerten Reninsekretion [62, 63].

### 1.2.2.4 Angiotensin II

Die Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat in den Blutkreislauf führt über die RAS-Kaskade zu einer vermehrten Bildung von ANG II. Neben seinem vasokonstriktorisches Effekt übt ANG II auch eine inhibierende Funktion auf die Sekretion und Synthese von Renin, im Sinne einer negativen Rückkopplung, aus [27]. *In vivo* Experimente, in denen die Wirkung von ANG II mit  $AT_1$ -Rezeptor Antagonisten blockiert oder die ANG II Bildung durch ACE Inhibitoren gehemmt wurde, zeigten einen starken Anstieg der Reninsynthese und -sekretion [64, 65], während die Reninfreisetzung durch eine exogene Infusion mit ANG II gehemmt wird [66]. Ein weiteres Indiz für die regulatorische Wirkungsweise von ANG II liefern  $AT_{1a}$ -Rezeptor Knockout Mäuse, in denen eine deutliche Rekrutierung Renin-bildender Zellen vorzufinden ist [67]. Der Effekt wird über  $AT_1$ -Rezeptoren vermittelt, die an der Oberfläche der JG-Zellen zu finden sind. ANG II löst einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aus und wirkt so inhibierend auf die Reninsekretion. Der Effekt, den ANG II auf die Reninsynthese und -sekretion ausübt, scheint also sowohl über direkte negative Rückkopplung, als auch auf indirektem Wege über die Veränderung des systemischen Blutdrucks vermittelt zu werden [40].

### 1.2.2.5 Weitere Hormone, Autokaide und lokale sezernierte Faktoren

Die Regulation der Reninsynthese und -sekretion ist sehr komplex und wird neben den oben beschriebenen systemischen Faktoren noch von einer Vielzahl lokal wirkender Substanzen, Hormone und Autokaide beeinflusst. Zu den wichtigsten stimulierenden Faktoren des RAS zählen NO [53, 68], Prostaglandine  $PGE_2$  und  $PGI_2$  [69, 70] sowie Glukokortikoide [71]. Ein

weiterer Faktor der auf parakrine Weise die Reninsynthese stimuliert ist Succinat. Das Citrat-Zyklus Intermediat bindet an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR91, der auf den Macula densa-Zellen exprimiert wird und führt über den MAPK-Signalweg zu einer Erhöhung der PGE<sub>2</sub>-Freisetzung, die schließlich die Reninsekretion stimuliert [72]. Aus weiteren Studien geht hervor, dass der GPR91-Rezeptor bei hohen Glukose-konzentrationen [73] und im experimentellen Diabetesmodell eine relevante Rolle bei der Freisetzung von Renin spielen könnte [74, 75]. Inhibierend auf die Synthese und Sekretion von Renin wirken hingegen Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) [76], Interleukin-1 [77, 78] und -6 [79], Adenosin [80-82], das atriale natriuretische Peptid ANP [83, 84], Endotheline [85, 86] und auch ADH [87].

### 1.2.3 Zelluläre Faktoren

Auf zellulärer Ebene wird die Reninsynthese und -sekretion durch das Zusammenspiel der klassischen second messenger Moleküle Kalzium, zyklisches AMP (cAMP) und zyklisches GMP (cGMP) kontrolliert [36, 88].

Das second messenger Protein **cAMP** ist der primäre intrazelluläre Stimulator der Reninsekretion. Seine intrazelluläre Konzentration unterliegt dem Zusammenspiel aus der Produktion durch Adenylatzyklen und der Degradierung durch Phosphodiesterasen (PDE). Die Aktivierung des cAMP-Signalwegs erfolgt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie die  $\beta$ -Adrenorezeptoren oder Prostaglandin-Rezeptoren. Die wichtigen Isoformen für die cAMP-Produktion in den JG-Zellen sind die Adenylatzyklen AC 5 und AC 6 [89, 90]. Wie bereits angedeutet, stimuliert auch eine Inaktivierung der Phosphodiesterasen, welche cAMP zu 5'-AMP hydrolysieren, die Reninsekretion. Die nicht-selektive Blockade der PDE-Aktivität durch 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) führt so zu einer gesteigerten Reninsekretionsrate [91]. Die Wirkung von cAMP auf die Renintranskription erfolgt vermutlich unter Beteiligung der cAMP abhängigen Proteinkinase A, die downstream wiederum andere, bisher unbekannte Proteine phosphoryliert [88, 92].

**Kalzium** spielt bei der Regulation der Reninfreisetzung eine eher untypische Rolle. Während eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration, in einer Vielzahl von anderen sekretorischen Zellen die Exozytose von Speichervesikeln initiiert [93], wirkt Kalzium in den JG-Zellen der Niere inhibitorisch auf die Sekretion von Renin. Man spricht daher auch vom Kalzium-Paradoxon der Reninfreisetzung [27]. So vermitteln viele Hormone, wie zum Beispiel Angiotensin II, Endotheline und Vasopressin ihre sekretionshemmende Wirkung durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in den JG-Zellen [94-97]. Als mögliche Beteiligte an der Kalzium-abhängigen Suppression der Reninfreisetzung werden die Adenylatzyklen AC 5 und AC 6 diskutiert. Hohe Kalziumkonzentrationen hemmen diese Adenylatzyklen, was wiederum zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration führt und somit sekretionshemmend wirkt [89, 98].

Ein weiterer Faktor, der sich auf die Reninsekretion in den JG-Zellen auswirkt, ist die intrazelluläre Konzentration an **cGMP**. Allgemein wird in der Zelle die cGMP-Bildung aus Guanosintriphosphat (GTP) durch membranständige und lösliche Guanylatzyklen katalysiert. Die lösliche Form der Guanylatzyklen wird durch NO aktiviert. Membranständige Guanylatzyklen fungieren dagegen als Rezeptoren und binden beispielsweise das ANP. Die Rolle von cGMP bei der zellulären Reninregulation ist nicht eindeutig. So kann ein Anstieg der cGMP-Konzentration zu einer Aktivierung oder Hemmung der Reninfreisetzung führen [92, 99, 100]. Diese unterschiedlichen Effekte von cGMP beruhen vermutlich darauf, dass cGMP bei unterschiedlichen Konzentrationen verschiedene Zielmoleküle anspricht. Ein Zielmolekül von cGMP ist die durch cGMP hemmbare Phosphodiesterase-3 (PDE-3). Die Inhibition der PDE-3 führt über eine verringerte Degradation von cAMP, zu einem erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle und damit zu einer Aktivierung des Renin-systems. Die Aktivität der PDE-3 stellt somit ein Bindeglied zwischen dem cAMP-Weg und der cGMP-Signalkaskade dar [101, 102]. Über diesen Weg stimuliert beispielsweise NO die Reninsekretion [53].

#### **1.2.4 Lokales renales Renin-Angiotensin-System**

Der Blickwinkel auf das RAS hat sich mit der Einführung des Konzepts der „lokalen“ bzw. „Gewebs-“ Renin-Angiotensin-Systeme maßgeblich verändert. So existieren neben dem oben skizzierten zirkulierenden RAS, das schon lange bekannt und gut charakterisiert ist, auch lokale Gewebs-Renin-Angiotensin-Systeme, u.a. im Gehirn, dem Reproduktionstrakt und der Nebenniere [103]. Auch im Tubulussystem der Niere werden alle Komponenten des RAS, die zur Bildung von ANG II nötig sind, exprimiert [104, 105].

Trotz seiner großen molekularen Masse (61 - 65 kDa) kann das aus der Leber stammende Angiotensinogen im Glomerulus aus dem Blut abfiltriert werden und so das Tubulussystem erreichen [106, 107]. Darüber hinaus wurde Angiotensinogen mRNA in der Gesamtniere und im proximalen Tubulus nachgewiesen und gezeigt, dass proximale Tubuluszellen Angiotensinogen bilden und ins tubuläre Lumen sezernieren [106, 108]. Schließlich wird Angiotensinogen im Urin ausgeschieden [109, 110].

Neben den Zellen des JG-Apparats exprimieren auch proximale Tubuluszellen und v.a. die Hauptzellen des Verbindungstubulus und des Sammelrohrs Renin-mRNA und -Protein [27, 111-118]. Die Reninexpression und -aktivität in den Tubuluszellen ist unter physiologischen Bedingungen jedoch deutlich geringer, als in den reninbildenden JG-Zellen. Die tubuläre Reninexpression unterliegt, wie in den JG-Zellen, einer ausgeprägten Regulation. So stimuliert eine reduzierte Salzaufnahme oder Dursten die Reninexpression, sowohl im proximalen Tubulus und im Verbindungstubulus, als auch in den JG-Zellen, es kommt hier also zu einer gleichsinnigen Regulation [29, 117, 119]. Interessanterweise wird die

Reninexpression und –aktivität in den reninbildenden JG-Zellen und den Hauptzellen des Sammelrohrs bei Angiotensin II-abhängigen Hypertonusformen gegensätzlich reguliert. In JG-Zellen führt die Infusion von ANG II oder eine Nierenarterienstenose (in der kontralateralen Niere) über erhöhte ANG II Plasmakonzentrationen (direkte Hemmung), sowie über den resultierenden arteriellen Blutdruckanstieg zu einer Hemmung der Reninsynthese und –freisetzung [29, 40]. Im Gegensatz dazu, wird im Sammelrohr und im medullären Nierengewebe die Reninexpression durch hohe ANG II Plasmakonzentrationen stimuliert und die Reninausscheidung im Urin nimmt zu [113, 114, 120-123]. Ein nicht zu vernachlässigender Bestandteil des lokalen intrarenalen RAS ist das Prorenin, dessen Rolle vor allem beim Diabetes mellitus diskutiert wird. So steigt bei diabetischen Ratten nicht nur die Proreninkonzentration im Plasma, sondern parallel dazu auch die Bildung des inaktiven Reninvorläufers im Sammelrohr an [124].

Auch das ACE, welches die Umwandlung von ANG I in ANG II katalysiert, wird im Tubulussystem der Niere exprimiert und im Urin ausgeschieden [106, 125].

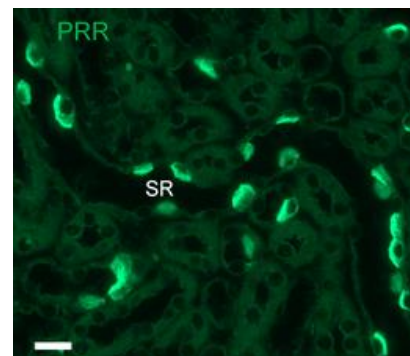
Neben der Expression der bereits erwähnten Komponenten des RAS gibt es auch Hinweise darauf, dass ANG II tatsächlich lokal intrarenal gebildet wird. So ist die luminaire ANG II Konzentration im proximalen Tubulus um ein Vielfaches höher als im Blutplasma und diese hohen Konzentrationen sind nicht durch Filtration aus dem Plasma zu erklären [126-128]. Die ANG II Konzentration in den übrigen Tubulusabschnitten des Nephrons ist nicht bekannt. Auch im Nierengewebe sind die Konzentrationen von ANG I und ANG II um ein Vielfaches höher als im Plasma und auch diese Konzentrationsunterschiede sind nur teilweise durch eine Aufnahme der Peptide aus dem Blut, sondern vielmehr durch lokale Produktion in der Niere, zu erklären [129]. Die intrarenale Infusion des Reninantagonisten Aliskiren hemmt bei Ratten die ANG II Ausscheidung im Urin, ohne die zirkulierende ANG II Konzentration zu vermindern, was ebenfalls für eine tubuläre ANG II Bildung spricht [121]. Darüber hinaus hemmt eine Infusion von ANG II die Reninbildung in renalen JG-Zellen. Trotz der Hemmung der Reninsynthese in den JG-Zellen, sind die intrarenalen ANG II Konzentrationen deutlich gegenüber unbehandelten Kontrolltieren erhöht [130, 131]. Diese Erhöhung findet sich besonders im Nierenmark, wo zudem eine deutlich höhere ANG II Konzentration als im Nierenkortex, also im Bereich der reninbildenden JG-Zellen, auftritt [113]. Da, wie oben bereits ausgeführt, alle notwendigen Komponenten zur lokalen Bildung von ANG II im Tubulus vorhanden sind, liegt die Vermutung nahe, dass in der Niere eine lokale Bildung des RAS Effektorpeptides ANG II vorliegt.

Eine klare Differenzierung zwischen den Einflüssen des intrarenalen RAS und dem des zirkulierenden ANG II ist schwierig. Dennoch gibt es Umstände, wie beispielsweise eine veränderte Salzzufuhr, bei der die Regulation des intrarenalen und zirkulierenden RAS parallel zueinander stattfindet [132, 133]. In anderen Situationen spiegeln sich die

Veränderungen im lokalen RAS jedoch nicht in denen der systemischen Renin- und ANG II - Konzentrationen wieder, wie bei bestimmten Hypertonusformen und beim Diabetes Mellitus [134, 135].

### 1.2.5 Prorenin-Rezeptor

Der Prorenin-Rezeptor (PRR), auch ATPase H<sup>+</sup>-transporting lysosomal accessory protein 2 (Atp6ap2) genannt, wurde 2002 von Nguyen und Kollegen in kultivierten Mesangialzellen entdeckt und kann sowohl Renin als auch Prorenin mit hoher Affinität binden [136]. Der PRR ist ein 350 Aminosäuren großes transmembranäres Protein, bestehend aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne, die Bindestelle für Renin und Prorenin, einer einfachen Transmembran-domäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne [137]. In der Niere von Mensch, Maus und Ratte findet man den PRR in den glatten Gefäßmuskelzellen der Arterien, in glomerulären Mesangialzellen, in Podozyten, in den Zellen der MD, im proximalen Tubulus und besonders in der luminalen Membran der Sammelrohr-Schaltzellen (Abb. 1.6) [136, 138, 139]. Neben seiner weiten Verteilung in der Niere zeichnet sich der PRR auch durch seine Multifunktionalität aus, die allerdings kontrovers diskutiert wird. Anfangs schrieb man dem PRR alleine eine aktivitätsverstärkende Wirkung des lokalen Gewebe-RAS zu, in dem er Prorenin bindet und dieses über nicht-proteolytische Konformationsänderung aktiviert [140, 141]. Die nicht-proteolytische Aktivierung von Prorenin ist ein reversibler Prozess und erfolgt in zwei Schritten. Das Propeptid bewegt sich zuerst aus dem enzymatischen Spalt und danach kann der Reninteil des Moleküls seine enzymatisch aktive Konformation einnehmen [142]. Das auf diese Weise aktivierte Prorenin, ist in der Lage die Umwandlung von Angiotensinogen in ANG I zu katalysieren und über das lokal vorhandene ACE, ANG II zu bilden (ANG II-abhängiger Signalweg). Darüber hinaus aktiviert die Bindung der Liganden an den PRR intrazelluläre Signalkaskaden wodurch beispielsweise der Mitogen-aktivierte-Protein Kinase (MAPK) -Signalweg, unabhängig von ANG II induziert werden kann [136, 143]. Neuere Untersuchungen haben weitere funktionelle Aspekte des PRR aufgedeckt. So fungiert er als Untereinheit der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase), ermöglicht so den vesikulären Transport von Protonen und ist dadurch maßgebend an der finalen Azidifizierung des Urins beteiligt [144]. Dementsprechend können Mutationen in den Untereinheiten der V-ATPase zu distaler, tubulärer Azidose führen [145]. Des Weiteren spielt der PRR, als Teil des Wnt-Rezeptor-Komplex, eine wichtige Rolle bei der Wnt/β-Catenin Signalweiterleitung [146-148].



**Abb. 1.6:** Immunfluoreszenzfärbung für den Prorenin-Rezeptor (PRR) im Sammelrohr (SR) einer Wildtypmaus. Maßstabsbalken: 20 µm.



### 1.3 Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems für die Nierenentwicklung

Neben der bereits geschilderten funktionellen Bedeutung bei der Regulation des Blutdrucks, kommt dem RAS auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Niere zu. Mutationen im RAS (Angiotensinogen, ACE, Renin, AT1 Rezeptor) können beim Menschen zur renalen tubulären Dysgenese (RTD) führen, einer Erkrankung die bereits *in utero* oder meist früh postpartal tödlich ist [149, 150]. Die Diagnose basiert im Wesentlichen auf dem charakteristischen histologischen Befund in der Niere, der eine strukturelle und funktionelle Unreife der proximalen Tubuli, kollabierte Henle-Schleifen und Sammelrohre zeigt. Führende Symptome sind Nierenversagen, Anurie und arterielle Hypotonie [149, 151]. Auch Versuchstiere wie Mäuse und Ratten mit genereller Deletion in der RAS-Kaskade haben Nierenentwicklungsstörungen, die sich unabhängig vom inaktiven Genprodukt stark ähneln, sich allerdings von der RTD des Menschen unterscheiden [152-158]. So tritt bei Mäusen auch eine hohe perinatale Letalität und eine Hypotension auf. Im Gegensatz zum Menschen sind sie allerdings polyurisch und zeigen, mit den strukturellen Veränderungen der Niere einhergehend, Probleme bei der Konzentrierung des Urins. Bei der Geburt sind die Nieren der Mäuse weitgehend morphologisch unauffällig. Im Verlauf werden sie jedoch hydronephrotisch und entwickeln eine Atrophie der Nierenpapille und erweiterte Nierenbecken. Es zeigen sich Anzeichen einer interstitiellen Fibrose und sklerotische Glomeruli. Ein wesentlicher Grund für die Unterschiede im Phänotyp zwischen Mensch und Maus könnte in den verschiedenen zeitlichen Abläufen der Nephrogenese liegen. Während die Entwicklung der Niere beim Menschen bereits mit der Geburt abgeschlossen ist, dauert sie bei Mäusen und Ratten bis zehn Tage postnatal an [159]. Während der frühen Embryonalentwicklung ist das RAS hoch aktiv [160] und alle Komponenten werden in der sich entwickelnden Niere (Methanephros) exprimiert [161, 162]. Angiotensinogen und AT<sub>1</sub>-Rezeptoren werden bei Mäusen bereits am Embryonaltag 12-14 in der Ureterknospe gebildet, aus der sich u.a. die Sammelrohre entwickeln [163]. Da zu diesem Zeitpunkt auch Renin im Nierenmesenchym exprimiert wird [164, 165], könnte eine lokale Bildung von ANG II stattfinden, die das weitere Wachstum und die Verzweigung der Ureterknospen und Sammelrohre steuert [166, 167]. In verschiedenen Säugetierspezies konnte eine stetig steigende Expression von Renin während der Nierenentwicklung nachgewiesen werden, die postnatal wieder abfällt [168-171]. So ist bei Ratten der renale Renin mRNA Spiegel am 20. Embryonaltag 20-mal höher als bei adulten Tieren. Bei neugeborenen Ratten wird, verglichen mit adulten Tieren, ein 10-fach erhöhter Renin mRNA Spiegel detektiert [171]. Die klassische juxtaglomeruläre Lokalisation von reninbildenden Zellen ist nur für die ausgereifte Niere typisch [172, 173]. Während der Nierenentwicklung sind reninbildende Zellen zuerst im

undifferenzierten Mesenchym nachweisbar und später im sich entwickelnden Nierenarteriensystem. So findet man Reninexpression in der Media größerer präglomerulärer Gefäße, bis hin zur Arteria renalis, wobei mit fortschreitender Reifung der Niere die großen Gefäße die Reninsynthese einstellen und die reninbildenden Zellen sich in Richtung der Glomeruli zurück ziehen, bis sie sich schließlich in ihrer endgültigen Lage, in den afferenten Arteriolen befinden [165]. Eine Expression von Renin in den Ureterknospen oder den Sammelrohren während der Nephrogenese wurde bisher nicht beschrieben. Es gibt allerdings mehrere Hinweise, dass der Reninpromotor während der Nierenentwicklung auch in den Zellen des Sammelrohrs aktiv ist. Bei diesen Untersuchungen wurden Mauslinien verwendet, die die Cre-Rekombinase entweder unter der Kontrolle des menschlichen Renin-Promotors oder unter der Kontrolle des endogenen Maus-Reninpromotors exprimieren. Durch Kreuzung mit verschiedenen Reporter-Mauslinien konnten die Zellen identifiziert werden, in denen während der Nierenentwicklung der Reninpromotor aktiv war, also eine Cre vermittelte Rekombination stattgefunden hatte. Neben der klassischen und erwarteten Lokalisation in den renalen Gefäßen waren auch Zellen im proximalen Tubulus und im Sammelrohr markiert [174, 175]. Darüber hinaus führte die Verwendung von Renin-Cre Mäusen zur Generierung reninzellspezifischer Knockout-Mäuse nicht nur zu einem Knockout in den JG-Zellen, sondern auch im Nierenmark, dort vor allem im Sammelrohr [176]. Die Bedeutung der Reninpromotoraktivität im Tubulussystem, speziell im Sammelrohr während der Nierenentwicklung ist unklar. Da die lokale Bildung von Renin im Sammelrohr an der Nierenentwicklung, besonders des Sammelrohrsystems, beteiligt sein könnte, wurde in der folgenden Arbeit auch die Nierenmorphologie von sammelrohrspezifischen Renin-Knockout-Mäusen untersucht.

## **1.4 Tubuläres Renin-Angiotensin-System und Diabetes mellitus**

### **1.4.1 Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die auf Insulinmangel oder einer herabgesetzten Insulinwirkung beruht und durch einen chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel gekennzeichnet ist. Nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation WHO liegt eine Diabeteserkrankung vor, wenn der Nüchternblutzuckerwert über 126 mg / dl (entspricht 7 mM) liegt [177]. Die Prävalenz des Diabetes mellitus hat in den letzten drei Jahrzehnten stark zugenommen. Nach Schätzungen der WHO stieg die Anzahl der Diabetiker (> 18 Jahre) in Europa von 33 Millionen Erkrankten im Jahr 1980 auf 64 Millionen Erkrankte im Jahr 2014 [178]. Weltweit leiden in etwa 425 Millionen an Diabetes mellitus [179]. Auch in Deutschland nimmt die Zahl der Erkrankten unverändert zu. Die große Zahl der mehr als 6 Millionen Betroffenen steigt jährlich um weitere 300.000 Patienten [180]. Nach pathogenetischen

Gesichtspunkten unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Diabetestypen, dem Typ 1 und dem Typ 2 Diabetes. Mit einem Anteil von über 95% sind die meisten Betroffenen in Deutschland an einem **Typ 2 Diabetes** erkrankt, der zumeist im höheren Lebensalter auftritt. Die Pathogenese des Typ 2 Diabetes ist komplex und derzeit nicht endgültig geklärt. Es spielen genetische Faktoren eine große Rolle und sowohl eine Insulinresistenz (gestörte Rezeptorfunktion), als auch eine Sekretionsstörung von Insulin können vorliegen. Der Diabetes Typ 2 ist häufig mit Adipositas, Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen (metabolisches Syndrom), aber auch mit psychosozialen Faktoren wie Überernährung und Bewegungsmangel assoziiert [179].

Der **Typ 1 Diabetes** manifestiert sich in der Regel in jungen Jahren [181] und wird durch eine Autoimmunreaktion, bei der Antikörper gegen Bestandteile der insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas gebildet werden, ausgelöst. Die progressive  $\beta$ -Zellzerstörung führt zunächst zu einer Einschränkung der akuten Insulinsekretion und schließlich zu einem manifesten Diabetes mellitus Typ 1 mit absolutem Insulinmangel [182, 183]. In Folge dessen kann vom Organismus nicht mehr genügend Insulin produziert werden, um eine effiziente Aufnahme der Glukose aus dem Blut in die Skelettmuskel- und Fettzellen zu gewährleisten. Es kommt zu einem Anstieg des Blutzuckerspiegels. Durch den Mangel an Insulin werden zusätzlich mehr Fettsäuren freigesetzt und Ketonkörpern gebildet, was zu einer metabolischen Azidose führt. Mit der Plasmakonzentration steigt zusätzlich die in den Glomeruli der Nieren filtrierte Menge an Glukose. Übersteigt die filtrierte Glukosemenge die maximale Transportfähigkeit der Nierentubuli, so kommt es zur Glukosurie. Der dabei süße Urin verlieh der Krankheit „Diabetes mellitus“ ihren Namen. Die nicht resorbierte Glukose behindert die Resorption von Wasser und Elektrolyten (osmotische Diurese) und es kommt zu Verlusten dieser Stoffe mit dem Urin. Durst und die Notwendigkeit, häufig große Mengen Wasser zu lassen, stellen erste Hinweise für das Vorhandensein eines Diabetes dar. Die Patienten sind meist dehydriert und auf die exogene Gabe von Insulin angewiesen [179, 184]. Anhaltende Hyperglykämie ist bekanntermaßen die Hauptursache für diabetische Komplikationen. Die genaue Pathophysiologie, die dieser Kausalität zu Grunde liegt, ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Ein möglicher Mechanismus ist die durch den erhöhten Glukosespiegel bedingte Proteinglykierung. Dabei bindet die Glukose an Proteine und verändert damit deren Eigenschaften. Es entstehen die sogenannten Advanced Glycation Endproducts (AGE). Unter anderem wird Hämoglobin glykiert. Das Glykierungsprodukt HbA1c ist ein diagnostisch wertvoller Marker für früher aufgetretene Hyperglykämien, da es auch nach Normalisierung der Plasmaglukosekonzentration erhöht bleibt. AGE fördern unter anderem die Bildung von Bindegewebe. Durch Glykierung und überschüssiges Bindegewebe werden Gefäßwände verdickt und funktionelles Gewebe verdrängt. Als Folgen der Gefäßschäden können Herzinfarkte, periphere

Durchblutungsstörungen und Untergang der Augennetzhaut auftreten [185]. Besonders betroffen bei langjähriger Diabeteserkrankung ist die Niere (diabetische Nephropathie). Die Auswirkungen einer Diabeteserkrankung auf die Funktionalität der Niere ist zum Teil Gegenstand der vorliegenden Arbeit und deshalb werden relevante Aspekte der Entwicklung und Progression dieser Erkrankung im Folgenden kurz vorgestellt.

#### **1.4.2 Diabetische Nephropathie**

Die Diabetische Nephropathie ist eine der häufigsten und gefährlichsten Diabetes-Komplikationen, welche bei etwa 20 - 40% aller Patienten mit Diabetes im Krankheitsverlauf auftritt [186] und zum terminalen Nierenversagen führen kann. Das Risiko eine Nierenerkrankung zu entwickeln ist bei Typ 1- und Typ 2-Diabetes gleich hoch [187]. Aus den Daten des jährlichen Berichts der „European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association“ (ERA-EDTA) geht hervor, dass 24% aller neu aufgetretenen terminalen Niereninsuffizienzen auf eine diabetische Nephropathie zurückzuführen sind [188]. Damit ist die diabetische Nephropathie eine der wichtigsten Ursachen für terminale Niereninsuffizienz, aber auch generell für chronische Nierenerkrankungen [189, 190]. Im Durchschnitt entwickelt sich eine diabetische Nephropathie etwa 15 Jahre nach der Diagnose des Diabetes mellitus [191]. Ein initiales Anzeichen hierfür ist eine glomeruläre Hyperfiltration und Hypertrophie. Anschließend entwickelt sich eine Mikroalbuminurie (30 - 300 mg / Tag), die als „früher“ Schädigungsmarker für die manifeste Nephropathie verwendet wird [192]. Diese Mikroalbuminurie kann sich bei Fortbestehen der diabetischen Stoffwechsellage zu einer Makroalbuminurie entwickeln (> 300 mg Albumin / Tag) [193]. Histologisch früh nachweisbare Veränderungen der Niere sind die Verdickung der glomerulären Basalmembran [194], eine Ausweitung des Mesangiums durch eine vermehrte Ansammlung extrazellulärer Matrix und eine glomeruläre Sklerose [195, 196]. Assoziiert ist dies mit einem Verlust der Integrität der Filtrationsbarriere, die zur oben erwähnten Albuminurie führt [197]. Auch die Podozyten werden im Rahmen der Ausbildung der diabetischen Nephropathie in Mitleidenschaft gezogen. Es kommt zu einer Hypertrophie der Podozyten, einem Loslösen der Fußfortsätze und schließlich zum Verlust des Kontaktes zur glomerulären Basalmembran, sowie zur Apoptose. Die Anzahl an Podozyten in den Glomeruli ist daher bei Patienten mit diabetischer Nephropathie häufig verringert [198, 199], was zum Verlust der Filtrationsfunktion und somit zu pathologischen Veränderungen der glomerulären Permeabilität beiträgt [200, 201]. Die über viele Jahre langsam fortschreitende Schädigung der Glomeruli geht mit einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate einher. Ein zusätzliches Merkmal progressiver Nierenerkrankungen ist die renale Fibrose und eine damit verbundene Abnahme der Zahl peritubulärer Kapillaren [202-204].

Da die genaue Pathogenese der diabetischen Nephropathie nicht geklärt ist, gestaltet sich die Entwicklung von evidenz-basierten therapeutischen Strategien schwierig. Neben einer Optimierung der Blutzuckerwerte [205], ist die Hemmung des RAS die am besten validierte Therapie der diabetischen Nephropathie [206, 207]. Neben den positiven Effekten auf den glomerulären Kapillardruck, führt eine RAS-Hemmung zur Reduktion des arteriellen Blutdrucks, was schon per se nephroprotektiv ist und von den medizinischen Fachgesellschaften empfohlen wird [208, 209]. Eine weitere vielversprechende Therapieform der diabetischen Nephropathie ist die Blockade des SGLT2-Transportes. Die ersten Daten aus der EMPA-REG OUTCOME-Studie [210] an Typ 2 Diabetikern zeigen, dass der SGLT2 Inhibitor Empagliflozin mehr als ein Drittel aller kardiovaskulären Todesfälle verhinderte. Darüber hinaus verminderte Empagliflozin die Albuminausscheidung und erhöhte die glomeruläre Filtrationsrate. Weiter kam es im Beobachtungszeitraum zu signifikant weniger neu aufgetretenen Nephropathien in der Empagliflozin-Gruppe [210].

Die Pathogenese der diabetischen Nephropathie ist äußerst komplex und die oben beschriebenen Veränderungen in der Niere können durch ein Zusammenspiel von metabolischen und hämodynamischen Faktoren ausgelöst oder begünstigt werden. Metabolische Veränderungen werden über glukoseabhängige Signalwege gesteuert und beinhalten unter anderem die vermehrte Ansammlung von Glykierungsendprodukten, den AGEs und die Signalweiterleitung über den Polyol-Weg [211]. Hämodynamische Faktoren, wie die vasoaktiven Hormone des RAS verstärken die Effekte der metabolischen Faktoren und fördern so beispielsweise die vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) und damit oxidativen Stress. Da ROS Schäden an Proteinen, Lipiden oder der DNA induzieren können, wird der hohe oxidative Stress als einer der Hauptauslöser der diabetischen Komplikationen angesehen [212]. In der Niere wurden verschiedenste Wege zur Bildung von ROS identifiziert: die oxidative Phosphorylierung der mitochondrialen Atmungskette [213-215], die NAD(P)H Oxidase [216, 217] sowie die bereits erwähnten AGEs [185, 218] und der Polyol Signalweg [219].

Des Weiteren werden im Rahmen der diabetischen Nephropathie vermehrt Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie der Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ), ein wichtiges Signalmolekül bei der Entstehung der glomerulären und tubulointerstitiellen Fibrose, gebildet [220, 221]. Die Konsequenzen aus Aktivierung und Inhibierung verschiedener molekularer Signalwege, führt letztendlich zu den funktionellen und strukturellen Veränderungen, die sich klinisch als diabetische Nephropathie manifestieren.

Neben den metabolischen Faktoren scheinen also auch Komponenten des RAS maßgebend an der Pathogenese der diabetischen Nephropathie beteiligt zu sein. Inwiefern das RAS, speziell die lokal und intrarenal gebildeten Komponenten, bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie involviert sind, wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

### 1.4.3 Rolle des lokalen Renin-Angiotensin-Systems beim Diabetes mellitus

Die große Bedeutung des RAS bei der diabetischen Nephropathie wurde erstmals von Brenner und Kollegen anhand einer Reihe von Experimenten mit Streptozotocin (STZ)-induzierten diabetischen Ratten in den 1980er Jahren gezeigt [222]. Nach Induktion des Diabetes mellitus durch STZ trat bereits früh im Verlauf der Erkrankung ein erhöhter intrakapillärer Druck in den Glomeruli auf. Dieser war mit einem relativen Anstieg des efferenten arteriellen Widerstandes, im Vergleich zu dem der afferenten Arteriole, verbunden [222]. Die Änderungen der glomerulären Hämodynamik der Versuchstiere ging mit der Entwicklung einer Proteinurie und weiteren pathologischen Merkmalen, die auch für die diabetischen Nephropathie beim Menschen charakteristisch sind, einher [223]. Da eine verstärkte Kontraktion der efferenten Arteriole und ein erhöhter glomerulärer Druck typische ANG II - vermittelte Wirkungsmuster sind, wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieses hämodynamische Profil der diabetischen Ratten aus der Aktivierung des RAS resultieren könnte [224]. Zatz et al. bestätigten diese Hypothese mit weiteren Versuchen an diabetischen Ratten und der Anwendung eines ACE Inhibitors (Enalapril). Die Gabe von Enalapril normalisierte den glomerulären Druck und reduzierte die Albuminausscheidung. Darüber hinaus konnte die Entwicklung einer glomerulären Sklerose in den diabetischen Ratten durch die Behandlung mit Enalapril weitestgehend verhindert werden [225]. Die Studien von Brenner waren wegweisend und verdeutlichten die pathophysiologische Rolle des RAS bei der diabetischen Nierenerkrankung. Großangelegte Humanstudien kamen später zu ähnlichen Ergebnissen. Auch hier zeigte die Inhibierung des RAS einen positiven Einfluss auf die Progression der renalen Schädigung bei diabetischen Patienten [226-228]. Trotz dieser deutlichen Effekte der RAS-Inhibierung, die auf eine Aktivierung des RAS beim Diabetes mellitus hindeuten, lassen sich in den gleichen Patientengruppen und untersuchten Tiermodellen keine eindeutigen Hinweise für eine Aktivierung des systemischen RAS finden [229-232]. Im Gegenteil, die Plasmapreninaktivität der Patienten mit Diabetes mellitus ist eher normal bis leicht erniedrigt [135, 233]. Dies führte zu der Überlegung, dass bei einer Diabeteserkrankung nicht das systemische, also zirkulierende RAS, sondern ein lokales, also intrarenal aktives RAS, zu erhöhten lokalen ANG II Konzentrationen führt und dadurch die Progression der diabetischen Nierenerkrankung vorantreibt [103, 135, 224]. Solch eine lokale RAS-Aktivierung könnte ohne nachweisbare Veränderungen der Plasmapreninaktivität auftreten und stark genug sein, um pathologische Effekte in der Niere auszulösen.

Hohe ANG II Konzentrationen spielen generell eine tragende Rolle bei der Entwicklung und Progression von chronischem Nierenversagen [234]. So erhöht ANG II als starker Vasokonstriktor den Tonus der efferenten Arteriole und steigert dadurch den intraglomerulären Druck, der als Risikofaktor für eine Schädigung der glomerulären Kapillaren gilt [234, 235]. Es wird vermutet, dass durch den erhöhten hydrostatischen Druck

die glomeruläre Filtrationsbarriere langfristig ihre gröÙenselektive Funktion verliert und somit vermehrt Makromoleküle in den Harnraum filtriert werden [236]. ANG II ist nicht nur ein Vasokonstriktor, sondern kann wie ein Zytokin auch Zellwachstum, Entzündung und Fibrose auslösen [237, 238]. Es stimuliert die Bildung von TNF- $\alpha$  [239], von Interleukin-6 (IL-6) [240] sowie vom nukleären-Faktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) [241] und TGF- $\beta$  [242], die alle maßgeblich an renalen Entzündungsprozessen und der Fibrosierung bei chronischen Nierenerkrankungen beteiligt sind. ANG II trägt außerdem zu der Entstehung von ROS bei [26, 243].

Ein weiterer erwähnenswerter Faktor bei der Entstehung und Progression chronischer Nierenerkrankungen ist der Reninvorläufer Prorenin. Während wie oben bereits beschrieben, die Reninkonzentration im Plasma von Diabetikern tendenziell erniedrigt ist, finden sich erhöhte Plasmakonzentrationen von Prorenin [244-246]. Interessanterweise steigt bei diabetischen Ratten nicht nur die Proreninkonzentration im Plasma, sondern parallel dazu auch die Bildung von Prorenin im Sammelrohr an [124], was mit einer Freisetzung von Prorenin aus dem Sammelrohr in die Zirkulation vereinbar wäre. Das Sammelrohr könnte somit eine potentiell wichtige Quelle des Prorenins im Diabetes darstellen. Die Aktivierung des tubulären Prorenins zu Renin könnte zur Bildung von ANG II beitragen, oder RAS-unabhängige pathologische Effekte über die Bindung an den Prorenin-Rezeptor (PRR) ausüben [136, 247]. Auch der PRR selbst könnte bei der Entwicklung und Progression von diabetischen Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Die Expression entlang des Nephrons ist bei diabetischen Ratten und Mäusen erhöht [248, 249]. Über die Bindung von Prorenin an den PRR kann dieses einerseits aktiviert werden und zum anderen die renale Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  [249] sowie die Aktivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) über einen ANG II-unabhängigen Signalweg gesteigert werden [136, 250]. So führt die Blockade des PRR zu einer Inhibierung der MAPK-Signalaktivität und der zu Entwicklung von Glomerulosklerose in einem Modell der diabetischen Nephropathie [251]. In einer Follow-Up Studie mit AT<sub>1a</sub> Rezeptordefizienten Mäusen schlugen Ishihara und Kollegen eine ANG II-unabhängige Beteiligung der PRR-vermittelten Aktivierung des MAPK-Signalweges bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie vor. Die Gabe eines ACE-Inhibitors zur Vorbeugung der diabetischen Nephropathie war in dem gleichen Versuchsansatz nicht so effizient, wie die Verabreichung eines PRR-Antagonisten [252]. Da die protektive Wirkung der Blockade des PRR in anderen Studien nicht reproduziert werden konnte, wird die Rolle des PRR bei der Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen jedoch noch immer kontrovers diskutiert [253, 254].

Insgesamt legen die oben erwähnten Studien nahe, dass dem lokalen intrarenalen RAS eine wichtige Rolle in der Pathogenese von ANG II-abhängigen und diabetes-assoziierten Nierenerkrankungen zukommen könnte. Trotz dieser zahlreichen Hinweise auf die Existenz eines lokalen RAS im Tubulus, wurden bisher allerdings keine spezifischen

Interventionsstudien durchgeführt, um die funktionelle Rolle des tubulären RAS beim Diabetes zu untersuchen. Dies wird daher ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sein.



## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Neben dem systemischen RAS, das schon lange bekannt und gut charakterisiert ist, existiert ein lokal-renales RAS, dem insbesondere bei pathologischen Zuständen eine Rolle zukommen könnte.

Entsprechend der pathophysiologischen Rolle des RAS bei der diabetischen Nephropathie gehören Medikamente, die die Aktivität oder die Wirkung des RAS hemmen, zur Standardtherapie dieser Erkrankung. Trotz der hohen Wirksamkeit von RAS-Inhibitoren, liegt bei diabetischen Patienten in der Regel keine Aktivierung des systemischen RAS vor. Dies führte zur Hypothese, dass beim Diabetes mellitus nicht das systemische, sondern das intrarenale RAS aktiviert wird und für die progressionsfördernden Effekte des RAS bei der diabetischen Nephropathie verantwortlich sein könnte. Erste Untersuchungen hierzu zeigten, dass neben dem aktiven Renin auch dem Prorenin eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der Diabeteserkrankung zukommen könnte und dass das distale Nephron, speziell das Sammelrohr, eine mögliche Quelle des Prorenins darstellt.

Trotz der zahlreichen Hinweise auf die Existenz eines tubulären RAS, ist dessen funktionelle Rolle bisher kaum verstanden und stellt den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar.

Zur gezielten Untersuchung der Bedeutung der tubulären Reninbildung, wurden zunächst Mausmodelle mit einer sammelrohrspezifischen und einer tubulusspezifischen Deletion des Renin-Gens generiert. Basierend auf Vorbefunden, die dem Sammelrohr-Renin eine mögliche Rolle in der Nierenentwicklung zugeschrieben hatten, wurden zunächst die morphologischen und funktionellen Veränderungen der Niere bei fehlendem Sammelrohr-Renin an sammelrohrspezifischen Renin-Knockout-Mäusen untersucht.

Weiter sollte im zweiten Teil der Arbeit die Rolle des tubulären Renins und Prorenins beim Diabetes Mellitus und dessen Relevanz bei der Entwicklung und Progression der diabetischen Nephropathie aufgeklärt werden. Hierfür sollten nach der Induktion eines Diabetes mellitus Typ 1 bei tubulusspezifischen Renin-Knockout-Mäusen die funktionellen Auswirkungen der gewebsspezifischen Deletion des Renin-Gens im Hinblick auf den Krankheitsverlauf untersucht werden.

## 3 Methoden

### 3.1 Versuchstiere

#### 3.1.1 Haltung der Versuchstiere

Alle für diese Arbeit erforderlichen Tierexperimente wurden gemäß den „*Guidelines for the care and use of animals in research*“ des National Institutes of Health (NIH) durchgeführt und von den örtlichen Tierschutzbehörden genehmigt. Auf optimale Haltungsbedingungen für Nager (gemäß den Empfehlungen der FELASA) wurde geachtet (gleichbleibende Raumtemperatur  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , relative Luftfeuchtigkeit  $55\% \pm 5\%$ , zwölfstündiges Hell-/Dunkelintervall, Futter und Wasser *ad libitum*).

#### 3.1.2 Verwendete Mauslinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet:

- Aqp2-Cre: Tg(Aqp2-cre)1Dek/J, Jackson Laboratory, Stock #: 006881
- mTmG-Reporter: Gt(ROSA)26Sor<sup>tm4</sup>(ACTB-tdTomato,-EGFP)<sup>Luo/J</sup>, Jackson Laboratory, Stock #: 007576 [255]
- Pax8 rtTA: Tg(Pax8-rtTA2S\*M2)1Koes/J, Jackson Laboratory, Stock #: 007176 [256]
- TetO-Cre: Tg(tetO-cre)1Jaw/J, Jackson Laboratory, Stock #: 006234
- Renin1<sup>flox/flox</sup>: generiert in Zusammenarbeit mit PD Dr. Vladimir Todorov, Nephrologie, Universitätsklinikum Dresden
- BAC Ren-GFP: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Armin Kurtz, Institut für Physiologie, Universität Regensburg [257]
- BTBR ob/ob: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. Miriam Banas, Abteilung für Nephrologie, Universitätsklinikum Regensburg [258]

### 3.1.3 Generierung der Mauslinien

#### 3.1.3.1 Ren1<sup>flox/flox</sup>-Mäuse

Für die Generierung der geflochtenen Renin 1 Maus wurden murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) mit gezielt verändertem Ren1<sup>c</sup>-Locus (JM8A1.N3) vom European Mouse Mutant Cell Repository (EuMMCR), Helmholtz Zentrum in München bezogen. Der für die homologe Rekombination von ES-Zellen verwendete Targeting-Vektor enthielt neben den 5'- und 3'-homologen Armen, eine Targeting-Kassette mit einem Neomycinresistenzgen, sowie eine lacZ-Reportersequenz (flankiert von FRT-Flippase-Rekombinationsstellen). Zwei folgende LoxP-Erkennungssequenzen flankierten die Exons 5 - 8 des Maus-Ren1<sup>c</sup>-Gens.

Das Einbringen der mutanten JM8A1.N3 Zellen in C57BL/6NCrl Embryos im 8-Zell-Stadium erfolgte mittels Laser-Mikroinjektion (XY-Clone Hamilton Thorne) am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik (MPI-CBG) in Dresden. Die so entstandenen chimären Mäuse wurden mit C57BL/6NCrl-Mäusen rückgekreuzt und mittels PCR, unter Verwendung der folgenden Primer auf das Vorhandensein des Targeting-Konstrukts geprüft:

Ren1-5'arm: 5'-CAG CCT CCT TGGCAG CTT CTA GCC-3 '  
Ren1-3'arm: 5'-ACT GTC AAC ACC TCT ATG CTT GGG-3 '

Die PCR-Produktgrößen sind 519 bp für das Wildtyp - Allel und 392 bp für das mutierte Zielallel.

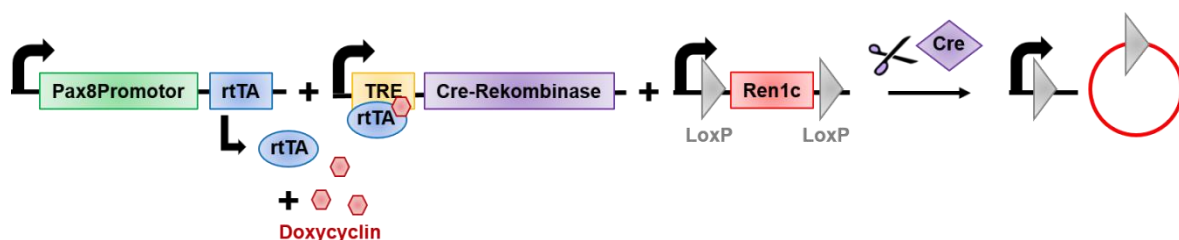
Heterozygote Mäuse, die das Targeting-Konstrukt in sich trugen, wurden mit einem Flippase-Deleterstamm (flpo, verbesserte Flippase [259]) gekreuzt, um die FRT-flankierte Targeting-Kassette auszuschneiden. Die Flpo-Rekombination wurde mittels PCR, unter Verwendung der oben gelisteten Primer Ren1-5'arm und Ren1-3'arm, überprüft. Die Produktgrößen für das Wildtyp-Allel sind 519 bp und für das geflochte Allel 667 bp. Nach globaler Deletion der Targeting-Kassette wurde das Flpo-Transgen durch weitere Kreuzungsschritte entfernt. Die resultierende Mauslinie (Renin1<sup>flox/flox</sup>) besitzt zwei LoxP-Erkennungssequenzen, die die Exons 5-8 des Ren1<sup>c</sup>-Gens flankieren. Durch Cre-induzierte Rekombination werden die geflochtenen Exons ausgeschnitten und das Reninmolekül verliert einen wichtigen Bestandteil seines aktiven Zentrums, was in Folge zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führt.

### 3.1.3.2 Sammelrohrspezifische Ren1<sup>flox/flox</sup>-Mäuse

Die Generierung der sammelrohrspezifischen Ren1 Knockout-Mäuse erfolgte anhand des Cre-LoxP-Systems [260, 261]. Hierzu wurden gefloخته Renin1 Mäuse mit Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase unter dem sammelrohrspezifischen Promotor Aquaporin 2 (Aqp2) exprimierten. Die Cre-Rekombinase erkennt die LoxP-Markierungen und schneidet das dazwischen befindliche DNA-Fragment unter Bildung eines zyklischen Produktes aus dem Chromosom der Tiere aus und baut dieses ab, so dass aktives Renin nicht mehr synthetisiert werden kann. Da die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des für Aqp2 codierenden Gens in der Niere nur in den Hauptzellen exprimiert wurde, blieb die Genexpression von Renin in den JG-Zellen erhalten.

### 3.1.3.3 Tubulusspezifische Ren1<sup>flox/flox</sup>-Mäuse

Für die Generierung der tubulusspezifischen Renin Knockout-Mäuse wurden gefloخته Ren1 Mäuse mit einer induzierbaren doppelt transgenen Pax8 rtTA/TetO-Cre [256] - Mauslinie verpaart. Pax8 ist ein Paired-Box-Gen und ein transkriptioneller Aktivator [262], der während der murinen Entwicklung eine wichtige Rolle in der Niere, im Gehirn und der Schilddrüse spielt. In adulten Mäusen ist Pax8 in allen größeren Organen, außer den Tubuli der Niere und der Schilddrüse, nicht mehr vorhanden und eignet sich damit gut als tubulusspezifischer Promotor [263, 264].



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Pax8 rtTA/TetO-Cre/Ren1<sup>flox/flox</sup>-Knockout Systems.** Über den aktiven Pax8 Promotor wurde der reverse Tetracyclin-abhängige Transaktivator rtTA in den Tubuli der Niere transkribiert. In Anwesenheit des Effektors (Doxycyclin) konnte der rtTA an das „Tetracycline-responsive promoter element“ TRE binden und die Expression des Zielgens (Cre-Rekombinase) stimulieren. Das Zielgen Ren1<sup>c</sup> konnte zwischen den LoxP-Sequenzen ausgeschnitten und abgebaut werden.

Hinter dem Pax8-Promotor befindet sich im verwendeten Mausmodell ein reverser Tetracyclin-abhängiger Transaktivator (rtTA), ein Bestandteil des Tet-On-Systems (Abb.3.1). Bei dem Tet-On-System handelt es sich um ein konditionales Expressions-System, welches auf einer autoregulatorischen Tetracyclin-Resistenz, die beispielsweise bei *E. coli* Bakterien zu finden ist, basiert [265]. Es besteht aus dem genannten rtTA und einem „Tetracycline-responsive promoter element“ (TRE), welches die TetO-Sequenz und einen Minimalpromotor beinhaltet. Wird dem Tet-On-System Tetracyclin zugesetzt, kann das permanent exprimierte

rtTA-Protein an die TetO-Sequenz des TRE binden, diese aktivieren und die Expression des nachgeschalteten Zielgens über den Minimalpromotor initiieren. In Abwesenheit des Effektors erkennt das rtTA-Protein die TetO-Sequenz des TRE nicht und das Zielgen wird somit nicht exprimiert. Dementsprechend wurde in dem verwendeten Mausmodell bei Gabe von Doxycyclin, aus der Klasse der Tetracycline, die an das TRE anschließende Cre-Rekombinase transkribiert und der zwischen den LoxP-Sequenzen liegende Teil des Reningens ausgeschnitten und abgebaut. Da sich die Pax8 Expression in den Nieren der adulten Mäuse ausschließlich auf die Tubuli beschränkt, wurde die Reninsynthese der JG-Zellen nicht beeinträchtigt. Mit Hilfe der Pax8 rtTA/TetO-Cre/Ren1<sup>flox/flox</sup>-Maus wurde der Knockout von Renin somit nicht nur auf die Tubuli der Niere eingegrenzt, sondern auch erst bei Doxycyclin-Gabe induziert. So konnte ein entwicklungsbedingter Defekt umgangen und der Knockout erst bei den adulten Tieren herbeigeführt werden.

#### 3.1.3.4 Cre-Reporter Maus Tomato-EGFP

Um die Rekombinationseffizienz- und lokalisation von Aqp2-Cre- und induzierbaren Pax8/TetO-Cre-Mäusen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie zu testen, wurden diese mit der Reporter-Maus Tomato-EGFP (im folgenden mTmG genannt) gekreuzt [255]. Die mTmG Maus trägt zwischen den LoxP-Stellen ein membrangerichtetes Tomato-Tandem-Dimer, eine Variante des dsRed (Anregungsmaximum bei 554 nm, Emissionsmaximum bei 581 nm). Nach einem anschließenden Poly(A)-Schwanz und der zweiten LoxP-Stelle wurde ein membrangerichtetes Enhancend-Green-Fluorescent-Protein-Dimer (EGFP) platziert (Anregungsmaximum bei 484 nm, Emissionsmaximum bei 510 nm). In Zellen, in denen es nicht zur Rekombination mit Cre kommt, wird dementsprechend allein das Tomato-Protein (mT) exprimiert. Sofern es zur Exzision des DNA-Abschnitts zwischen den LoxP-Sequenzen kommt, wird stattdessen das membrangerichtete EGFP-Protein (mG) exprimiert, dessen Gen direkt nach der zweiten LoxP-Stelle gesetzt wurde. Die Polyadenylierungssequenz im Anschluss an die Tomato-Sequenz dient als Stopp-Codon und sorgt dafür, dass nach der Expression von mT nicht auch mG exprimiert wird und eine Doppelfluoreszenz in den Zellen auftritt.

##### Aqp2-Cre/mTmG Mäuse

Die Aqp2-Cre Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase in der Niere unter der Kontrolle des Aquaporin2-Promotors in den Hauptzellen der Sammelrohre. Nach der Kreuzung mit der Reporter-Maus mTmG wird das für Tomato-codierende Gen durch das Enzym entfernt, so dass nun die Transkription von EGFP erfolgt und die Hauptzellen, die die Cre-Rekombinase exprimieren, grün fluoreszieren. Alle anderen Zellen in der Niere exprimieren weiterhin das rot fluoreszierende mT-Protein.

### Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>mTmG Mäuse

In den Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>-Mäusen wird die Cre-Rekombinase Doxycyclin-abhängig unter der Kontrolle des Pax8-Promotors exprimiert. Kreuzt man diese Mäuse, mit den mTmG-Reporter Mäusen, wird nach der Induktion mit Doxycyclin in allen Tubuli, die die Cre-Rekombinase exprimieren, das mit LoxP-Stellen markierte mT-Gen ausgeschnitten. Dadurch kommt die Transkription des rot fluoreszierenden Tomato-Gens zum Erliegen und stattdessen wird das mG-Gen abgelesen, was letztlich zur Bildung des grün-fluoreszierenden mG-Proteins führt. Die Zellen, die den Pax8-Promotor nicht aufweisen, wie Glomeruli, JG-Zellen, Blutgefäße und interstitielle Zellen, in denen es also zu keiner Rekombination kommt, verbleiben rot.

## **3.2 Genotypisierung**

Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte durch eine PCR-Analyse der aus der Schwanzspitze gewonnenen genomischen DNA mit der Unterstützung von Frieda Webinger und Katharina Ehm (AG Prof. Schweda, Institut für Physiologie, Universität Regensburg).

### **3.2.1 Gewinnung der genomischen DNA**

Zur Gewinnung der genomischer DNA wurden den vier Wochen alten Mäusen mit einem Skalpell ca. zwei Millimeter der äußersten Schwanzspitze entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese wurde nach der Zugabe von 600 µl TNES-Puffer und 10 µl Proteinase K (10 mg / ml) bei 56°C und 550 rpm auf einem Heizschüttler für mindestens drei Stunden (oder über Nacht) verdaut. Im nächsten Schritt wurden 166 µl einer gesättigten (6 M) NaCl-Lösung zur Fällung der Proteine zugegeben und weiter für 15 min bei 800 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellbestandteile (15 min, RT, 13000 rpm) wurden 500 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl -20°C kaltem 100%igen Ethanol vermischt, mehrmals per Hand geschwenkt und bei 13000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Pellet mit 500 µl 80%igen Ethanol gewaschen und 10 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Nach dem erneuten Absaugen des Überstands erfolgte das Trocknen des DNA-Pellets bei 37°C und geöffneten Reaktionsgefäße. Anschließend wurde das gereinigte DNA-Pellet in 50 µl frischem, entionisiertem Wasser (Millipore®) gelöst und eine Stunde unter dem Abzug bei 55°C und 300 rpm leicht geschwenkt.

### 3.2.2 PCR Analyse der genomischen DNA

Mit Hilfe der PCR-Methode ist es möglich, die Existenz bestimmter Gene im Genom einer Gewebeprobe qualitativ nachzuweisen. Durch das Auswählen geeigneter Primer (siehe Anhang) ist so eine Genotypisierung der Versuchstiere hinsichtlich gewünschter Gene möglich.

In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein der codierenden Regionen der Cre-, beziehungsweise der TetO-Cre-Rekombinase, von Pax8rtTA sowie dem geflochtenen Renin1 in der genomischen DNA der untersuchten Mäuse mit Hilfe folgender PCR-Ansätze und den entsprechenden Amplifizierungsprotokollen überprüft:

Herkömmlicher 25 µl PCR-Ansatz:

Bestandteil	Menge in [µl]
5x GoTaq-Puffer	5
Primer sense	1,5
Primer antisense	1,5
dNTPs	1,5
H <sub>2</sub> O	14,875
GoTaq DNA-Polymerase	0,125
Isolierte DNA-Probe	0,5

Amplifizierungsprotokoll:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94°C	5 min	<b>Aktivierung</b>
	94°C	1 min	<b>Denaturierung</b>
35	60°C	1 min	<b>Annealing</b>
	72°C	1 min	<b>Elongation</b>
1	72°C	10 min	<b>Elongation</b>
1	8°C	∞	

PCR-Ansatz für Renin1<sup>flox/flox</sup>:

Bestandteil	Menge in [µl]
5x GoTaq-Puffer	5
Primer sense	1,5
Primer antisense	1,5
dNTPs	1,5
H <sub>2</sub> O	14,05
GoTaq DNA-Polymerase	0,25
Isolierte DNA-Probe	1,2

Amplifizierungsprotokoll für Renin1<sup>flox/flox</sup>:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94°C	5 min	<b>Aktivierung</b>
35	94°C	1 min	<b>Denaturierung</b>
	65°C	1 min	<b>Annealing</b>
	72°C	1 min	<b>Elongation</b>
1	72°C	10 min	<b>Elongation</b>
1	8°C	∞	

### 3.2.3 Gelelektrophorese

Das PCR-Produkt wurde im Anschluss auf ein Agarose-Gel (2% Agarose in TBE-Puffer) aufgetragen und die enthaltenen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe gelelektrophoretisch, bei einer Spannung von 120 V und über einen Zeitraum von 45 min, aufgetrennt. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Farbstoffs (Peq-Green) und eines 100-Basenpaar-Standards konnten die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe detektiert werden.

## 3.3 Induktion des Knockouts bei Pax8/TetO-Cre Mäusen

Die Expression der Cre-Rekombinase und folglich die Deletion des Reningens wurde in den Pax8/TetO-Cre/Ren1<sup>flox/flox</sup>-Tieren über die Gabe von Doxycyclin, einem Tretacyclin-Derivat, initiiert. Den adulten Mäusen wurde über drei Wochen 2 mg / ml Doxycyclin im lichtgeschützten Trinkwasser verabreicht. Der Doxycyclin-Lösung, die in dieser Zeit *ad libitum* angeboten wurde, wurde 5% Saccharose zugesetzt, um den bitteren Geschmack des Antibiotikums zu maskieren.

## 3.4 Behandlungsmodelle

### 3.4.1 Streptozotocin

Die Induktion des artifiziellen Diabetes mellitus erfolgte mittels intraperitonealer Gabe von 60 mg / kg KGW Streptozotocin (STZ). STZ ist ein Glukosamin, welches spezifisch toxisch für die insulinproduzierenden Zellen in den Langerhansschen Inseln der Bauchspeichel-drüse ist. Nach einem Protokoll des AMDCC (Animal Models of Diabetic Complications Consortium) waren die Mäuse für mindestens vier Stunden vor jeder Injektion mit STZ nüchtern. 15 mg / ml Streptozotocin wurde in dem frisch hergestellten Citratpuffer gelöst und in einer Dosis von 60 mg / kg KGW mit Hilfe einer Insulinspritze intraperitoneal appliziert. Da die STZ-Lösung äußerst lichtempfindlich ist und eine nur sehr geringe Halbwertszeit von ca. 15-20 min aufweist, wurde die STZ-Lösung erst kurz vor der Verwendung hergestellt und vor Licht



geschützt. Die Injektion der STZ-Lösung erfolgte an fünf aufeinander folgenden Tagen. Nach fünf Tagen wurde der Plasmaglukosespiegel in einem Blutstropfen aus der Vena facialis des Tieres mit einem Blutzuckermessgerät bestimmt. Bei einem Plasmaglukosespiegel über 300 mg / dl (bzw. 16,65 mmol / l) wurde das Tier als diabetisch angesehen und in die Versuchsgruppe aufgenommen.

### 3.4.2 Diurese

Für das Diurese-Experiment wurde den Tieren eine 5%ige Glukoselösung, angesetzt mit normalem Trinkwasser, *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Um die Trinkmenge der Tiere zu bestimmen, wurde die Flasche mit dem gesüßten Trinkwasser jeden Tag zur gleichen Zeit gewogen. Die 5%ige Glukoselösung wurde alle zwei Tage erneuert.

### 3.4.3 SGLT2 Blockade

Um den SGLT2 Transporter im proximalen Tubulus der Tiere zu blockieren, wurde den Mäusen 30 mg / kg KGW Empagliflozin über das Trinkwasser verabreicht. Die auf das Körpergewicht der Mäuse angepasste Menge an SGLT2-Inhibitor wurde mit normalem Trinkwasser angesetzt und für 10 min in Ultraschallbad gelöst. Um eine konstant bleibende Wirkung zu gewährleisten, wurde die Empagliflozin-Wasser-Lösung alle zwei Tage frisch hergestellt. Zur Überprüfung der Wirkung wurde die Ausscheidung von Glukose im Spontanurin der Mäuse gemessen.

## 3.5 Histologie

### 3.5.1 Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd

Zur histochemischen Untersuchung wurden die Nieren der Versuchstiere mit der Unterstützung von Robert Götz mit einer 4%igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung perfusionsfixiert.

Die Wirkung des kurzkettigen Formaldehyd-Polymers Paraformaldehyd beruht auf der reversiblen Vernetzung von Proteinen, wodurch in der Niere postmortale autokatalytische Vorgänge verhindert werden und das Gewebe seine ursprüngliche Form beibehält. Die Perfusions-Fixierung dient somit der Konservierung und Strukturhaltung des Gewebes und erleichtert durch das Erhärten der Nieren das Anfertigen der nachfolgenden Gewebsschnitte. Für die Perfusionsfixierung wurden die Versuchstiere zunächst mit einer Kombination aus Ketamin (80 mg / kg KGW i.p.) und Xylazin (12 mg / kg KGW i.p.) anästhesiert, die Bauchdecke eröffnet und die Aorta abdominalis freigelegt und unterhalb der Aorta renalis

abgeklemmt. Distal zu der Klemme wurde die Perfusionskanüle in die Aorta abdominalis ( $\emptyset$  0,8 mm) eingeführt und fixiert. Anschließend wurde die Klemme gelöst und der Abfluss des Blutes durch Öffnung der Vena cava ermöglicht. Über die Perfusionskanüle wurde die Niere mit 37°C warmen PBS gespült und im Anschluss mit der 4%igen PFA-Lösung bei einem konstanten Druck von 100 mmHg perfundiert. Nach fünfminütiger Perfusion wurde die fixierte Niere entnommen, transversal halbiert und bis zur Weiterverarbeitung im jeweiligen Medium aufbewahrt.

### **3.5.2 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die halbierten Nieren in einer Mischung aus 1%igem PFA und 18%iger Saccharose nachfixiert, bis die Organe vollständig durchtränkt waren und im Reaktionsgefäß zu Boden sanken. Die hohe Konzentration an Saccharose wirkte dabei als Gefrierschutz. Anschließend wurden die Nierenhälften in -40°C kaltem Methylbutan kurz angefroren, in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Das Anfertigen der Gefrierschnitte erfolgte am Kryotom. Die gefrorenen Nierenhälften wurden dafür in Tissue-Tek eingebettet, in 5  $\mu$ m dicke Scheiben geschnitten und auf die Objektträger aufgezogen. Nach fünfminütigem Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur, wurden sie bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **3.5.3 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten**

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung konnte das Verteilungsmuster spezifischer Proteine im Nierengewebe analysiert werden. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der Primär-Antikörper das zu untersuchende Epitop eines Antigens bindet und es nachfolgend durch einen fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper markiert wird. Der so entstandene Antigen-Antikörper-Komplex aus Primär- und Sekundärantikörper kann durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Vor Beginn der Färbung wurden die Gefrierschnitte für 5 min auf Raumtemperatur gebracht. Im Anschluss wurden die Objektträger mit den Nierenschnitten für 5 min in PBS Otto gewaschen um das gut wasserlösliche Tissue-Tek zu entfernen. Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger für 5 min in einer Lösung aus 0,1% SDS und PBS Otto inkubiert. Durch das SDS wurden die maskierten Proteine wieder entfaltet und die Epitope für die folgende Antikörperbindung leichter zugänglich gemacht. Nach einem weiteren Waschschriff in PBS Otto wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und für 10 min mit einer Lösung aus 5% BSA, 0,04% Triton-X100 und PBS blockiert, um unspezifische Protein-Bindungsstellen abzusättigen. Nach dem darauffolgenden Waschschriff in PBS Otto wurde

der primäre Antikörper aufgetragen. Dafür wurden die benötigten Antikörper in den entsprechenden Verhältnissen (siehe Anhang Punkt 8.1.5 Antikörper) mit einer Lösung aus 0,5% BSA, 0,04% Triton-X 100 und PBS Otto verdünnt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden ungebundene primäre Antikörperreste durch zweimaliges Waschen für je 5 min in PBS Otto entfernt und anschließend die Sekundärantikörper, verdünnt in einer Lösung aus 5% BSA, 0,04% Triton-X100 und PBS Otto aufgetragen. Nach einer einstündigen Inkubation im Dunkeln, wurden die Schnitte erneut zweimal in PBS Otto gewaschen und anschließend mit vorgewärmten Mounting Medium eingedeckelt.

Nierenschnitte von mTmG-Mäusen, die das fluoreszierende Tomato oder GFP exprimieren, wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS Otto direkt in Mounting Medium eingebettet und mit einem Deckglas versiegelt. Danach wurden die Präparate im Kühlschrank für mindestens 10 min ausgehärtet.

### **3.5.4 Einbetten und Anfertigung von Paraffinschnitten**

Für die Paraffineinbettung wurden die Nierenhälften nach der Perfusionsfixierung für mindestens 12 h in 70%igen Methanol gelagert, danach in Gewebe-Einbettkassetten überführt und schrittweise durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration 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)
- 1 x 30 min Isopropanol / Paraffin (1:2) - Gemisch (55°C)
- 2 x 24 h Paraffin (60°C)

Abschließend wurden die Nieren mit Hilfe von Silikon-Kautschuk-Einbettformen in 60°C warmes Paraffin eingebettet. Die Abkühlung und Erhärtung erfolgte im Wasserbad bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden.

An einem Rotationsmikrotom wurden Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt, in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Die über Nacht getrockneten Schnitte wurden anschließenden in 100% Xylol und Isopropanol entparaffiniert.

### 3.5.5 Immunfluoreszenzfärbungen von Paraffinschnitten

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Objektträger zunächst folgendermaßen entparaffiniert und rehydriert:

- 2 x 10 min 100% Xylol
- 2 x 5 min 100% Isopropanol
- 1 x 5 min 96% Isopropanol
- 1 x 5 min 80% Isopropanol
- 1 x 5 min 70% Isopropanol
- 2 - 3 Mal kurz in Aqua dest. tauchen

Die Antikörperfärbung erfolgte nach vollständiger Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte nach folgendem Protokoll:

Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit PBS Otto wurden die Schnitte mit einem Fettstift umkreist und anschließend für 30 min mit einer Lösung aus 10%igem Pferdeserum und 1%igem BSA in PBS Otto inkubiert. Nach dem Blockieren von unspezifischen Bindungsmöglichkeiten wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper in der erforderlichen Verdünnung (verdünnt in der Blockierlösung) über Nacht, bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurde der sekundäre Antikörper nach dreimaligem Waschen mit 1%igem BSA in PBS Otto für jeweils 5 min auf die Schnitte pipettiert und für 90 min im Dunkeln in der feuchten Kammer (bei RT) inkubiert. Die folgenden Schritte wurden jeweils unter Lichtausschluss durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit PBS Otto wurden die Nierenschnitte mit vorgewärmten DAKO-Mounting Medium eingedeckelt und für mindestens 10 min bei 4°C zum Aushärten aufbewahrt.

Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind im Anhang (siehe Punkt 8.1.5) aufgelistet.

#### Analyse der Fluoreszenz-Intensität

Die Analyse der Fluoreszenz-Intensität der Kachel-Übersichtsaufnahmen (Vergrößerung 50 x) erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Nachdem die Größe der untersuchten Fläche ermittelt wurde, konnte die Fluoreszenzdichte als Quotient aus der Intensität und der Fläche berechnet werden.

#### Analyse der peritubulären Kapillaren

Für die Bestimmung der Anzahl der peritubulären Kapillaren wurden pro Tier dreizehn Aufnahmen (Vergrößerung 200-fach) angefertigt und die darauf zu sehenden CD31 positiven Kapillaren ausgezählt. Um einen Bezug zu der Anzahl der Tubuli herstellen zu können,

wurden diese ebenfalls für jede Aufnahme ausgezählt und am Ende zueinander ins Verhältnis gesetzt.

### 3.5.6 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung ermöglicht die morphologische Untersuchung eines Gewebes im mikroskopischen Bild anhand von zwei verschiedenen Einzelfärbungen. Hierbei färbt die basische Form des Hämatoxylins, das Hämalaun nach Mayer, alle Strukturen blau, die sauer bzw. basophil sind (z.B. die DNA in den Zellkernen). Das saure Eosin färbt hingegen alle basischen bzw. acidophilen Strukturen, wie das Zytoplasma und Kollagen, rot an.

Für die Färbung wurden die Nierenschnitte nach dem Entparaffinieren mit Xylol (2 x für je 10 min) anhand einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, und 70% für jeweils 5 min pro Schritt) rehydriert und anschließend 5 min lang mit Aqua dest. gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte für 2½ min mit „Mayer`s Hämalaun“-Lösung gefärbt, danach 30 sec in 0,1%ige Salzsäure gewaschen und unter fließendem Leitungswasser erfolgte die Differenzierung. Daraufhin wurden die Schnitte für 1½ min mit einer alkoholischen Eosin-Lösung gefärbt und für 30 sec in Leitungswasser gespült. Nach dem Entwässern in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% für 30 sec, 80%, 96% und 100% für je 5 min) und Xylol (2 x für je 10 min) wurden die Schnitte mit DePeX-Mounting Medium eingedeckelt.

### 3.5.7 Periodic Acid Schiff (PAS) Reaktion

Das Anfärben der Nierenschnitte mit dem „Periodic-acid-Schiff`s“-Reagenz dient dem Nachweis kohlenhydrathaltiger Komponenten, die z.B. in Bindegewebsfasern wie Kollagen vorkommen. Hierbei werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide durch die enthaltene Periodsäure zu Aldehyden oxidiert, die dann mit der im Schiff`s-Reagenz enthaltenen Fuchsin-schwefeligen Säure magentarote Komplexe bilden.

Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren wurden die Schnitte 5 min lang mit 0,5%iger Periodsäure gefärbt und nachfolgend ein bis zwei Minuten mit destilliertem Wasser gespült, bevor sie weitere 10 min im Schiff`s-Reagenz inkubiert wurden. Zur Kontrastierung erfolgte im Anschluss eine Bläuung der Zellkerne mit Hämalaun. Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte zum Entwässern mit einer aufsteigenden Ethanolreihe und Xylol behandelt und danach mit DePeX-Medium eingedeckelt.

#### Auswertung der glomerulären Fläche und des glomerulären Mesangiums:

Mit dem Programm der Software von Zeiss ZEN lite (2012) wurde die glomeruläre Fläche und die mesangiale Expansion in den Aufnahmen der PAS-gefärbten Nierenschnitte (Vergrößerung 200-fach) ausgewertet. Pro Tier wurden mindestens 50 Glomeruli vermessen. Nach der Bestimmung der glomerulären Fläche, wurde die Größe des violett gefärbten

Mesangiums abgemessen. Der prozentuale Anteil des Mesangiums an der glomerulären Fläche ergab sich aus dem Quotienten von mesangialer Fläche zur glomerulären Fläche.

### 3.6 RNA Scope: *In Situ* Hybridisierung

Für die *in situ* Hybridisierung wurden die Nieren der Versuchstiere mit der Unterstützung von Robert Götz mit 10% neutral gepuffertem Formalin (NBF) perfusionsfixiert. Die Durchführung der Perfusion erfolgte wie unter Punkt 3.5.1 beschrieben. Nach der Perfusion wurden die Nieren für mindestens 16 h (maximal 32 h) in 10% NBF bei Raumtemperatur nachfixiert und in Paraffin eingebettet. Die Einbettung erfolgte wie unter Punkt 3.5.4 beschrieben, jedoch mit ausschließlich reinen, analytischen Alkoholen (p.A.). Im Anschluss wurden 5 µm dicke Schnitte von den eingebetteten Nieren angefertigt und innerhalb von sieben Tagen mit Hilfe der RNA Scope Technologie auf ihre Renin mRNA Expression untersucht.

Die *in situ* Hybridisierung wurde gemäß dem Protokoll von ACD und einer Einführung von Dr. Katharina Gerl (Institut für Physiologie, Universität Regensburg) wie folgt durchgeführt:

#### Tag 1

- Backen der Schnitte im Trocknungssofen für 1 h bei 60°C
- Deparaffinieren der Schnitte unter dem Abzug:
  - 2 x 5 min in Xylol
  - 2 x 1 min in 100% Ethanol → Lufttrocknen für 5 min bei RT
- Vorbehandlung der Schnitte:
  - 5-8 Tropfen Wasserstoffperoxid pro Objektträger für 10 min bei RT
  - Waschen mit Aqua bidest.: Schnitte 3-5 x im Behälter auf und ab bewegen
  - Kochen in 1x „Target Retrieval“-Lösung für 15 min
  - Waschen in Aqua bidest: 2 x 3-5 x auf und ab
  - Waschen in 100 % Ethanol: 3-5 x auf und ab → Lufttrocknen
  - Nierenschnitte mit Fettstift einkreisen, trocknen lassen (ggf. über Nacht)

#### Tag 2

- Schnitte im „HybEZ Slide Rack“ platzieren und ca. 3 Tropfen Protease Plus auf jeden Schnitt geben
- Inkubation für 30 min bei 40°C im HybEZ-Ofen
- Waschen in Aqua bidest.: 2 x 3-5 x auf und ab
- Hybridisierung:
  - Überschüssige Flüssigkeit entfernen, 2-3 Tropfen der **Renin-Sonde** auf den Schnitt geben → Inkubation für 2 h bei 40°C im HybEZ-Ofen; danach Waschen in Waschpuffer: 2 x für 2 min bei RT
  - Überschüssige Flüssigkeit entfernen, 2-3 Tropfen von **Amp-1** auf den Schnitt geben → Inkubation für 30 min bei 40°C im HybEZ-Ofen; danach Waschen in Waschpuffer: 2 x für 2 min bei RT

- Überschüssige Flüssigkeit entfernen, 2-3 Tropfen von **Amp-2** auf den Schnitt geben → Inkubation für 15 min bei 40°C im HybEZ-Ofen; danach Waschen in Waschpuffer: 2 x für 2 min bei RT
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen, 2-3 Tropfen von **Amp-3** auf den Schnitt geben → Inkubation für 30 min bei 40°C im HybEZ-Ofen; danach Waschen in Waschpuffer: 2 x für 2 min bei RT
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen, 2-3 Tropfen von **Amp-4** auf den Schnitt geben → Inkubation für 15 min bei 40°C im HybEZ-Ofen; danach Waschen in Waschpuffer: 2 x für 2 min bei RT
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen, 2-3 Tropfen von **Amp-5** auf den Schnitt geben → Inkubation für 30 min bei RT; danach Waschen in Waschpuffer: 2 x für 2 min bei RT
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen, 2-3 Tropfen von **Amp-6** auf den Schnitt geben → Inkubation für 30 min bei RT; danach Waschen in Waschpuffer: 2 x für 2 min bei RT
- Detektion des Signals:
  - Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:2 vermischen, Überschüssige Flüssigkeit entfernen und etwa 50 µl DAB-Lösung (A+B) auf die Schnitte geben → Inkubation für 10 min bei RT
  - DAB durch Waschen mit Aqua bidest. entfernen
- Co-Färbung:
  - 50 % Hämatoxylin für 2 min bei RT, 2 x kurz Waschen in Aqua bidest.
  - 10 sec in 0,02%igem Ammoniakwasser, 1 x kurz Waschen in Aqua bidest.
- Eindeckeln der Schnitte
  - Inkubation in 70% Ethanol für 2 min
  - Inkubation in 100% Ethanol für 2 min
  - Inkubation in Xylol für 5 min
  - Eindeckeln mit Serva Mounting Medium → Trocknung

Im Anschluss wurde das Signal für die Renin mRNA unter dem Durchlicht-Mikroskop ausgewertet.

## 3.7 Mikroskopie

### 3.7.1 Licht-/Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung und Aufnahme der Nierenschnitte erfolgte mit Hilfe eines Axiovert200M-Mikroskops mit motorisierter Objektauflage, einer Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) für Immunfluoreszenz gefärbte Schnitte sowie einer Farbkamera (AxioCam105 color) für immunhistochemisch gefärbte Schnitte zusammen mit der Software ZEN lite (2012) von Zeiss. Die Farbstoffe der verwendeten sekundären Antikörper wurden unter Zuhilfenahme passender Fluoreszenzfilter angeregt und das entstandene Emissionslicht im jeweiligen Spektralbereich aufgenommen (Tab. 3.1).

**Tabelle 3.1:** Konjugate für die Fluoreszenzfärbung mit den jeweiligen Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Konjugation	Anregung (nm)	Emission (nm)
Cy2	450 - 490	500 - 550
TRICT	533 - 558	570 - 640
DAPI	345	455

### 3.7.2 Konfokale Mikroskopie

Um Abbildungen kontrastreicher und mit hoher Auflösung darstellen zu können, wurde in dieser Arbeit ein konfokales Laser Scanning-Mikroskop (LSM710-Mikroskop, Carl Zeiss) verwendet. Die Einführung am Mikroskop erfolgte mit der Unterstützung von Uwe de Vries (AG Prof. Ralf Witzgall, Institut für Anatomie, Universität Regensburg)

In der konfokalen optischen Anordnung wird das Objekt in der Brennebene des Objektivs durch eine Punktlichtquelle beleuchtet. Das vom Objekt stammende Licht wird durch einen Strahlteiler in Richtung des Punktlichtdetektors (Lochblende) reflektiert und nachgewiesen. Der Punkt in der Mitte der Lochblende und der Beleuchtungspunkt im Präparat sind dabei konfokal zueinander, das heißt, sie sind gleichzeitig im Fokus. Licht, das von außerhalb der Brennebene stammt, wird durch die Lochblende von der Detektion ausgeschlossen. Dadurch gibt es keine Beiträge von unscharfen Objektteilen. Bei Untersuchungen fluoreszierender Objekte wird so der unscharfe „Schleier“, das heißt unvermeidbar auftretendes Licht von Bereichen außerhalb der Brennebene wirksam unterdrückt. Zudem wird bei dem konfokalen Laser Scanning-Mikroskop, im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie, nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern mit Hilfe eines fokussierten Lasers, der über einen Scan-Spiegel bewegt wird, punktwise abgerastert. Das dabei entstandene Fluoreszenzlicht wird von einem Detektor aufgefangen und an den Computer weitergeleitet [266].

Die Verarbeitung der Daten erfolgte mittels der Software Zeiss ZEN lite (2012). Zur Anregung der Fluoreszenz dienten Laser der Wellenlänge 405 nm (DAPI), 488 nm (Cy2) und 561 nm (TRITC).

### 3.7.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen wurden von Helga Othmen (AG Prof. Ralf Witzgall, Institut für Anatomie, Universität Regensburg) durchgeführt.

Hierfür wurden die Nieren wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben perfundiert und in einer 3%igen Lösung aus Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,4) über einen Zeitraum von 72 h nachfixiert. Nach Osmierung (zur Anfärbung von Nervengewebe, Fetten und des



Golgiapparats) wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und in Epoxidharz eingebettet. Mit Hilfe eines Ultra-Mikrotoms wurden 50 nm dicke Schnitte des Nierengewebes hergestellt, die nachfolgend mit einer 4%igen Uranylacetat- und einer 0,5%igen Bleicitratlösung kontrastiert wurden. Die Aufnahmen der Nierenschnitte erfolgten mit dem Transmissionselektronenmikroskop „Zeiss 905“. Die Vergrößerungen sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

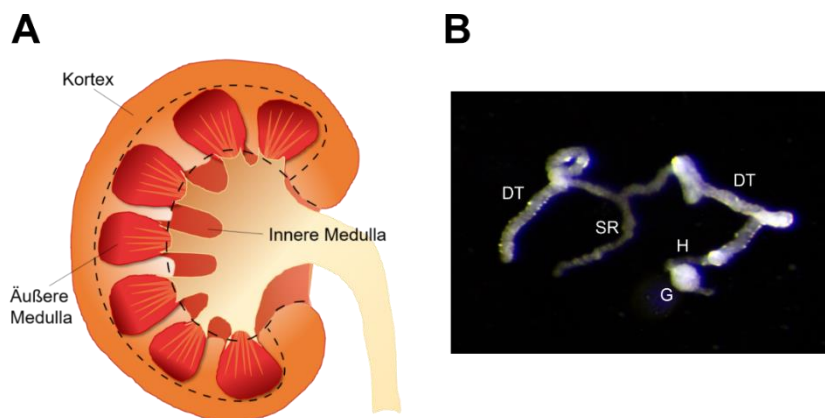
#### Ausmessung der Basalmembran und der Fußfortsätze:

Mit Hilfe des Programms ImageJ wurden auf den Aufnahmen der Transmissionselektronenmikroskopie (Vergrößerung: 7000-fach) die Breite der Basalmembran und der Fußfortsätze bestimmt. Alle Fußfortsätze pro Aufnahme wurden einzeln vermessen und pro Tier gemittelt. Die Dicke der Basalmembran wurde aus dem Quotienten der abgemessenen Fläche und der Länge der Basalmembran bestimmt.

### 3.8 Mikrodissektion

Für die Analyse der Renin mRNA wurden die Glomeruli, Tubuli bzw. Sammelrohre manuell mit Hilfe eines Stereomikroskops isoliert. Für die Isolation der Sammelrohre wurde die Niere

sagittal in drei bis vier Scheiben geschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 37°C warmer Verdauungslösung gegeben. Für die Isolation der Glomeruli und Tubuli von Kortex und Medulla wurde die Niere vorab in Kortex, äußere und innere Medulla zoniert (Abb.



**Abb. 3.2: A. Skizzenhafte Darstellung der drei Nierenzonen. B. Mikrodisszeziertes Nephronsegment.** DT: distaler Tubulus, SR: Sammelrohr, H: Henle Schleife, G: Glomerulus.

3.2). Die innere Medulla wurde für die darauffolgende RNA Isolation in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80°C aufbewahrt. Der Kortex, und die äußere Medulla wurden gesondert in jeweils ein 2 ml Reaktionsgefäß mit vorgewärmter Verdauungslösung gegeben. Die Nierenstücke wurden im Anschluss für den ersten Verdauungsschritt für 10 min bei 850 rpm und 37°C in den Thermoschüttler gestellt, danach wurde ca. 1 ml aus der Verdauungslösung entnommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit 1 ml gekühlter 1%iger BSA-Lösung, überführt. Um ein Absetzen der einzelnen Nierenbestandteile zu ermöglichen, wurde die Suspension für mindestens 5 min auf Eis gestellt. Nachdem Verwerfen von etwa 1 ml Überstand, wurde anschließend die restliche Suspension in einer Petrischale nochmals mit

MEM im Verhältnis 1:2 gemischt. Die Glomeruli, Tubuli und Sammelrohre wurden anschließend auf Eis unter dem Mikroskop bei einer 16fachen Vergrößerung mit einer Mikroskopiernadel von einander separiert und mit einer Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Währenddessen wurde das Reaktionsgefäß mit der Niere wieder mit 1 ml vorgewärmter Verdaulösung aufgefüllt und für weitere 5 min in den Schüttler gestellt. Anschließend wurde wie beim vorherigen Verdau 1 ml der Verdaulösung entnommen und in ein neues mit 1%igem BSA gefülltes Reaktionsgefäß gegeben. Dies wurde je nach Ergiebigkeit bis hin zum 7. - 8. Verdau so fortgeführt. Die gesammelten einzelnen Fragmente wurden am Ende bei 4°C und 5000 g für 5 min zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### **3.9 RNA-Isolation und -Analyse**

#### **3.9.1 Isolation der Messenger-RNA aus renalem Gewebe**

Die Extrahierung der Messenger-RNA (mRNA) aus den Glomeruli, Tubuli und der inneren Medulla erfolgte mit dem TRIsure-Reagenz von Bioline. Hierbei handelt es sich um eine einphasige Lösung, die Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält. Nach der Zugabe von Chloroform erfolgt die Auftrennung in drei Phasen: eine grüne Phenolphase, eine weiße Proteinphase und eine farblose wässrige Phase, in der die RNA enthalten ist. Die RNA kann im Anschluss mit Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt werden.

Zu Beginn der Isolation wurde das Gewebe mit Hilfe eines Tissue Grinders und dem Zusatz von 200 µl TRIsure für 30 sec in einem 1,5 ml Cup homogenisiert und durch mehrfaches Einfrieren in flüssigen Stickstoff aufgeschlossen. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT wurde der Probe 40 µl Chloroform zugegeben, das Cup 2 - 3 Mal invertiert und 20 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 100%igem Isopropanol wurde die RNA nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol (hergestellt mit DEPC-Wasser) gewaschen und bei 7500 rpm und 4°C erneut für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand nahezu restlos abgesaugt und das RNA-Pellet auf dem Schüttler vollständig getrocknet. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Pellet in 15-20 µl Nuklease-freiem Wasser für 5 min bei 65°C auf dem Schüttler solubilisiert und bei -80°C gelagert.

### 3.9.2 Isolation der Messenger-RNA aus Zellen

Direkt nach Ablauf der 24-stündigen Stimulation wurden die mCT1 Zellen mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 600 µl TRIsure pro Well bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Wells abgetrennt und das Zelllysat in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde die RNA-Isolation wie oben beschrieben (Punkt 3.9.1) weiter durchgeführt. Die Mengen wurden aufgrund des größeren Volumens an TRIsure folgendermaßen angepasst: 120 µl Chloroform, 300 µl Isopropanol, 600 µl 75%iges Ethanol. Gelöst wurde ebenfalls in 15-20 µl Nuklease-freiem Wasser.

### 3.9.3 RNA Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA aus den Proben erfolgte über die optische Dichte mit einem Nano Drop-ND-1000-Spektralphotometer. Über die gemessene Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die Konzentration der RNA in ng / µl berechnet. Da Proteine bei 280 nm maximal absorbieren, konnte über den Quotienten der optischen Dichten 260/280 nm eine Aussage über die Reinheit der Lösung getroffen werden. Für die folgende cDNA-Synthese wurden nur Proben mit einem Quotienten zwischen 1,7 und 2,0 verwendet.

### 3.9.4 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde im nächsten Schritt mittels reverser Transkription in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Um dabei nur mRNA-Moleküle zu transkribieren, wurden Oligo-dT(Desoxythymidin)-Primer verwendet, welche selektiv an den 3'-Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNA binden. Eine definierte Menge der isolierten RNA (2 µg aus den Zellen; 500 ng-1 µg aus dem Gewebe) wurde mit den Oligo-dT-Primern vermengt, mit Nuklease-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65°C im Blockcycler aufgeheizt. Im Anschluss wurde ein Master Mix bestehend aus den folgenden Komponenten zugegeben:

Bestandteil	Menge in [µl]
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	3
dNTPs	4
5 x First Strand Buffer	4
M-MLV-Reverse Transkriptase	1

Die cDNA-Synthese erfolgte binnen 1 h bei 37°C. Abschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 2 min auf 96°C erhitzt. Vor der weiteren Analyse

mittels quantitativer Real-Time PCR wurde die cDNA mit 22 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

### 3.9.5 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ist ein Verfahren, bei der DNA vervielfältigt und die genaue Menge dieser amplifizierten DNA in Echtzeit (engl. „real time“) bestimmt werden kann. Dies geschieht durch einen DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der sich während jedem Vervielfältigungsschritt an die neu gebildete doppelsträngige DNA anlagert. Das Signal des Farbstoffs wird nach jedem Zyklus neu gemessen und korreliert quantitativ mit der Menge an gebildetem PCR-Produkt. Diese Methode erlaubt es, Aussagen über die Expressionsstärke bestimmter Gene in einer DNA-Probe zu treffen. Die Spezifität erreicht man mit einem Primer-Paar (zwei Oligonukleotide), das aufgrund seiner Basenabfolge nur an ein bestimmtes Zielgen binden kann und so auch nur dieses amplifiziert wird.

Für die Durchführung wurde das Lightcycler 480® SYBR Green I Master Kit und der Lightcycler LC480 von Roche verwendet.

Zum Ausgangsmaterial von 1 µl cDNA wurden 9 µl des folgenden Master Mix zugegeben:

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge in [µl]</b>
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	3
SYBR Green Master Mix	5
Primer sense	0,5
Primer antisense	0,5

Die Amplifizierung erfolgte unter folgendem Protokoll:

<b>Zyklen</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Phase</b>
1	95°C	5 min	<b>Aktivierung</b>
45	95°C	10 sec	<b>Denaturierung</b>
	60°C	20 sec	<b>Annealing</b>
1	72°C	20 sec	<b>Elongation</b>
	60°C	1 min	<b>Schmelzen</b>
1	95°C	1 min	<b>Schmelzen</b>
1	4°C	∞	<b>Abkühlen</b>

Am Ende jedes Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung. Um das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA zu analysieren, wurde nach Ablauf des Amplifikationsprogrammes die DNA langsam (0,1°C / sec) von 60°C auf 95°C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Bei einer spezifischen Temperatur, die je nach Größe für jedes Amplifikat unterschiedlich sein kann, bricht die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge

auseinander. Dabei wird das gebundene SYBR Green freigesetzt und verliert seine fluoreszierende Wirkung. Die größte Änderung der Fluoreszenz entspricht also der spezifischen Schmelztemperatur eines Produktes, welches dann genau zu diesem Zeitpunkt in seine Einzelstränge zerfällt. Die entstandenen Schmelzkurven dienen dazu, zwischen verschiedenen PCR-Produkten zu unterscheiden. Bei einer optimalen PCR sollte somit nur ein spezifisches Produkt entstanden sein.

Die Quantifizierung der mRNA Expression erfolgte anhand einer Standardkurve mit der zugehörigen LightCycler Software, die Ergebnisse wurden auf ein Referenzgen innerhalb der Probe bezogen und somit normalisiert. Diese sogenannten Houskeeper-Gene, wie zum Beispiel 18s, RPL32 oder  $\beta$ -Actin wurden als konstant angesehen.

## **3.10 Blutanalysen**

### **3.10.1 Blutentnahme**

Vor und am Ende des jeweiligen Versuchs wurde den wachen Mäusen Vollblut aus der Vena facialis durch Punktion entnommen und in eine EDTA Kapillare überführt. Die Kapillaren wurden anschließend an einer Seite mit Critoseal verschlossen und in einer Hämatokrit-Zentrifuge bei 8000 rpm für 6 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Hämatokrit bestimmt, das gewonnene Plasma in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für die weitere Analyse aufbewahrt.

### **3.10.2 Bestimmung der Plasmakonzentration von Prorenin und aktiven Renin**

Für die Bestimmung der Konzentration von Prorenin und aktiven Renin im Plasma wurde das über die Vena facialis der wachen Maus gewonnene Plasma verwendet. Die Ermittlung der Reninkonzentration erfolgte über die Aktivitätsmessung anhand der Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin I mit Hilfe eines kompetitiven Angiotensin I ELISAs der Firma IBL International GmbH. Als Quelle für das dafür benötigte Angiotensinogen diente das Plasma bilateral uninephrektomierter Ratten (Reninsubstrat), mit dem die Plasmaprobe inkubiert wurden. Die Menge an entstandenem Angiotensin I war proportional zum Gehalt an Renin in der untersuchten Probe. Für den Nachweis von Prorenin wurde vor der Durchführung des ELISAs eine Aktivierung der Prorenins im Plasma zu aktiven Renin, mit Hilfe der Protease Trypsin durchgeführt. Trypsin kann bei  $37^{\circ}\text{C}$  das in der Probe enthaltene Prorenin zu aktiven Renin umwandeln, in dem es die Prosequenz des Vorläufermoleküls abspaltet. Aus der Differenz der Proben, die aktiviert wurden und denen, die nicht der Protease Trypsin ausgesetzt waren, ergibt sich die Konzentration an Prorenin in der Plasmaprobe, die in aktives Renin umgewandelt werden konnte.

Für die Versuchsdurchführung wurden die Plasmaproben vorab 1:3 mit Maleatpuffer verdünnt. Anschließend wurden für jede Probe zwei Ansätze vorbereitet:

1. Ansatz für die Aktivierung von Prorenin zu Renin (Trypsinaktivierung): 10 µl vorverdünnte Probe wurde mit 10 µl Trypsin (2,5 mg / ml Maleatpuffer) vermischt und für 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 µl Trypsininhibitor (10 mg / ml Maleatpuffer) auf Eis abgestoppt.
2. Ansatz für die Plasmakonzentration von aktiven Renin (Reninkonzentration): 10 µl der vorverdünnten Probe wurden mit 10 µl Maleatpuffer vermischt und für 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden, wie im ersten Ansatz 50 µl Trypsininhibitor (10 mg / ml) auf Eis hinzugefügt und vermischt.

Zur Ermittlung eines Nullwertes wurden 10 µl Maleatpuffer mit 10 µl Trypsin (2,5 mg / ml) versetzt, identisch mit den Ansätzen 1 und 2 behandelt und mit 50 µl Trypsininhibitor (10 mg / ml) aufgefüllt.

Im Anschluss wurden die Proben für den ELISA vorbereitet. Dafür wurde zu jeder Probe 26 µl Reninsubstrat, 10 µl Generation Buffer und 1 µl PMSF zugegeben und vermengt. Für die folgende 90-minütige Inkubation wurden die Proben in Kalt- und Warmwert aufgeteilt und jeweils 53 µl davon in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Kaltwert wurde bei 4°C, auf Eis im Kühlschrank verwahrt, der Warmwert bei 37°C im Wasserbad. Nach der Inkubation wurden 47 µl der Probe und die gleiche Menge an Standards auf die ELISA-Platte pipettiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (IBL International GmbH).

Das Prinzip eines kompetitiven ELISAs beruht darauf, dass das neu gebildete Angiotensin I in der Probe, mit dem zugegebenen biotinylierten Angiotensin I um die Bindestellen des anti-Angiotensin-I-Antikörpers konkurriert. Im zweiten Schritt bindet das Streptavidin-HRP-Konjugat an das immobilisierte Angiotensin-I-Biotin, an welches sich wiederum das farbbildende Tetramethylbenzidin (TMB) anknüpfen kann. Dieses fungiert mithilfe von Wasserstoffperoxid als Starter einer Farbreaktion. Nach dem Stoppen der Farbreaktion mit einer Schwefelsäure-haltigen Lösung, kann die Extinktion des biotinyliertem Angiotensin I gemessen werden. Die Absorptionwerte sind dabei indirekt proportional zur Konzentration an Angiotensin I in der Probe. Die Auswertung der Angiotensin I Konzentration bzw. des Reningehaltes erfolgt mit Hilfe einer Standardkurve aus bekannten Konzentrationen. Nach Abzug des Nullwertes wurde der Kaltwert von dem Warmwert subtrahiert. Für die Bestimmung der Konzentration von Prorenin im Plasma wurde die Differenz aus Ansatz 1 (Trypsinaktivierung) und Ansatz 2 (Reninkonzentration) gebildet.

## **3.11 Urinalysen**

### **3.11.1 Spontanurin**

Zur Gewinnung des Spontanurins wurden die Versuchstiere zweimal an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (1x vormittags und 1x nachmittags) in saubere Boxen frei von Einstreu gesetzt und die spontane Urinabsetzung abgewartet. Die gesammelte Urinprobe wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

### **3.11.2 Stoffwechselkäfig**

Versuche im Stoffwechselkäfig ermöglichen die genaue Bestimmung des Urinvolumens und der Trinkmenge über einen bestimmten Zeitraum. Die Versuchstiere wurden einzeln in metabolischen Käfigen untergebracht, die das separate Auffangen von Urin und Kot ermöglichten. Wasser und Futter standen den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Nach einer Eingewöhnungsphase von zwei Tagen wurde der Urin in einem 24-Stunden-Rhythmus über drei Tage gesammelt und bis zur weiteren Nutzung bei -20°C aufbewahrt. Um die Trinkmenge während der Messzeiten zu ermitteln, wurden die Flaschen vor und nach dem Aufenthalt im Stoffwechselkäfig gewogen.

### **3.11.3 Bestimmung der Uringlukosekonzentration**

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration im Urin wurden die Spontanurinproben 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Davon wurden 1-2 µl auf einen Accu Check Teststreifen pipettiert und mit Hilfe des dazu gehörigen Accu Check Messgeräts gemessen.

### **3.11.4 Bestimmung der Reninkonzentration im Urin**

Die Reninausscheidung wurde mit Hilfe des kompetitiven Angiotensin I ELISAs der Firma IBL International GmbH bestimmt. Das genaue Prinzip wurde bereits in Punkt 3.10.2 beschrieben. Für die Durchführung wurde unverdünnter Spontanurin verwendet. 67 µl davon wurden zusammen mit 26 µl Reninsubstrat, 10 µl Generation Buffer und 1 µl PMSF vermengt. Die Probe wurde in Warm- und Kaltwert aufgeteilt und für 90 min bei 37°C im Wasserbad (Warmwert) bzw. bei 4°C, auf Eis im Kühlschrank (Kaltwert) inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 47 µl von jeder Probe auf die 96-Well-Platte des ELISAs pipettiert und weiter nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

### **3.11.5 Bestimmung der Albuminausscheidung**

Für die Bestimmung des Albumingehalts im Spontanurin wurde ein ELISA der Firma ICL verwendet. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA, bei dem der primäre Antikörper an der festen Phase der 96-Well-Platte fixiert ist. Das Albumin aus der Urinprobe kann an diesen Antikörper binden. Nach einem Waschschrift, in dem ungebundene Proteine entfernt werden, wird der sekundäre Antikörper zugegeben, der ebenfalls an Albumin bindet und einen Sandwich-Komplex formt. Die an diesen Antikörper gebundene HRP katalysiert die Umsetzung des chromogenen Substrats TMB. Die Intensität der UV-Absorption des entstandenen Chromophors ist direkt proportional zur Albuminkonzentration der Urinprobe.

Die Durchführung der Plasmaalbuminbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Hierfür wurde der Spontanurin im Verhältnis 1:500 mit der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung vermischt. Die Auswertung der Konzentration wurde mit Hilfe einer Standardkurve durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse für den Albumingehalt des Urins wurden gegen die ermittelten Kreatininkonzentrationen im Urin normalisiert und in Form des Albumin-Kreatinin-Quotients angegeben.

### **3.11.6 Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin**

Die in Punkt 3.11.5 beschriebene Albuminausscheidung wurde auf die Menge an Kreatinin im Spontanurin bezogen. Die Ausscheidung von Kreatinin mit dem Harn erfolgt mit einer relativ konstanten Rate und eignet sich damit gut als Bezugsgröße für andere Parameter des Urins. Zur Bestimmung der Kreatininkonzentration wurde das QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit (BioAssaySystems) verwendet. Der Assay beruht auf der „Jaffe-Reaktion“, bei der Kreatinin mit der im Kit enthaltenen Pikrinsäure einen Meisenheimer-Komplex bildet, der eine orange Färbung aufweist. Diese kann durch Messung der Absorption bei 490-530 nm zur quantitativen Bestimmung des Kreatinins herangezogen werden, da die Intensität der Farbe direkt proportional zur Kreatininkonzentration in der Probe ist. Die Bestimmung wurde mit 5 µl unverdünntem Spontanurin nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt und die Absorption bei 492 nm gemessen.

### **3.11.7 Bestimmung der Natrium- und Kalium-Ausscheidung**

Die Konzentration der Natrium- und Kalium-Ionen im Spontanurin der Versuchstiere wurde mit einem Flammenphotometer (BWB-XP) bestimmt. Die Flammenphotometrie ist eine emissionsspektroskopische Methode zur quantitativen Analyse von Ionen der Alkali- und Erdalkali-Gruppe. Beim Erhitzen gehen die Ionen zunächst in den gasförmigen und dann in



den atomaren Zustand über, fallen aber nach kurzer Zeit in den Grundzustand zurück und senden dabei Licht einer spezifischen Wellenlänge aus. Die Intensität des emittierten Lichts ist hierbei direkt proportional zur Stoffmenge des Ions. Für die Messung wurden die Urinroben mit entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Das Photometer wurde zuvor mit Standards mit definierten Konzentrationen geeicht. Der Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>- Gehalts des Urins wurde für die Auswertung auf die Osmolarität der Urinprobe bezogen. Dafür wurde zusätzlich die Osmolarität der Urinproben mit Hilfe der Gefrierpunktserniedrigung am Osmometer (Osmomat 030) ermittelt.

### **3.12 Bestimmung der Gewebekonzentration von Prorenin und aktiven Renin**

Für die Bestimmung der Konzentration an Prorenin und aktiven Renin in renalem Gewebe wurden die Nieren der Versuchs- und Kontrolltiere vorab in Kortex, äußeres und inneres Mark zioniert und abgewogen (s.h. Abb. 3.2). Die Papille und das äußere Mark wurden komplett eingesetzt. Vom Kortex wurde nur ein kleinerer Anteil verwendet, welcher an das Gewicht des äußeren Marks angepasst wurde (ca. 40 mg). Zur Bestimmung der Konzentration an aktiven Renin wurde wieder die Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen mit Hilfe des Angiotensin I ELISAs der Firma IBL International GmbH gemessen.

Die einzelnen Nierenzonen wurden im Anschluss in frisch hergestellten Homogenisierungspuffer auf Eis zerkleinert. Der Kortex und das äußere Mark wurden in 1 ml Puffer mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert, die Papille in 100 µl Puffer unter Verwendung eines elektronischen Stößels zerkleinert. Nach dem Homogenisierungsschritt wurden die Proben bei 13000 rpm für 20 min und 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für den ELISA wurde der Kortex und das äußere Mark 1:100 mit Maleatpuffer verdünnt, die Papille wurde unverdünnt eingesetzt. Anschließend wurden für jede Probe zwei Ansätze vorbereitet:

1. Ansatz für die Aktivierung von Prorenin zu Renin (Trypsinaktivierung): 10 µl Probe wurde mit 10 µl Trypsin (2,5 mg / ml Maleatpuffer) vermischt und für 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 µl Trypsininhibitor (10 mg / ml Maleatpuffer) auf Eis abgestoppt.
2. Ansatz für die Plasmakonzentration von aktiven Renin (Reninkonzentration): 10 µl der Probe wurden mit 10 µl Maleatpuffer vermischt und für 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden, wie im ersten Ansatz 50 µl Trypsininhibitor (10 mg / ml) auf Eis hinzugefügt und vermischt.

Zur Ermittlung eines Nullwertes wurden 10 µl Maleatpuffer mit 10 µl Trypsin (2,5 mg / ml) versetzt, identisch mit den Ansätzen 1 und 2 behandelt und mit 50 µl Trypsininhibitor (10 mg / ml) aufgefüllt.

Die weitere Durchführung und Auswertung erfolgte wie unter Punkt 3.10.2 beschrieben.

Einzige Abwandlung war die Darstellung der Ergebnisse, mit Bezug auf das jeweils eingesetzte Gewicht.

### **3.13 Telemetrische Blutdruckmessung**

Für die Blutdruckmessung an wachen, frei beweglichen Mäusen wurden den Versuchstieren miniaturisierte PhysioTel®PA-C10 Telemetrie-Sender der Firma Data Sciences International implantiert. Die Implantation der Telemetrie-Sender erfolgte durch Prof. Frank Schweda.

Der Sender ermöglichte die Aufzeichnung von Pulsrate, Blutdruck und motorischer Aktivität der Mäuse. Für das Einsetzen des Implantats wurden die Mäuse mit einem 2%igen Isofluran-Sauerstoffgemisch narkotisiert, die linke Arteria carotis freipräpariert, der Katheter des Telemetrie-Senders eingeführt und mit einem Haltefaden fixiert. Im Flankenbereich, unterhalb der Vorderläufe wurde eine kleine Tasche präpariert und der Sender platziert. Nach Implantation der Telemetrie-Sender wurden die Tiere in Einzelkäfige gesetzt, in denen sie sich frei bewegen konnten. Messbeginn war eine Woche nach Implantation des Senders. Bis dahin hatten sich die Tiere vom operativen Eingriff erholt und die Wundheilung war vollständig abgeschlossen. Während der für die Tiere unbemerkbaren Messung des Blutdrucks und der Herzfrequenz wurden die gemessenen Daten kontinuierlich über den Sender auf einen Computer übertragen und mit Hilfe der Software "Dataquest ART Data Acquisition" (Data Sciences International) ausgewertet.

### **3.14 Zellkultur**

Die Stimulation, Isolierung der mRNA aus den Zellen und die nachfolgende qPCR wurden mit der Unterstützung von Katharina Ehm durchgeführt.

Als renales Zellmodell wurde die aus der H-2K<sup>b</sup>-ts A58 transgenen Maus (ImmortoMaus) stammende immortalisierte Sammelrohr-Zelllinie mCT1 (murine Collecting Tubule 1) [267] verwendet (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ralf Witzgall, Institut für Anatomie, Universität Regensburg). Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit dem kommerziell erhältlichen Medium DMEM/GlutaMAX (low Glucose), supplementiert mit 10% FBS (Hitze-inaktiviert), 1% Penizillin / Streptomycin, 1 % Insulin / Transferrin / Selenium, 3,8 nM Trijodthyronin (T<sub>3</sub>) und 5 nM Dexamethason. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75

cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche bis zur Konfluenz herangezogen und für die entsprechenden Versuche gesplittet.

### **3.14.1 Stimulation mit Glukose und Succinat**

Die mCT1 Zellen wurden einen Tag vor der Stimulation ausgesät (300.000 Zellen pro Well in eine 6-Well Platten mit 8,87 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) und anschließend für 24h mit verschiedenen Konzentrationen an Glukose bzw. an Succinat stimuliert. Als Basismedium für die Stimulation wurde das DMEM/GlutaMAX (low Glucose) Medium mit 1% Penizillin / Streptomycin, 3,8 nM T<sub>3</sub> und 5 nM Dexamethason versetzt und die jeweilige Konzentration an Glukose oder Succinat zugegeben. Basal war bereits 5 mM Glukose in dem Medium enthalten. Für die Stimulation der Renin mRNA Expression wurde die Glukosekonzentration im Medium stufenweise erhöht von 5 mM (basal) auf 10, 20, 30, 40 und 50 mM Glukose. Des Weiteren wurden verschiedene Konzentrationen an Succinat als Stimulans getestet, angefangen bei dem Zusatz von 5 mM Succinat, über 10, 20, 30, 40 bis hin zu 50 mM. Nach der 24stündigen Stimulation wurden das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und jedes Well mit 600 µl TRIsure versetzt. Bis zur RNA Isolation wurden die Platten bei -80°C gelagert.

### **3.15 Statistische Auswertung**

Alle erhobenen Daten wurden als Mittelwert (MW) der Einzelmessungen + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen erfolgten mit Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 6. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bzw. zwischen verschiedenen Zeitpunkten wurden anhand der zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender Bonferroni-post-hoc-Korrektur berechnet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde bei p<0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

## 4 Ergebnisse

Diese Arbeit dient der Untersuchung der funktionellen Bedeutung des lokalen Renin-Angiotensin-Systems der Niere, insbesondere der Rolle des Sammelrohr-Renins. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Rolle des Sammelrohr-Renins während der Nierenentwicklung untersucht und die Frage beantwortet, ob die durch generelle Deletion einzelner Komponenten des RAS induzierten morphologischen und funktionellen Veränderungen in der Niere auf das Sammelrohr-Renin zurückzuführen sind. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle des tubulären Renins beim Diabetes Mellitus und dessen Relevanz bei der Entwicklung und Progression der diabetischen Nephropathie.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Mauslinien mit einer sammelrohrspezifischen oder einer tubulusspezifischen Deletion des Reningens generiert, und bezüglich physiologischer und pathophysiologischer Veränderungen charakterisiert. Um die Rolle des tubulären Renin-Systems beim Diabetes Mellitus zu untersuchen, wurden Mäuse mit Typ 1- und Typ 2-Diabetes, sowie Nierenbiopsien von Diabetespatienten genauer analysiert. Zudem wurde an Hand eines Zellkulturmodells die Auswirkung einer Glukose-, bzw. Succinatstimulation auf die Reninexpression getestet.

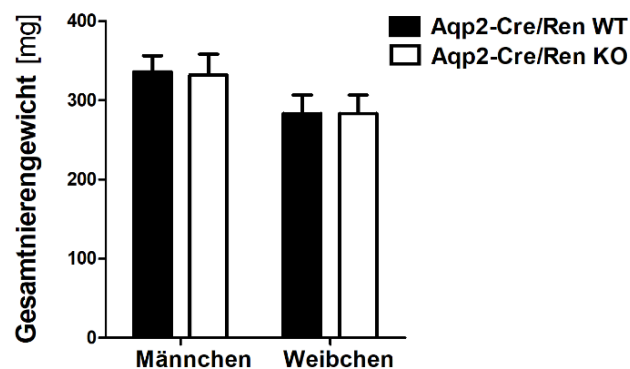
### 4.1 Wahl des geeigneten Mausmodells für die Untersuchung des tubulären Renin-Systems

#### 4.1.1 Charakterisierung der sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Maus

Um gezielt die funktionelle Rolle des Sammelrohr-Renins beantworten zu können, musste ein geeignetes Mausmodell etabliert werden. Da bei konventionellen Knockoutlinien des Renin-Angiotensin-Systems sowohl das zirkulierende, als auch das lokale RAS betroffen sind, lassen diese keine getrennte Bewertung des tubulären Renins zu. Um diese Problematik zu umgehen, wurde eine Maus mit gefloxtem Reningen generiert ( $Ren1^{flox/flox}$ ), die es erlaubte, zellspezifisch die Reninbildung auszuschalten. Die  $Ren1^{flox/flox}$ -Mäuse wurden mit einer Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Aquaporin2-Promotors exprimiert, verpaart. Die so generierten sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Mäuse ( $Aqp2-Cre/Ren1^{flox/flox}$ , im Folgenden  $Aqp2-Cre/Ren KO$ ) wurden zur Untersuchung der Rolle des lokalen Renins bei der Nierenentwicklung herangezogen. Die Geburtenrate der Mäuse wies ein ausgewogenes Verhältnis an Knockout- und Wildtyp-Geschwistertieren auf. Eine erhöhte Letalität der Neugeborenen war nicht erkennbar.

#### 4.1.1.1 Untersuchung der Nierenentwicklung

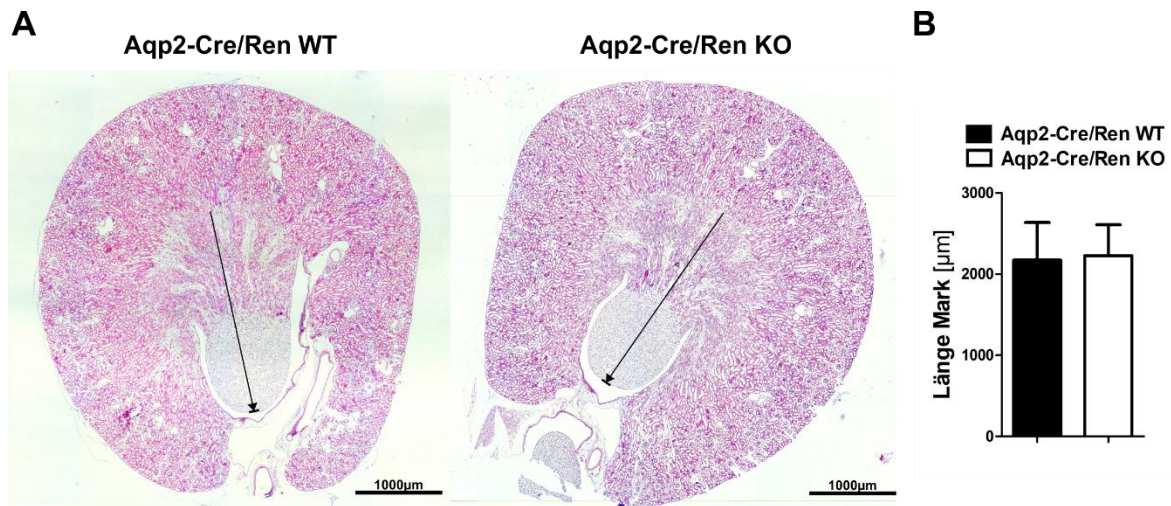
Mäuse mit genereller Deletion einzelner Komponenten des RAS (Angiotensinogen, Renin, AT1 Rezeptor) haben bei Geburt morphologisch unauffällige Nieren. Im Verlauf der ersten Lebenswochen entwickeln sich jedoch bei allen Linien renale Veränderungen: Hydronephrose, Papillenatrophie, Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose, Verdickung der Gefäßwand von Arterien und Arteriolen [154-158]. Zur Überprüfung, ob diese Veränderungen auf den Verlust des Renins im Sammelrohr zurückzuführen sind, wurde die Nierenmorphologie von Aqp2-Cre/Ren KO Mäusen mit ihren Wildtypgeschwistern (im Folgenden Aqp2-Cre/Ren WT) verglichen. Die homozygoten Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren bis zur Organentnahme im Alter von 10-12 Wochen keine erhöhte Mortalität, das Körpergewicht war nicht unterschiedlich und auch die Nieren zeigten keine makroskopischen Auffälligkeiten (Harnstau, erweitertes Nierenbecken, Relation Kortex/Mark). Das Nierengewicht der homozygoten sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Mäuse (Männchen:  $332,33 \pm 25,98$  mg; Weibchen:  $283,75 \pm 22,93$  mg, jeweils linke + rechte Niere) wies keinen Unterschied zu dem der Wildtypgeschwister auf (Männchen:  $336,22 \pm 20,3$  mg; Weibchen:  $283,75 \pm 22,98$  mg) (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Gesamt nierengewicht** von Aqp2-Cre/Ren WT (Männchen: n=10; Weibchen n=4) und Aqp2-Cre/Ren KO (Männchen: n=10; Weibchen n=4). Jeweils linke und rechte Niere.

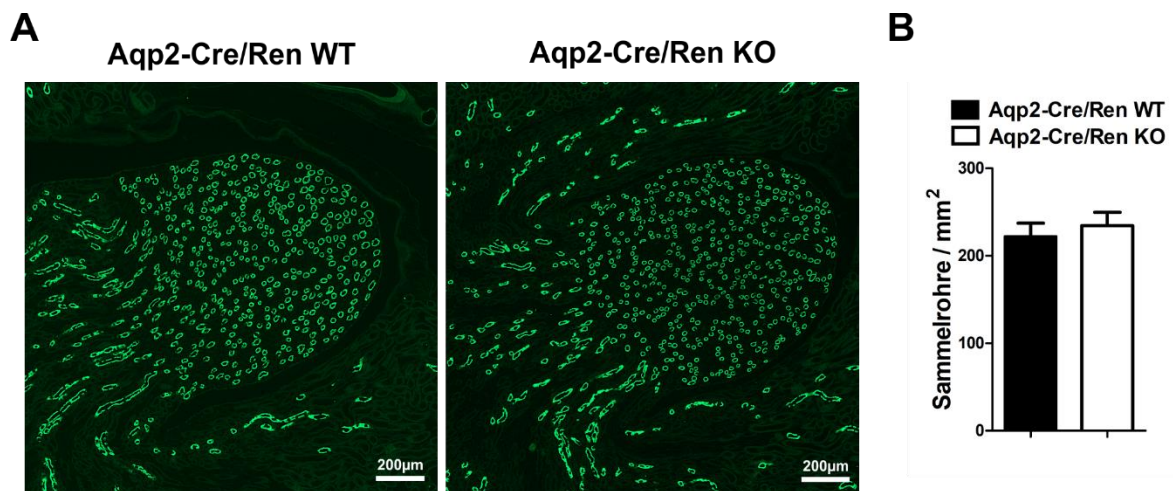
Für die histologische Untersuchung wurden die Nieren mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung perfusionsfixiert. In den mit Hämatoxylin / Eosin-Lösung gefärbten Nierenquerschnitten der sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Mäuse waren keine morphologischen Veränderungen der Niere zu erkennen (Abb. 4.2 A). Insbesondere fanden sich keine Hinweise auf eine Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose oder eine Verdickung der Gefäßwand von Arterien und Arteriolen, die bei konventionellen Knockoutmäusen mit genereller Deletion der Komponenten des RAS vorbeschrieben wurden. Die Abmessung des Nierenmarks (Messbereich mit Pfeil angedeutet in Abb. 4.2 A) ergab keinen Größenunterschied zwischen den sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Mäusen ( $2171,8$

$\pm 546,21 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistern ( $2228,15 \pm 267,12 \mu\text{m}$ ) (Abb. 4.2 B). Eine möglicherweise vorliegende Papillenatrophie konnte somit in den untersuchten Tieren ausgeschlossen werden.



**Abb. 4.2: Hämatoxylin & Eosin gefärbte Nierenschnitte.** A. Aqp2-Cre/Ren WT (n=3) und Aqp2-Cre/Ren KO (n=3). Die Nieren der Aqp2-Cre/Ren KO Tiere wiesen keinerlei morphologische Auffälligkeiten im Vergleich zu den sammelrohrspezifischen Renin Wildtypen auf. B. Die Abmessung des Marks zeigte keine Unterschiede zwischen Aqp2-Cre/Ren KO und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Die eingezeichneten Pfeile zeigen beispielhaft den Abmessungsbereich. 50-fache Vergrößerung (Kachelaufnahme).

Des Weiteren wurde die Anzahl der Sammelrohre in den Nieren der sammelrohrspezifischen Renin Knockout und Wildtyp-Mäuse verglichen. Dafür wurden Paraffinschnitte der Nieren beider Genotypen mit einem Antikörper gegen Aquaporin2 angefärbt, der durch den fluoreszierenden sekundären Cy2-Antikörper sichtbar gemacht wurde. Abb. 4.3 A zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der anti-Aqp2 gefärbten Nierenschnitte von Aqp2-Cre/Ren KO und WT Mäusen. Die Auszählung der Aquaporin2-positiven Sammelrohre in der Nierenpapille erfolgte innerhalb eines Quadratmillimeters. Die Auswertung der ausgezählten Sammelrohre ergab keinen Unterschied zwischen den homozygoten sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Mäusen ( $234,6 \pm 15,0$  Sammelrohre /  $\text{mm}^2$ ) und dessen Wildtyp-Geschwistertieren ( $221,9 \pm 15,3$  Sammelrohre /  $\text{mm}^2$ ) (Abb. 4.3).

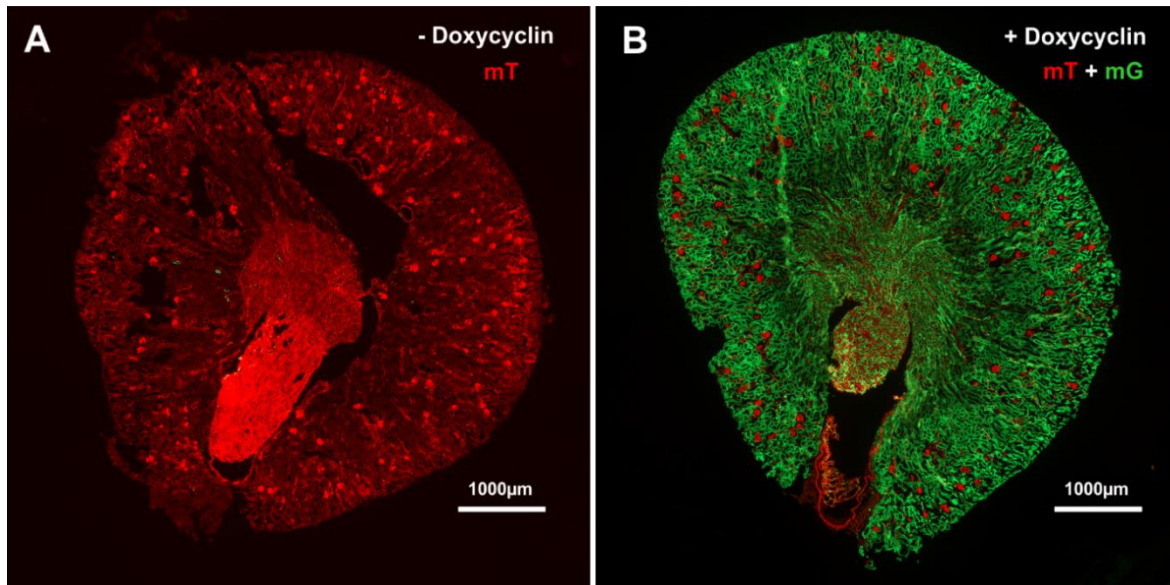


**Abb. 4.3: Analyse der Aquaporin2-Immunfluoreszenzfärbung** von **A.** Aqp2-Cre/Ren WT (n=6) und KO Mäusen (n=6). **B.** Die statistische Auswertung der Anzahl der Sammelrohre pro mm<sup>2</sup> Papille ergab keinen Unterschied zwischen den sammelrohrspezifischen Renin KO und WT Mäusen.

#### 4.1.1.2 Histologische Charakterisierung der Aquaporin2-Cre Mauslinie

Für eine sinnvolle Bearbeitung des Projektes ist eine ausreichende Deletion des Reningens im Sammelrohr essentiell. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass die Cre-Rekombinase eine ausreichende Aktivität in den Renin-exprimierenden Abschnitten des Sammelrohrs hat. Um dies abschätzen zu können, wurden Aqp2-Cre Mäuse mit doppelt fluoreszierenden mTmG-Cre-Reporter Mäusen [255] gekreuzt. Abb. 4.4 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Nierenquerschnitten, die auf diesem Weg generierten Aqp2-Cre/mTmG Mäuse. In diesen fluoreszieren alle Zellen, in denen keine Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden hat, rot (mT). In den Hauptzellen der Sammelrohre wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Aqp2-Promotors exprimiert und somit findet hier eine Exzision des geflochtenen Tomato-Gens statt und das grün fluoreszierende mG-Protein kann gebildet werden (Abb. 4.4 A). Auffällig war das deutlich sichtbare, medullär-kortikale Gefälle der Rekombinationsaktivität. Während in Richtung Papille alle Sammelrohre die grüne mG-Proteinexpression, also eine ausreichende Cre-Aktivität, aufwiesen, war dies nur bei wenigen Sammelrohren im Kortex der Fall. Die Mehrheit der kortikalen Sammelrohre wies das rot fluoreszierende Proteinsignal mT auf, es hatte hier also keine Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden. Dies wurde durch eine Gegenfärbung mit einem Aqp2-Antikörper noch deutlicher (Abb. 4.4 B). Die grüne mG-Fluoreszenz und die Aqp2-Immunfluoreszenzfärbung (blau) deckten sich in einigen Bereichen, jedoch waren viele Sammelrohre, vor allem im kortikalen Teil der Nieren nur Aqp2-positiv, sie wiesen also keine Bildung des grün fluoreszierenden mG Farbstoffproteins auf. Dies bestätigte die unvollständige Cre-Rekombinaseaktivität in einer Vielzahl der Sammelrohrhauptzellen. Versuche, die Aqp2-Cre Aktivität durch Dursten zu erhöhen, waren erfolglos. Da aus den Untersuchungen anderer

Gruppen damit zu rechnen war, dass gerade auch die Sammelrohrhauptzellen im Kortex Renin exprimieren können, schien dieses Aqp2-Cre Modell nicht dazu geeignet um weitere Analysen zur Charakterisierung des Sammelrohr-Renins durchzuführen.



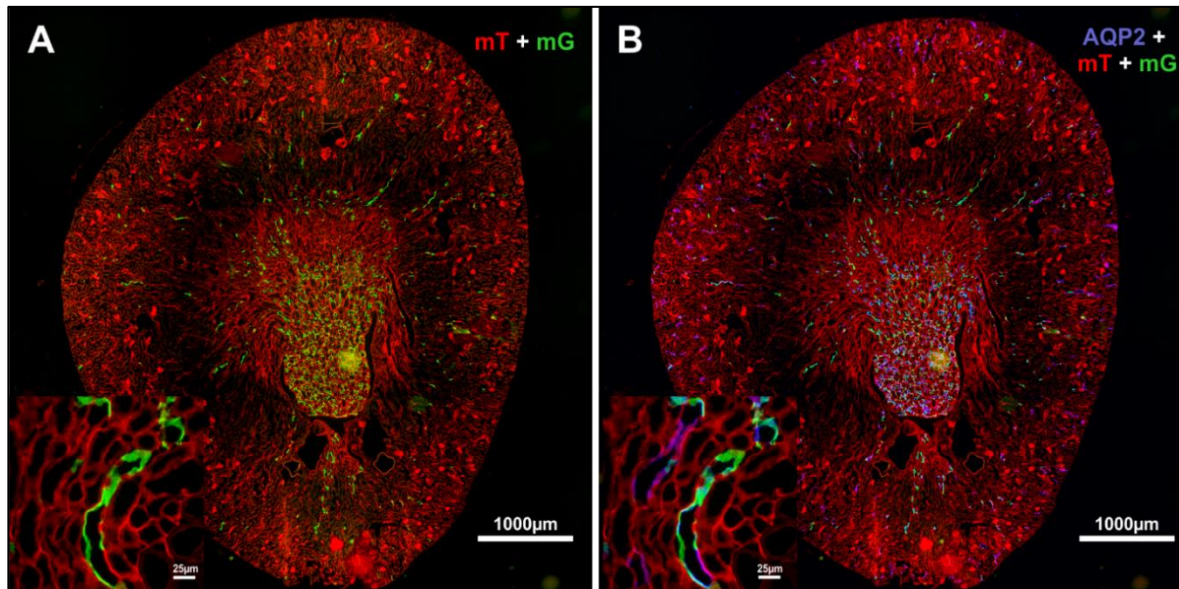
**Abb. 4.4: Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines Nierengefrierschnitts einer Aqp2-Cre/mTmG Maus. A.** Der Nierenquerschnitt zeigt die „tomato“-Fluoreszenz einer Aqp2-Cre-positiven Maus. In den Hauptzellen der Sammelrohre wurde im Gegensatz zu allen anderen Zellen, das grün fluoreszierende Protein mG exprimiert. Alle anderen Zellen exprimierten das ubiquitär vorkommenden rot fluoreszierenden Protein mT. Der Ausschnitt links unten zeigt Sammelrohre in 400-facher Vergrößerung. **B.** Immunfluoreszenzfärbung des Markerproteins der Hauptzellen Aqp2 (blau) und Expression der mTmG-Proteine. Die Türkisfärbung zeigt die überlappenden Stellen der grünen und blauen Fluoreszenz an (kleines Bild links unten, 400-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken 25 µm). Etliche Hauptzellen der Sammelrohre wiesen lediglich die blaue Aqp2-positive Färbung auf, was wiederum die unzureichende Rekombination in diesen Zellen verdeutlicht.

#### 4.1.2 Charakterisierung der tubulusspezifischen Renin Knockout-Maus

Um eine vollständige Ausschaltung des Reningens im Sammelrohr und im gesamten Tubulus zu erzielen, wurde eine weitere Mauslinie etabliert, bei der eine induzierbare Pax8/TetO-Cre-Maus mit der geflochten Renin-Maus gekreuzt wurde. Die resultierenden Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>-Mäuse (im Folgenden auch Tubulus-Renin KO Maus genannt) sollten eine Ausschaltung des Renins in allen Tubuluszellen der Niere zeigen [263]. Bei den Versuchstieren wurde die Cre-Rekombinase erst im Erwachsenenalter von 8-10 Wochen, durch die Verabreichung von Doxycyclin aktiviert, wodurch mögliche Auswirkungen des fehlenden Tubulus-Renins auf die Nierenentwicklung ausgeschlossen werden konnten. Für die histologische Untersuchung der Nieren wurden die Tubulus-Renin KO Mäuse, mit den Cre-Reporter Mäusen „mTmG“ verpaart (Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>mTmG). Die Übersichtsaufnahmen in Abb. 4.5 A zeigen einen Nierenquerschnitt vor der Induktion mit Doxycyclin und lassen erkennen, dass dieses Cre/LoxP-System sehr präzise und effektiv funktionierte. In der nicht-induzierten Maus wurde einzig das ubiquitär vorkommende rot

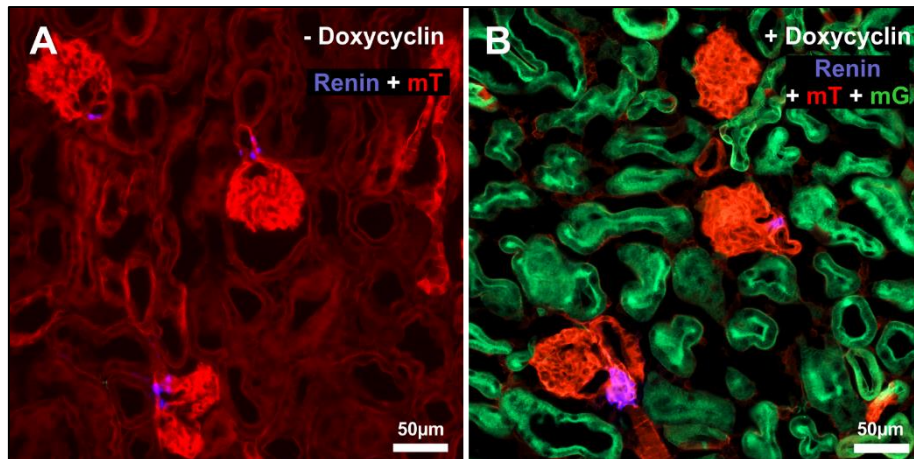


fluoreszierende Protein mT exprimiert. Nach der Gabe von Doxycyclin (Abb. 4.5 B), wurde in allen Tubuli, die die Cre-Rekombinase exprimierten, eine starke mG-Expression (grün) sichtbar. Die Teile der Niere, die den Pax8-Promotor nicht aufweisen, in denen es somit zu keiner Rekombination kam, verblieben rot (Glomeruli, JG-Zellen, Blutgefäße und interstitielle Zellen).



**Abb. 4.5: Übersichtsaufnahmen der Niere einer Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>mTmG Maus.** **A.** Der Nierenquerschnitt vor der Gabe von Doxycyclin zeigte eine ubiquitäre Expression des rot fluoreszierenden Proteins mT **B.** In der Kachelaufnahme einer Niere nach der Induktion der Cre-Rekombinase via Doxycyclin wird deutlich, dass in allen Pax8-positiven Tubulusabschnitten der grün fluoreszierende Farbstoff mG gebildet wurde. Glomeruli, JG-Zellen, Blutgefäße und interstitielle Zellen verblieben rot.

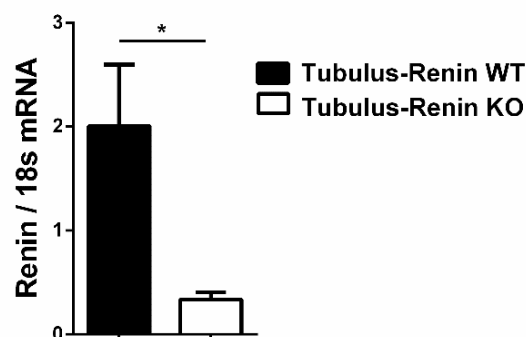
Um auszuschließen, dass bei diesen Mäusen eine Cre-Aktivität auch in juxtaglomerulären Zellen vorliegt, was zu einer Deletion des Renins auch in diesen Zellen führen würde, wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Renin-Antikörper durchgeführt. (Abb. 4.6). Deutlich erkennbar ist hier, dass in den JG-Zellen, die durch die Renin-Färbung identifiziert werden konnten (blau in Abb. 4.6), keine Rekombination stattgefunden hatte. Vor, als auch nach der Induktion mit Doxycyclin, konnte die Renin-Färbung im Bereich der juxtaglomerulären Zellen detektiert werden. Diese deckte sich zudem in keinem der Tiere mit der grünen mG-Proteinexpression. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der Hauptbildungsort des Renins in der Niere, die JG-Zellen, nicht von der Deletion betroffen waren (Abb. 4.6 B). Auch in den Glomeruli, den Blutgefäßen, sowie in den interstitiellen Zellen hatte keine Rekombination stattgefunden, dort wurde auch weiterhin das rot fluoreszierende mT-Protein exprimiert. Nur vereinzelt waren Zellen des Tubulussystems sichtbar, bei denen es zu keiner Rekombination kam.



**Abb. 4.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>mTmG-Mausnieren mit Co-Färbung von Renin.** **A.** Die nicht-induzierte Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>mTmG Mausnieren wies keinerlei mG-Fluoreszenz (grün) auf. Die Renin-Färbung (blau) an den JG-Zellen war deutlich zu erkennen. **B.** Nach der Gabe von Doxycyclin war in fast allen Tubuluszellen der Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>mTmG-Maus ein Fluoreszenzsignal des endogenen, membrangebundenen mG Proteins (grün) zu erkennen. Das rote mT-Signal, als Hinweis auf fehlende Cre-Aktivität, beschränkte sich auf die Glomeruli, JG-Zellen und Blutgefäße, sowie auf die interstitiellen Zellen. Die Renin-positiv gefärbten Bereiche wurden nicht rekombiniert. Es war kein überlappendes Signal von Renin und mG zu erkennen.

#### 4.1.2.1 Untersuchung der renalen Renin mRNA Expression der Tubulus-Renin WT und KO Mäuse

Zur direkten Untersuchung der Deletionseffizienz der Cre-Rekombinase wurde die Renin mRNA Abundanz in mikro-dissezierten Sammelrohren von homozygoten Tubulus-Renin Knockout-Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistern mittels semiquantitativer Realtime-PCR bestimmt. Wie in Abb. 4.7 gezeigt, war die Reninexpression in Sammelrohren von Knockout-Mäusen auf ca. 15% der Wildtypen (im Folgenden auch Tubulus-Renin WT genannt) reduziert, was eine gute Deletionseffizienz des Reningens im Sammelrohr belegt.



**Abb. 4.7: Die Analyse der Renin mRNA Expression bestätigte die Deletion in den Sammelrohren der Tubulus-Renin KO Mäuse.** Hier war die Reninexpression in den isolierten Sammelrohren auf etwa 15% der Wildtypen vermindert. Die Expression wurde auf das Housekeeper-Gen 18s normalisiert. \* p<0,05 vs. Tubulus-Renin WT.

#### 4.1.2.2 Physiologische Parameter der Tubulus-Renin KO und WT Mäuse

Die tubulusspezifischen Renin Knockout-Mäuse wurden hinsichtlich ihres Körpergewichts, der Natrium- und Kalium-Ausscheidung, Urinvolumen und Urin pH-Wert, sowie ihres Hämatokrits charakterisiert und mit den Wildtyp-Wurfgeschwistern verglichen (Tabelle 4.1). Unter Kontrollbedingungen zeigten die Tubulus-Renin KO Mäuse keine Unterschiede zu den Wildtypen (Tubulus-Renin WT).

**Tabelle 4.1: Physiologische Parameter** von unbehandelten Tubulus-Renin WT und KO Mäusen. Das Urinvolumen wurde mit Hilfe von Stoffwechsellkäfigen bestimmt. Die Elektrolytausscheidung im Spontanurin wurde auf die Osmolarität der Urinprobe bezogen. Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM.

Physiologische Parameter	Geschlecht	Tubulus-Renin WT	Tubulus-Renin KO
Körpergewicht [g]	W	24,9 $\pm$ 0,1 (n=14)	25,5 $\pm$ 0,7 (n=14)
	M	33,6 $\pm$ 0,5 (n=40)	32,8 $\pm$ 0,4 (n=40)
Beide Nieren [mg]	W	310,5 $\pm$ 12,5 (n=6)	306,0 $\pm$ 7,8 (n=6)
	M	407,4 $\pm$ 18,6 (n=12)	407,0 $\pm$ 18,2 (n=8)
Urinvolumen [ml / Tag]	W	1,46 $\pm$ 0,13 (n=4)	1,74 $\pm$ 0,24 (n=4)
	M	1,58 $\pm$ 0,12 (n=9)	1,68 $\pm$ 0,20 (n=8)
Na <sup>+</sup> -Ausscheidung [mol/osmol]	W	0,059 $\pm$ 0,009 (n=8)	0,073 $\pm$ 0,009 (n=8)
	M	0,073 $\pm$ 0,009 (n=24)	0,055 $\pm$ 0,005 (n=25)
K <sup>+</sup> -Ausscheidung [mol/osmol]	W	0,107 $\pm$ 0,001 (n=8)	0,130 $\pm$ 0,018 (n=8)
	M	0,123 $\pm$ 0,007 (n=24)	0,123 $\pm$ 0,025 (n=25)
Urin-pH-Wert	W	6,11 $\pm$ 0,13 (n=4)	5,99 $\pm$ 0,13 (n=4)
	M	6,43 $\pm$ 0,23 (n=8)	6,17 $\pm$ 0,27 (n=8)
Hämatokrit [%]	M	49,4 $\pm$ 0,5 (n=14)	49,1 $\pm$ 0,4 (n=14)
	W	49,2 $\pm$ 0,3 (n=40)	49,1 $\pm$ 0,3 (n=40)

#### 4.1.3 Schlussfolgerung zu den Mausmodellen

Aus den Ergebnissen der Charakterisierung der beiden Renin Knockout-Mausmodelle ließ sich schließen, dass für die weiteren Untersuchungen im Hinblick auf den Einfluss des Diabetes Mellitus auf das tubuläre RAS die tubulusspezifische Renin Knockout-Maus (Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>) besser geeignet war. Hier konnte eine ausreichende Deletion des Reningens im Tubulussystem der Niere nachgewiesen werden. Bei der sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Maus (Aqp2-Cre/Ren1<sup>flox/flox</sup>) war dies nicht der Fall, hier schien die Expression und Aktivität der Cre-Rekombinase im Sammelrohr nicht ausreichend vorhanden zu sein.

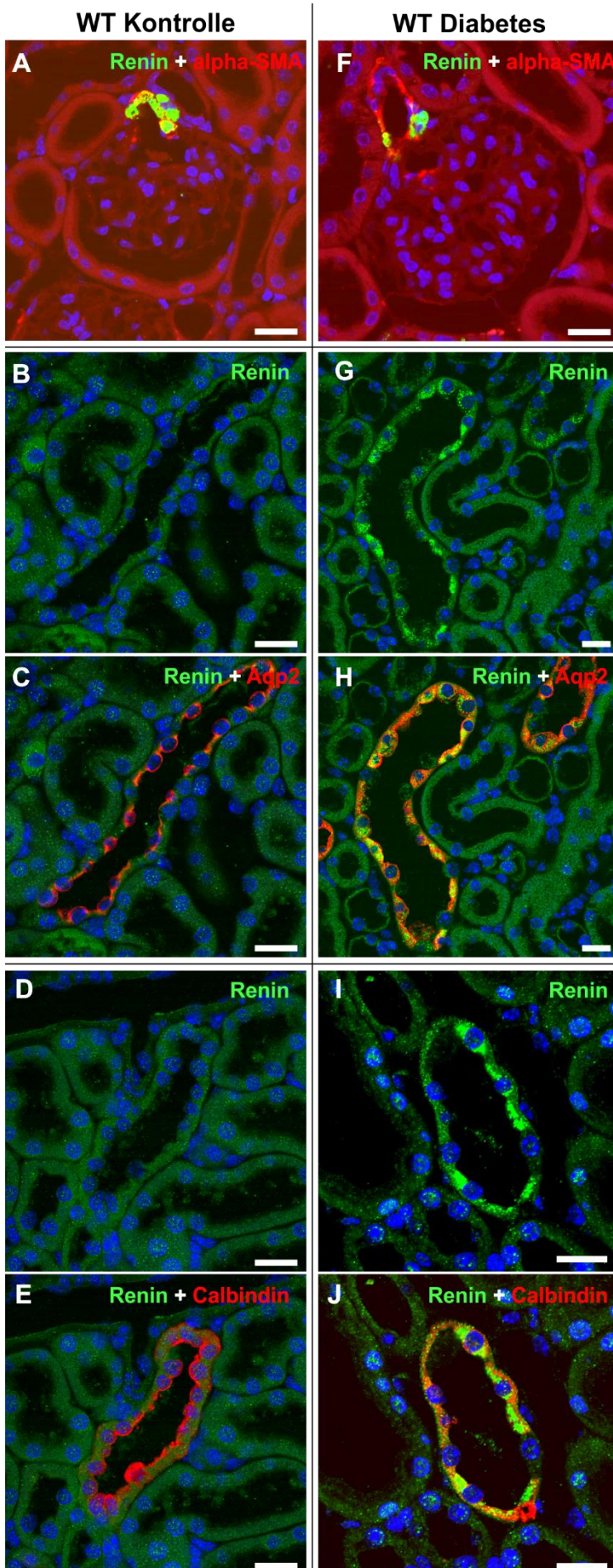
## 4.2 Rolle des tubulären Renin-Angiotensin-Systems beim Diabetes mellitus

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle des tubulären RAS, speziell des Prorenins und Renins beim Diabetes Mellitus und deren Relevanz bei der Entwicklung und Progression der diabetischen Nephropathie genauer untersucht werden.

Um aufzuklären, ob es lokal in der Niere beim Diabetes zu einer vermehrten Produktion von Renin bzw. dessen inaktiven Vorläufer Prorenin kommt, wurden immunhistochemische Untersuchungen an verschiedenen diabetischen Mausmodellen durchgeführt, sowie Biopsien von diabetischen Patienten auf ihre Reninexpression untersucht. Da diese Experimente deutliche Hinweise auf eine lokale Bildung von Renin im distalen Nephron lieferten, wurden im Anschluss weiterführende Analysen mit einem tubulusspezifischen Renin Knockout-Mausmodell (*Pax8/TetO-Cre/Ren<sup>flox/flox</sup>*) durchgeführt um die Auswirkung der zellspezifischen Deletion des Reningens weiter aufklären zu können. Zusätzlich wurden mögliche regulatorische Mechanismen der pathologischen Sammelrohr-Reninproduktion untersucht.

### 4.2.1 Tubuläre Reninexpression bei Diabetes mellitus: Proteinexpression

Zur Induktion eines Diabetes mellitus Typ 1 wurde Wildtyp-Mäusen STZ verabreicht. Acht Wochen nach der ersten STZ-Injektion wurde der Versuch beendet und die Nieren perfusionsfixiert. In den Nierenschnitten der unbehandelten Mäuse war eine deutliche Reninfärbung der JG-Zellen zu erkennen (Abb. 4.8 A). Die Co-Färbung mit alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA), einem Marker für glatte Gefäßmuskelzellen, verdeutlichte die Lokalisation der Renin-bildenden Zellen in den Gefäßen. In den Tubuli der unbehandelten Wildtypen fand sich, trotz der Verwendung mehrerer verschiedener Renin-Antikörper (siehe Anhang), keine Reninfärbung (Abb. 4.8 B-E). Im Gegensatz zu unbehandelten Mäusen fand sich bei diabetischen Mäusen eine deutliche Renin-Färbung in den Tubuli (Abb. 4.8 G-J). Co-Färbungen mit diversen Markern der einzelnen Nephronabschnitte zeigten, dass Renin im Diabetes hauptsächlich in den Sammelrohren und in den distalen Tubuli exprimiert wurde (Abb. 4.8 G-J). Im proximalen Tubulus konnte hingegen kein Renin nachgewiesen werden (Bilder nicht gezeigt). Im Gegensatz zum Tubulus, zeigten die juxtaglomerulären Zellen diabetischer Mäuse keine veränderte Reninexpression (Abb. 4.8 F).

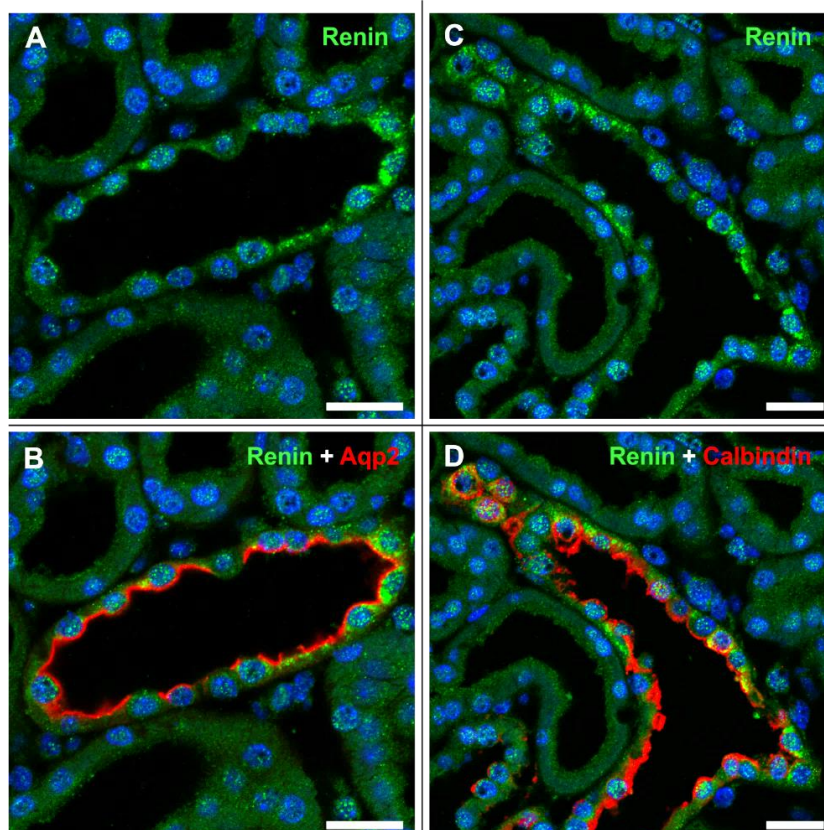


**Abb. 4.8: Immunfluoreszenzfärbung von unbehandelten, und STZ-induzierten Wildtyp-Mäusen (Dauer des STZ-Diabetes: 8 Wo.).**

Reninfärbung in grün; alpha-SMA, Aquaporin2 und Calbindin in rot. **A.:** In den WT-Kontrollen war eine deutliche Reninfärbung in den JG-Zellen zu erkennen. Die Co-Färbung mit alpha-SMA bestätigte die Lage der Reninbildenden Zellen in der Gefäßwand der afferenten Arteriole. **B. & C.:** Unter Kontrollbedingungen war keine Renin-Expression in den Sammelrohren (Aqp2 als Hauptzellmarker) zu erkennen. **D. & E.:** Auch der distale Tubulus (Calbindin als Marker) wies basal keine Reninfärbung auf. **F.:** 8 Wochen nach der Induktion des Diabetes zeigte sich in den Wildtypen keine signifikante Veränderung der Reninexpression in den JG-Zellen im Vergleich zu den WT Kontrollen. **G. & H.:** In den Sammelrohren der diabetischen WT-Tiere war eine deutliche Reninfärbung zu erkennen. Co-gefärbt wurde mit dem Hauptzellmarker Aqp2. Die gelbe Färbung signalisierte die überlappende Expression von Renin und Aqp2. **I. & J.:** Auch in den distalen Tubulusabschnitten war ein eindeutiges Reninsignal nach Induktion des STZ-Diabetes zu erkennen. Der distale Tubulus wurde mit Calbindin co-gefärbt. Gelb erschienen die sich überlagernden Signale von Renin und Calbindin. Maßstabsbalken: 20 µm.

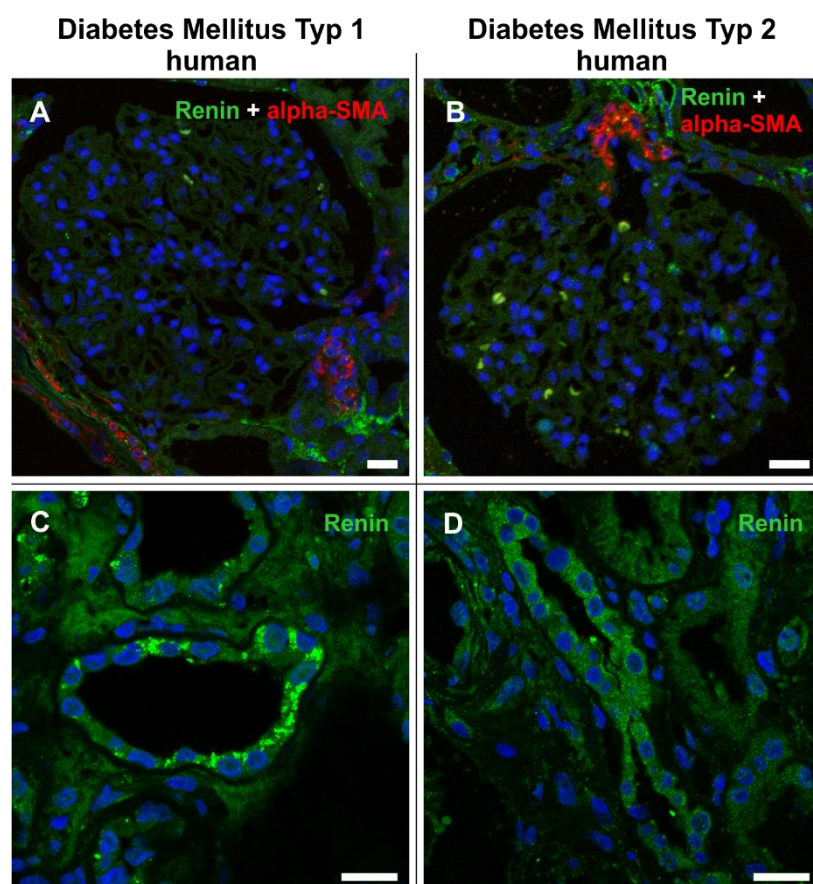
Die tubuläre Reninexpression beschränkte sich nicht nur auf Mäuse mit einem Typ 1 Diabetes. Auch in einem Typ 2 Diabetes Mausmodell (BTBR ob/ob; die Mäuse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Miriam Banas, Universitätsklinikum Regensburg) konnte eine Reninexpression mittels Immunfluoreszenzfärbung in Sammelrohren und im distalen Tubulus nachgewiesen werden (Abb. 4.9 A-D). Die kürzlich generierte Mauslinie BTBR mit einer Mutation im Leptin-Gen (ob/ob) entwickelt im Alter von ca. sechs Wochen einen stark ausgeprägten Typ 2 Diabetes mit erhöhten Blutglukosespiegeln [258, 268, 269], die vergleichbar sind mit denen der Typ 1 STZ-diabetischen Versuchstiere. Die deutliche Reninfärbung in diesem Typ 2-diabetischen Mausmodell lässt darauf schließen, dass die tubuläre Reninexpression unabhängig von der Ursache der Hyperglykämie ist.

#### Diabetes Mellitus Typ 2 Mausmodell



**Abb. 4.9: Immunfluoreszenzfärbung von BTBR ob/ob Mäusen** mit Renin (grün A. & C.), co-gefärbt mit Aquaporin2 (rot B.) und Calbindin (rot D.). Die Aufnahmen zeigten eine deutliche Reninexpression in den Sammelrohren und distalen Tubuli der Typ 2 diabetischen Versuchstieren. Die gelbe Färbung zeigt eine überlappende Expression von Renin und Aqp2 bzw. Calbindin (B. bzw. D.). Maßstabsbalken: 20 µm.

Zusätzlich wurde die Reninexpression in menschlichen Nierenschnitten untersucht. Diese stammten aus Biopsien von Typ 1 und Typ 2 Diabetikern und von Kontrollschnitten aus Tumorbiopsien (das Gewebe wurde freundlicherweise von PD Dr. Christoph Daniel und Prof. Dr. Kerstin Amann, Universitätsklinikum Erlangen zur Verfügung gestellt). Wie bei Mäusen konnte auch in menschlichen Nieren von Nicht-Diabetikern keine Reninfärbung in den Tubuli nachgewiesen werden (Bilder nicht gezeigt). Bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern zeigte sich jedoch eine deutliche Reninexpression im Tubulussystem (Abb. 4.10 C & D). Die Reninexpression in den juxtaglomerulären Zellen der Glomeruli, zusammen mit einer alpha-SMA-Färbung (Abb. 4.10 A & B), verdeutlichten die Spezifität des verwendeten Renin-Antikörpers.

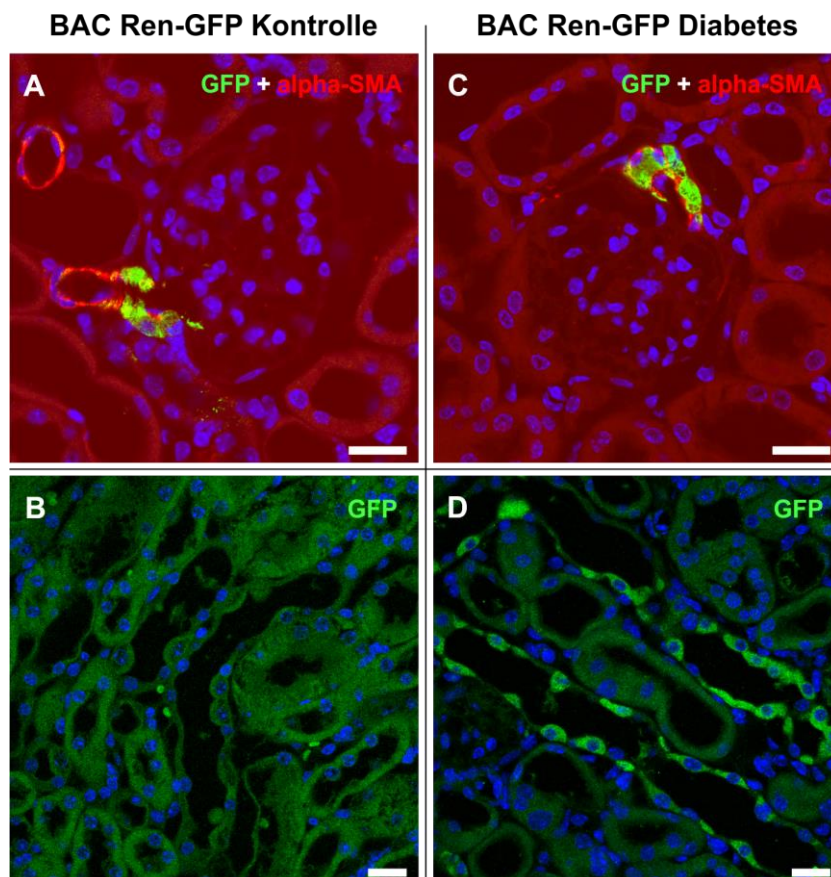


**Abb. 4.10: Immunfluoreszenzfärbung in humanen Diabetikernieren** mit einem Renin-Antikörper (grün), co-gefärbt mit einem Marker für die glatten Gefäßmuskelzellen (alpha-SMA, rot). **A. & B.:** In den oberen beiden Aufnahmen wurde das JG-Zell-Renin in den diabetischen Nierenschnitten zusammen mit alpha-SMA angefärbt. Das positive juxtaglomeruläre Reninsignal zeigte die Spezifität des verwendeten Renin-Antikörpers. **C. & D.:** Auch im Tubulussystem von Typ 1 und Typ 2 Diabetikern konnte eine deutliche Reninexpression nachgewiesen werden. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m

## 4.2.2 Tubuläre Reninexpression bei Diabetes mellitus: mRNA Expression

### 4.2.2.1 BAC Ren-GFP Mausmodell

Die bisher mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen detektierte Renin-Proteinexpression könnte zum einen das Resultat einer lokalen Produktion sein, oder aber auf einer Aufnahme von Renin aus der tubulären Flüssigkeit oder dem Interstitium beruhen. Um diese Möglichkeiten unterscheiden zu können wurde zunächst ein transgenes BAC Ren-GFP Mausmodell verwendet [257], welches die Identifizierung von Zellen, in denen der Renin-Promotor aktiv ist, per Fluoreszenzsignal möglich machte. Die GFP-Expression dieser Mäuse wird von der regulatorischen Region des Reningens kontrolliert und eine positive GFP-Färbung zeigt die Aktivierung des Renin-Promotors an. Bei den transgenen Mäusen wurde per STZ-Injektionen ein Typ 1 Diabetes induziert. Nicht behandelte BAC Ren-GFP Mäuse zeigten keine Expression von GFP im Tubulussystem (Abb. 4.11 B). In den diabetischen Tieren hingegen war eine ausgeprägte GFP-Färbung in den Tubuli zu erkennen (Abb. 4.11 D). Im Gegensatz zum tubulären System, wiesen die JG-Zellen der STZ-Mäuse keine Veränderung der GFP-Expression auf. Die Lokalisation der Renin-produzierenden Zellen wurde in den afferenten Arteriolen per Co-Färbung mit alpha-SMA bestätigt (Abb. 4.11 A & C).

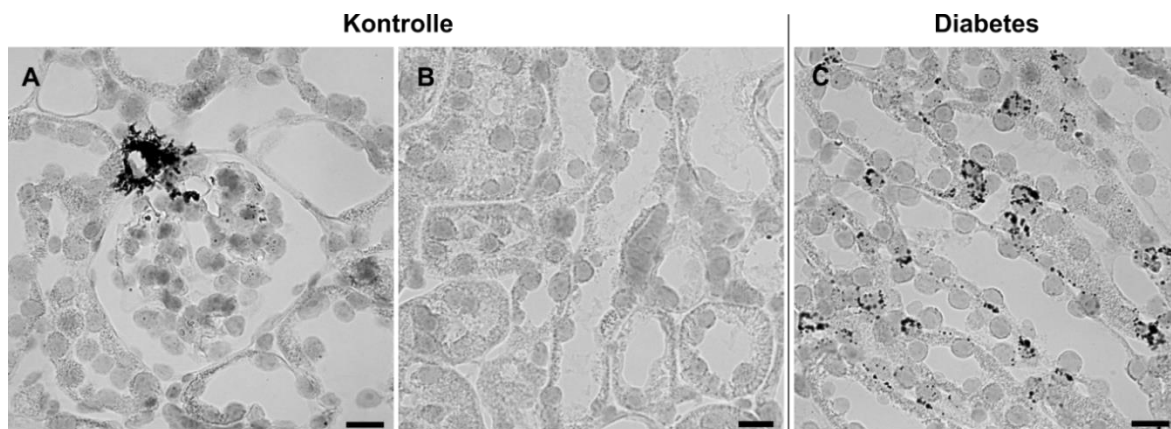




**Abb. 4.11: Immunfluoreszenzfärbung von transgenen BAC-Ren GFP Mäusen** mit einem GFP-Antikörper (grün), co-gefärbt mit einem Marker für die glatten Gefäßmuskelzellen (alpha-SMA, rot). **A. & C.** Dargestellt sind die Glomeruli von BAC Ren-GFP Kontrolltieren und STZ-behandelten BAC Ren-GFP Mäusen. Die JG-Zellen wiesen ein deutliches GFP-Signal (grün) in den JG-Zellen beider Tiere auf. Die Co-Färbung mit alpha-SMA (rot) spiegelte die Lokalisation der GFP-Färbung in den Gefäßen der afferenten Arteriole wider. **B.** In den Kontrolltieren konnte keine tubuläre GFP-Expression festgestellt werden. **D.** Diabetische Mäuse zeigten hingegen eine deutliche GFP-Expression in den Tubuli. Maßstabsbalken: 20 µm.

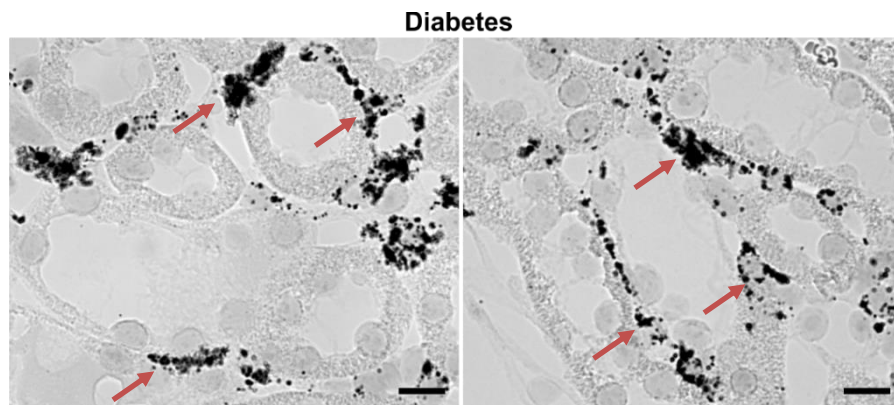
#### 4.2.2.2 RNAscope

Um direkt das Vorhandensein von Renin mRNA zu untersuchen, wurden Nierenschnitte von nicht diabetischen Wildtyp-Kontrollen und diabetischen Wildtyp-Mäusen mittels *in situ* Hybridisierungs-Technologie (RNAscope) analysiert. Bei dieser Methode kann die Ziel-RNA in einem Gewebe detektiert und somit einer bestimmten Zelle zugeordnet werden.



**Abb. 4.12: Nachweis von Renin mittels RNAscope Technologie.** **A.** JG-Zell-Renin in einer unbehandelten Wildtypmaus. **B.** In den Kontrolltieren konnte kein Renin in den Tubuli nachgewiesen werden. **C.** Acht Wochen nach Induktion des Diabetes war in den Tubuli der Wildtyp-Mäuse ein deutliches Renin mRNA-Signal zu sehen. Maßstabsbalken 20 µm.

Die Auswertung ergab eine deutliche Expression der Renin mRNA im Tubulussystem der diabetischen Mäuse (Abb. 4.12 C). Bei den nicht behandelten Kontrollen konnte kein Renin mRNA-Signal außerhalb der JG-Zellen detektiert werden (Abb. 4.12 A & B). Hingegen wurde bei diabetischen Mäusen, neben der tubulären Expression von Renin, auch im Interstitium ein starkes Renin mRNA-Signal beobachtet (Abb. 4.13, angezeigt durch die roten Pfeile). Dieser Befund könnte ein Hinweis darauf sein, dass nicht nur Zellen des Tubulus unter pathophysiologischen Bedingungen in der Lage sind Renin zu produzieren, sondern auch interstitielle Zellen, wie die Perizyten. Auf Proteinebene, mittels Immunfluoreszenzfärbung, konnte kein interstitielles Renin detektiert werden.

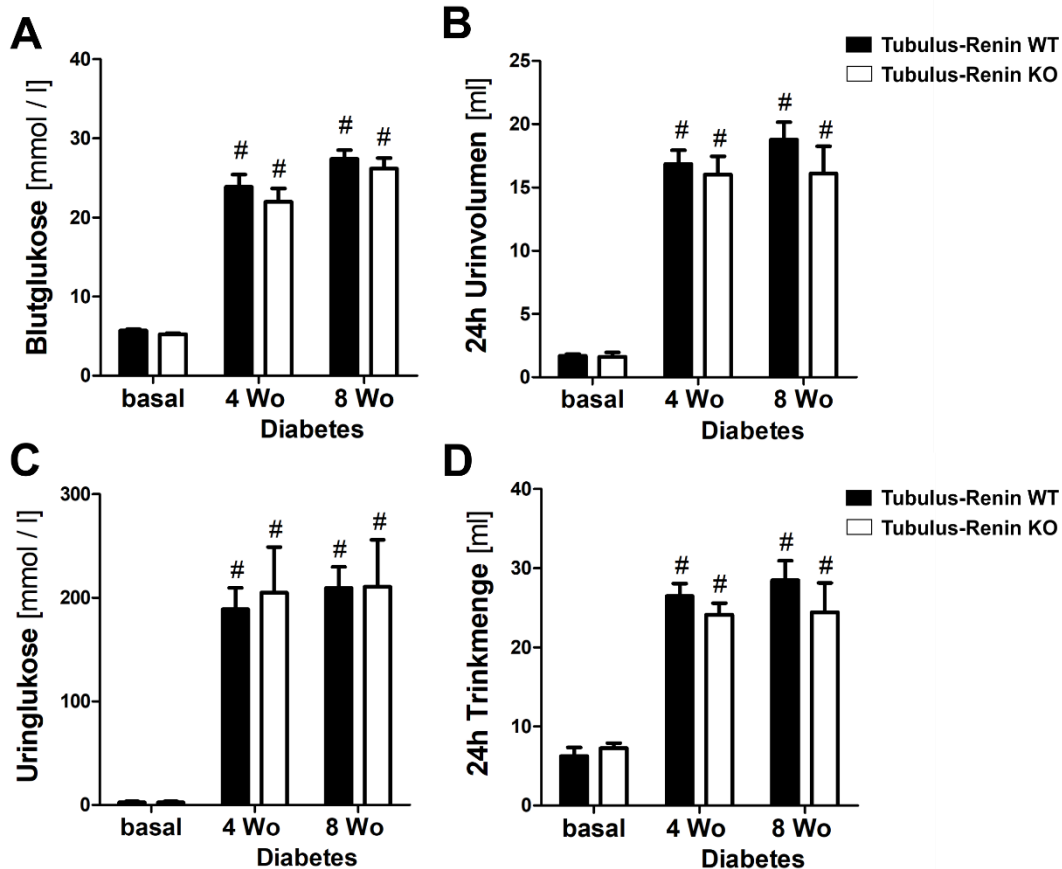


**Abb. 4.13: Nachweis von Renin mittels RNAscope Technologie im Interstitium.** Acht Wochen nach der Induktion des STZ-Diabetes war ein deutliches Renin-Signal (rote Pfeile) im Interstitium der Wildtypmäuse zu erkennen. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen eine deutliche Erhöhung der lokalen tubulären Reninsynthese im diabetischen Zustand. Die Stimulation der tubulären Reninsynthese scheint unabhängig von der Art der Diabeteserkrankung zu sein und ist auch im Menschen vorhanden. Um die funktionellen Konsequenzen der tubulären Reninbildung aufzuklären, wurden weiterführende Untersuchungen an einem tubulusspezifischen Renin Knockout-Mausmodell (Pax8/TetO-Cre/Renin<sup>flox/flox</sup>) durchgeführt.

#### 4.2.3 Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung des tubulären Renins beim Diabetes mellitus

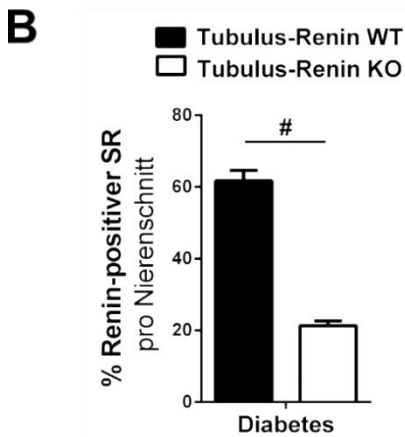
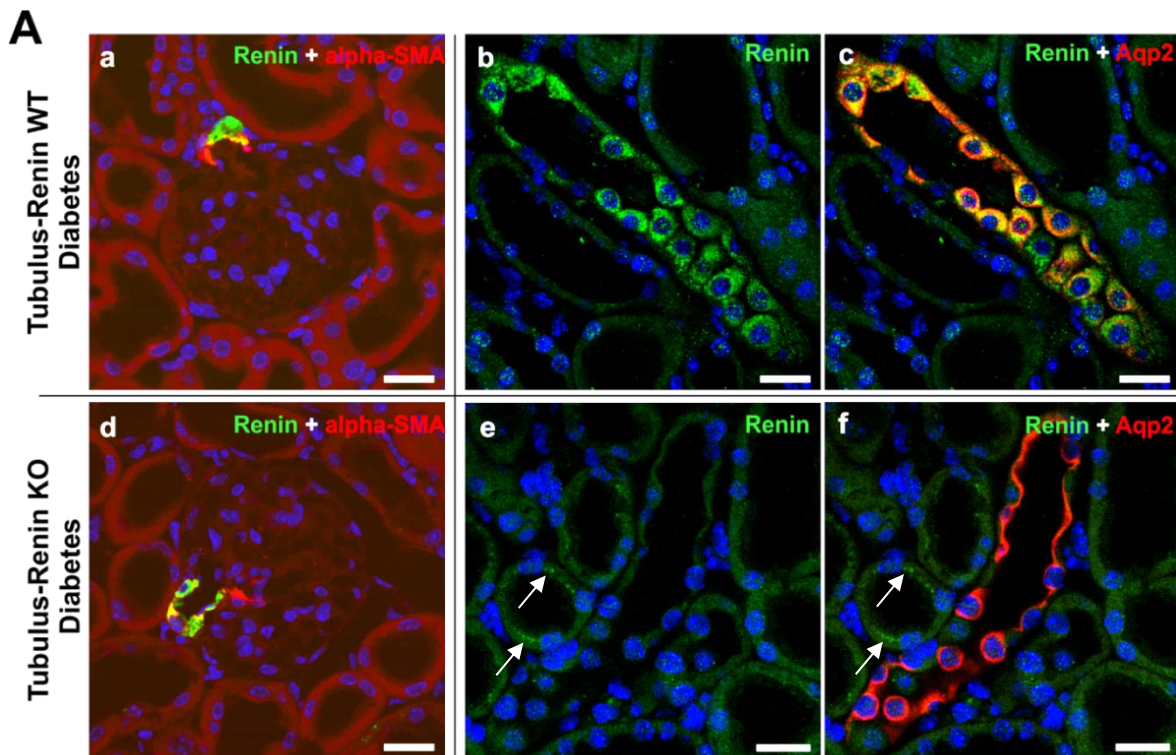
Zur Induktion einer Hyperglykämie wurde in den folgenden Versuchen das STZ Mausmodell verwendet. Wie Abb. 4.14 zeigt, resultierten die STZ Injektionen in einem vierfachen Anstieg des Nüchternblutzuckerwertes bei Tubulus-Renin WT ( $5,7 \pm 0,16 \text{ mmol / l}$  (basal) vs.  $27,4 \pm 1,1 \text{ mmol / l}$  (acht Wochen Diabetes);  $p < 0,001$ ) und Tubulus-Renin Knockout-Mäusen ( $5,2 \pm 0,14 \text{ mmol / l}$  (basal) vs.  $26,2 \pm 1,35 \text{ mmol / l}$  (acht Wochen Diabetes);  $p < 0,001$ ; Abb. 4.14 A). Begleitend trat bei beiden Genotypen eine zehnfache Erhöhung des 24-Stunden Urinvolumens (WT:  $1,7 \pm 0,1 \text{ ml}$  (basal) vs.  $18,8 \pm 1,4 \text{ ml}$  (Diabetes);  $p < 0,001$ ; KO:  $1,6 \pm 0,3 \text{ ml}$  (basal) vs.  $16,1 \pm 2,2 \text{ ml}$  (Diabetes);  $p < 0,001$ ; Abb. 4.14 B), eine ausgeprägte Glukosurie (WT: nicht detektierbar (basal) vs.  $209,6 \text{ mmol / l}$  (Diabetes); KO: nicht detektierbar (basal) vs.  $211,1 \pm 45 \text{ mmol / l}$  (Diabetes); Abb. 4.14 C) und ein Anstieg der Trinkmenge um das Vierfache (WT:  $6,2 \pm 1,1 \text{ ml}$  (basal) vs.  $28,4 \pm 2,8 \text{ ml}$  (Diabetes);  $p < 0,001$ ; KO:  $7,3 \pm 0,6 \text{ ml}$  (basal) vs.  $24,4 \pm 3,7 \text{ ml}$  (Diabetes);  $p < 0,001$ ; Abb. 4.14 D) auf.



**Abb. 4.14: Auswertung funktioneller Parameter der Tubulus-Renin KO und WT Mäuse, basal und nach Induktion des Diabetes.** **A.** Die Behandlung mit STZ führte zu einem 4-fachen Anstieg der Nüchtern-Blutglukosewerte in beide Genotypen, (für WT und KO n=21). **B.** Die STZ behandelten Mäuse beider Genotypen zeigten einen Anstieg des 24-Stunden Urinvolumens um das 10-Fache (WT: n=16; KO: n=19). **C.** Die STZ diabetischen Tubulus-Renin WT und KO Mäuse wiesen eine ausgeprägte Glukose-Exkretion im Urin auf (für WT und KO n=22). **D.** Die Trinkmenge der Tiere (gemessen im Stoffwechselkäfig) war in beiden Genotypen nach Induktion des Diabetes gleichermaßen erhöht (WT: n=17; KO: n=16). # p<0,001 vs. basal desselben Genotyps.

#### 4.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbungen von Tubulus-Renin KO und WT Mäusen

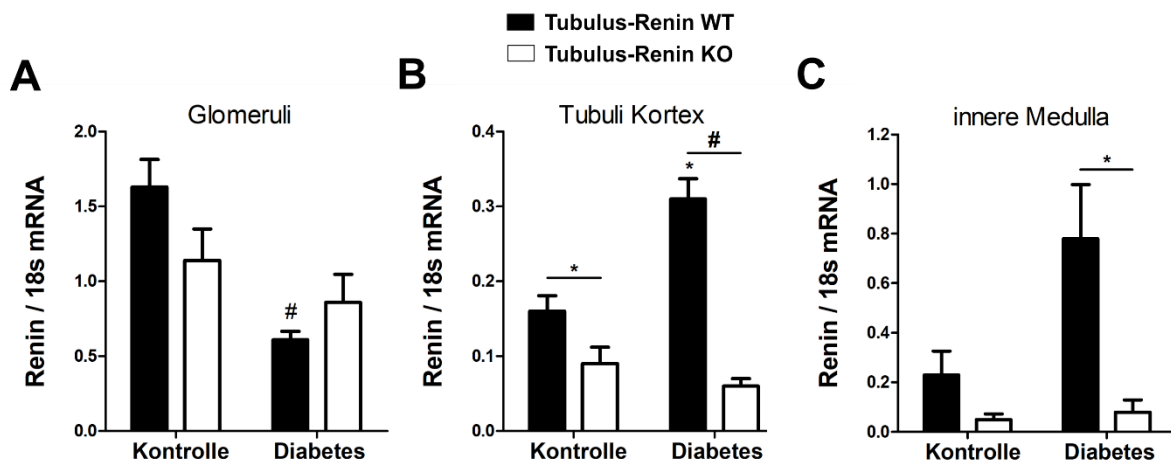
Die Immunfluoreszenzfärbung für Renin zeigte in den JG-Zellen der Wildtypen und Tubulus-Renin Knockout-Mäuse auch nach achtwöchiger Diabetesdauer keine merklichen Veränderungen (Abb. 4.15 A a & d). Bei den diabetischen Wildtypmäusen war hingegen eine ausgeprägte Reninexpression in den Verbindungstubuli und den Sammelrohren zu sehen (Abb. 4.15. A b & c) ( $62 \pm 2,9$  % aller ausgezählten Sammelrohre waren positiv für Renin gefärbt; (Abb. 4.15 B)). Hingegen konnte in der Mehrzahl der Sammelrohre von Tubulus-Renin KO Mäusen kein Renin nachgewiesen werden (Abb. 4.15 A e & f) ( $21 \pm 1,4$  % der ausgezählten Sammelrohre waren Renin-positiv (Abb. 4.15 B)). Die Pfeile im Abb. 4.15 e & f zeigen eine geringe Reninexpression in einem distalen Tubulus einer Knockout-Maus. Insgesamt fiel die tubuläre Reninexpression in den Tubulus-Renin KO Tieren deutlich geringer aus.



**Abb. 4.15: A. Immunfluoreszenzfärbung von diabetischen Tubulus-Renin WT und KO Mäusen für Renin (grün), co-gefärbt mit alpha-SMA (rot) und Aqp2 (rot). Bilder a & d:** Dargestellt sind die Glomeruli von STZ-behandelten Tubulus-Renin WT und KO Mäusen. Eine deutliche Reninfärbung im Bereich der JG-Zellen war in beiden Genotypen zu erkennen und zeigte keine Unterschiede zwischen WT und KO Mäusen. **b & c:** In den Tubulus-Renin WT Mäusen war nach acht Wochen Diabetes eine deutliche Reninfärbung in den Sammelrohren zu erkennen. Das gelbe Signal zeigt die Co-Lokalisation von Renin und Aqp2 an. **e & f:** Bei den diabetischen Tubulus-Renin KO Mäusen war bei der Mehrzahl der Sammelrohre keine Reninfärbung zu erkennen. Die Pfeile zeigen eine geringe Reninexpression außerhalb des Sammelrohrs. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m. **B. Statistische Auswertung der Renin-positiv gefärbten Sammelrohre pro Nierenschnitt.** In den Tubulus-Renin WT Mäusen waren signifikant mehr Sammelrohre Renin-positiv ( $62 \pm 2,9\%$ ;  $n=5$ ). Bei den KO Wurfgeschwister waren lediglich  $21 \pm 1,4\%$  Renin-positiv gefärbt ( $n=5$ ). #  $p<0,001$ .

#### 4.2.3.2 Renin mRNA Expression in verschiedenen Nierenkompartimenten

Neben dem Nachweis des Renin-Proteins in den Immunfluoreszenzfärbungen, wurde die Renin mRNA Expression in verschiedenen Nierenabschnitten der Tubulus-Renin Wildtyp- und Knockout-Mäuse bestimmt. Hierfür wurden Glomeruli, kortikale Tubuli und die Nierenpapille per Mikrodissektion von unbehandelten und STZ-induzierten Versuchstieren beider Genotypen gesammelt und die Abundanz der Renin mRNA mittels semiquantitativer Realtime-PCR bestimmt.



**Abb. 4.16: Renin mRNA Abundanz verschiedener Nierenkompartimente von Tubulus-Renin WT (n=4) und KO Mäusen (n=4).** **A. Glomeruli:** Nach STZ-Behandlung konnte bei den Tubulus-Renin WT Mäusen ein signifikanter Abfall der Renin mRNA beobachtet werden. **B. Kortikale Tubuli:** Die kortikalen Tubuli der Tubulus-Renin KO Mäuse wiesen eine deutlich geringere Renin mRNA Konzentration im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern auf. Acht Wochen nach STZ-Gabe war darüber hinaus ein signifikanter Anstieg in der Renin mRNA in den Wildtypen zu erkennen. **C. Innere Medulla:** Nach Induktion des STZ-Diabetes zeigten die Tubulus-Renin WT einen deutlich höheren Gehalt an Renin mRNA im Vergleich zu den Tubulus-Renin KO Tieren. \*  $p < 0,05$  vs. basal desselben Genotyps, oder wie durch den Balken angezeigt. #  $p < 0,001$  vs. basal desselben Genotyps oder wie durch den Balken angezeigt. Die Expression wurde auf das Housekeeper-Gen 18s normalisiert.

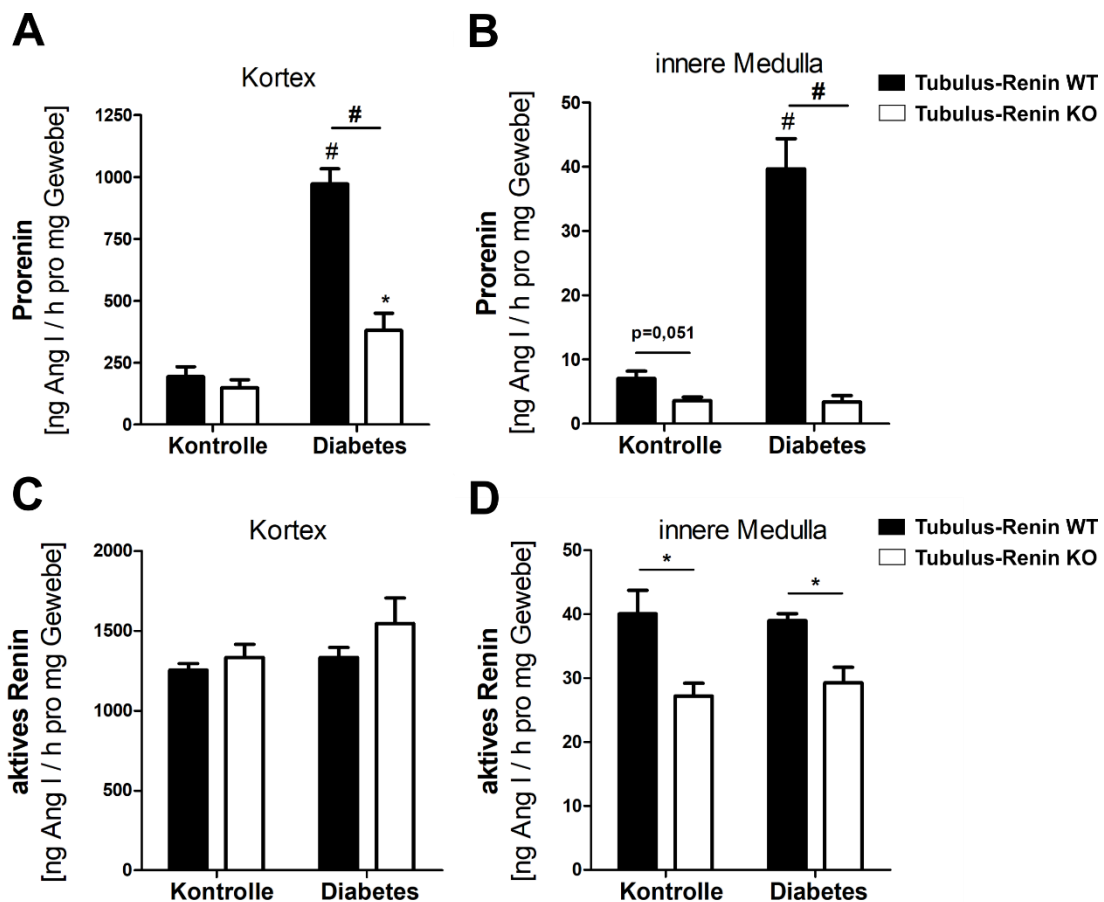
Unter Kontrollbedingungen war in den Glomeruli kein signifikanter Unterschied in der Renin mRNA zwischen den beiden Genotypen zu erkennen (Abb. 4.16 A). Nach Induktion des Diabetes sank der Gehalt der Renin mRNA in den Wildtypen, nicht aber bei den Tubulus-Renin KO Mäusen, ab (WT:  $1,63 \pm 0,184$  (Kontrolle) vs.  $0,61 \pm 0,06$  (Diabetes),  $p < 0,001$ ; KO:  $1,14 \pm 0,21$  (Kontrolle) vs.  $0,86 \pm 0,19$  (Diabetes); n.s.; Abb. 4.16 A). Die Renin mRNA Konzentration in kortikalen Tubuli war bereits unter Kontrollbedingungen in den Knockout-Mäusen signifikant niedriger als in den Wildtypen und veränderte sich unter diabetischen Bedingungen bei den Tubulus-Renin Knockout-Mäusen nicht. Bei Wildtyp-Mäusen hingegen stieg die Renin mRNA in den kortikalen Tubuli signifikant um den Faktor 2 an (WT:  $0,16 \pm 0,02$  (Kontrolle) vs.  $0,31 \pm 0,03$  (Diabetes),  $p < 0,05$ ; KO:  $0,09 \pm 0,02$  (Kontrolle) vs.  $0,06 \pm 0,01$  (Diabetes); n.s.). Ähnlich fiel auch das Ergebnis für die innere Medulla aus (Abb. 4.16 C). Hier war unter Kontrollbedingung ein deutlich vermindertes Level an Renin mRNA in den Tubulus-Renin Knockout-Mäusen, im Vergleich zu den Wildtypen zu sehen. Als Folge des Diabetes stieg die Reninkonzentration in der Papille der Tubulus-Renin Wildtypen um den Faktor 3 an, die der Knockout-Mäuse blieb konstant gering (WT:  $0,23 \pm 0,1$  (Kontrolle) vs.  $0,78 \pm 0,2$  (Diabetes), n.s.; KO:  $0,05 \pm 0,02$  (Kontrolle) vs.  $0,08 \pm 0,05$  (Diabetes); n.s.).

#### 4.2.3.3 Prorenin und aktives Renin im Nierengewebe

Um Veränderungen der Konzentration von aktiven Renin in den einzelnen Nierenzonen zu untersuchen, wurden die Nieren von unbehandelten tubuluspezifischen Renin Wildtyp- und Knockout-Mäusen in Kortex und innere Medulla zerteilt. Sowohl die Konzentration des Prorenins, als auch des aktiven Renins zeigte einen deutlichen kortikal-medullären Gradienten, mit hohen Konzentrationen im Kortex und niedrigeren Leveln in der inneren Medulla (Abb. 4.17 A-D). Auf Grund dieses starken Gefälles würde bereits eine geringe Kontamination der Proben der äußeren Medulla mit kortikalem Gewebe eine starke Verfälschung der Ergebnisse bewirken. Daher wurden nur Proben des Kortex und der davon sicher zu trennenden inneren Medulla für die Analysen verwendet.

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde die Konzentration des enzymatisch inaktiven Prorenins nach Aktivierung durch die Abspaltung des Pro-Peptids durch Trypsin bestimmt. Unter Kontrollbedingungen fanden sich vergleichbare Proreninwerte im Kortex bei Tubulus-Renin Wildtyp- und Knockout-Mäusen (Abb. 4.17 A). Nach acht Wochen Diabetes trat in den Wildtypen ein starker Anstieg des Prorenins auf (WT:  $195 \pm 40$  (Kontrolle) vs.  $972 \pm 62$  ng Ang I / h pro ml (STZ);  $p < 0,001$ ), während bei Knockout-Tieren lediglich eine leichte Erhöhung zu verzeichnen war (KO:  $150 \pm 32$  (Kontrolle) vs.  $381 \pm 70$  ng Ang I / h pro mg (STZ);  $p < 0,05$ ). Die innere Medulla wies ein ähnliches Muster auf (4.17 B). Die STZ-Induktion führte in den Tubulus-Renin WT Mäusen zu einer sechsfachen Erhöhung der Proreninkonzentration (WT:  $7 \pm 1,2$  (Kontrolle) vs.  $40 \pm 4,7$  ng Ang I / h pro ml (STZ);  $p < 0,001$ ), die bei Tubulus-Renin Knockout-Tieren völlig ausblieb (KO:  $3,6 \pm 0,6$  (Kontrolle) vs.  $3,4 \pm 1,0$  ng Ang I / h pro mg (STZ); n.s.).

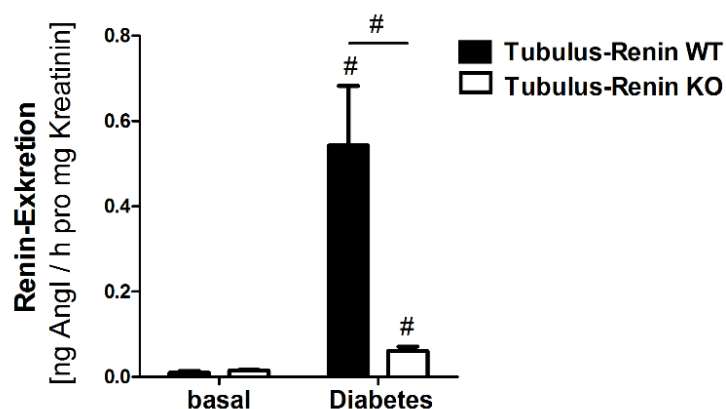
Die Konzentration des aktiven Renins wies basal, wie auch im diabetischen Zustand der beiden Genotypen keine Unterschiede auf (Abb. 4.17 C). In der inneren Medulla wurden sowohl basal, als auch nach Induktion des Diabetes, signifikant niedrigere Werte in den Tubulus-Renin Knockout-Tieren, verglichen mit den Wildtyp-Wurfgeschwistern gemessen (Abb.4.17 D: Kontrolle KO:  $27,2 \pm 2$  vs. WT:  $40,1 \pm 3,7$  ng Ang I / h pro mg;  $p < 0,05$ ; STZ KO:  $29,3 \pm 2,4$  vs. WT:  $39 \pm 1,1$  ng Ang I / h pro mg;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 4.17: Prorenin und aktives Renin im Nierengewebe der tubuluspezifischen Renin WT und KO Mäuse, Kontrollen (WT: n=7; KO: n=6) und nach acht Wochen Diabetes (WT: n=8; KO: n=6).** **A. Prorenin im Kortex:** Der Proreningehalt stieg nach STZ-Diabetes in beiden Genotypen signifikant an, war jedoch deutlich ausgeprägter in den Tubulus-Renin WT Mäusen zu sehen. **B. Prorenin in der inneren Medulla:** Nach STZ-Induktion verzeichneten die Tubulus-Renin Wildtypen einen starken Anstieg an Prorenin, dieser blieb in den Knockout-Mäusen gänzlich aus. **C. Aktives Renin im Kortex:** Weder unter Kontrollbedingungen noch im Diabetes war eine Veränderung der Reninkonzentration in den beiden Genotypen zu erkennen. **D. Aktives Renin in der inneren Medulla:** Sowohl in der Kontrolle als auch nach acht Wochen STZ zeigte sich eine deutlich geringere Reninkonzentration in den Tubulus-Renin KO Tieren, verglichen mit ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle desselben Genotyps, oder wie durch den Balken angezeigt. #  $p < 0,001$  vs. Kontrolle desselben Genotyps oder wie durch den Balken angezeigt.

#### 4.2.3.4 Renin-Exkretion im Urin

Vergleichbar mit den Resultaten der Reninexpression in den Tubuli, konnte unter Kontrollbedingungen nur eine geringe Reninkonzentration im Spontanurin der Versuchstiere beider Genotypen nachgewiesen werden (Abb. 4.18). Das Auslösen des Diabetes führte zu einem sehr starken Anstieg der Reninkonzentration im Urin der Tubulus-Renin Wildtyp-Mäuse, nicht jedoch im Urin der Knockout-Tiere. (Abb. 4.18: WT:  $0,01 \pm 0,004$  (basal) vs.  $0,543 \pm 0,14$  ng Ang I / h pro mg Kreatinin (STZ); KO:  $0,061 \pm 0,010$  ng Ang I / h pro mg Kreatinin (STZ);  $p < 0,001$ ). Der inaktive Vorläufer Prorenin war in den Urinproben der Mäuse nicht detektierbar.

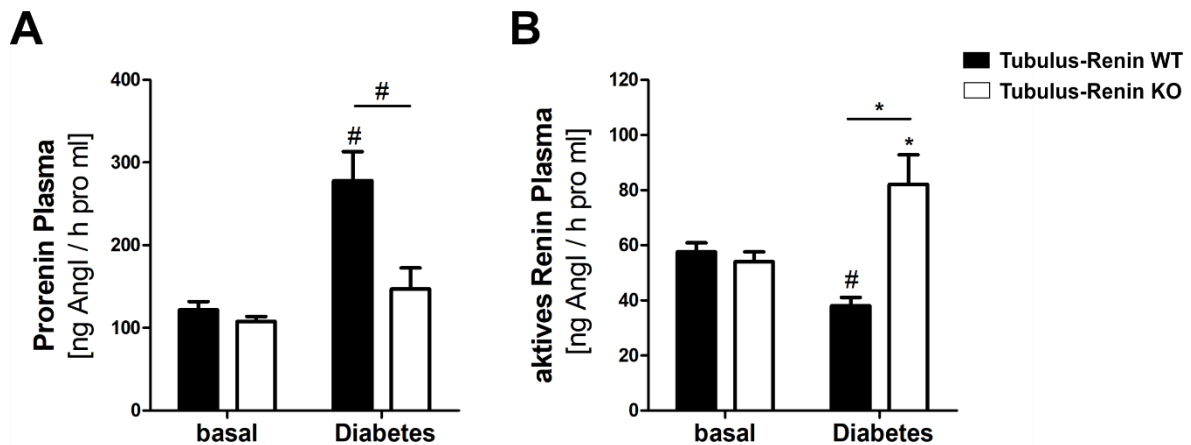


**Abb. 4.18: Renin-Exkretion in Spontanurinproben von unbehandelten und STZ-induzierten Tubulus-Renin WT und KO Mäusen.** Die statistische Auswertung zeigte einen deutlichen Anstieg der Reninausscheidung nach Induktion des Diabetes in beiden Genotypen. Die diabetischen Tubulus-Renin WT Mäuse (n=11) wiesen eine signifikant höhere Reninkonzentration im Urin auf, im Vergleich zu den diabetischen Tubulus-Renin KO Tieren (n=12). Die Reninausscheidung wurde auf die Kreatininkonzentration der jeweiligen Urinprobe bezogen. #  $p < 0,001$  vs. basal desselben Genotyps oder wie durch den Balken angezeigt.

#### 4.2.3.5 Prorenin und aktives Renin im Plasma

Übereinstimmend mit Daten von Untersuchungen diabetischer Patienten [244-246], waren bei den STZ-diabetischen Wildtyp-Mäusen die Plasmaproreninspiegel, im Vergleich zu den Basalwerten, signifikant erhöht. (Abb. 4.19 A: WT:  $121,8 \pm 10,1$  (basal) vs.  $278,2 \pm$  ng Ang I / h pro ml (STZ),  $p < 0,001$ ). Die Konzentration von aktiven Renin im Plasma war hingegen nach Diabetes-Induktion in den Tubulus-Renin WT Mäusen deutlich vermindert (Abb. 4.19 B: WT:  $57,6 \pm 3,3$  (basal) vs.  $38,0 \pm 3$  ng Ang I / h pro ml (STZ),  $p < 0,001$ ). Bei Tubulus-Renin Knockout-Mäusen blieben die Plasmaproreninlevel auch nach der Induktion des Diabetes konstant (Abb. 4.19 A: KO:  $107,7 \pm 6,1$  (basal) vs.  $147,0 \pm 25,8$  ng Ang I / h pro ml (STZ)), während das aktive Renin leicht anstieg (Abb. 4.19 B: KO:  $54,0 \pm 3,6$  (basal) vs.  $82,1 \pm 10,7$  ng Ang I / h pro ml (STZ),  $p < 0,01$ ).

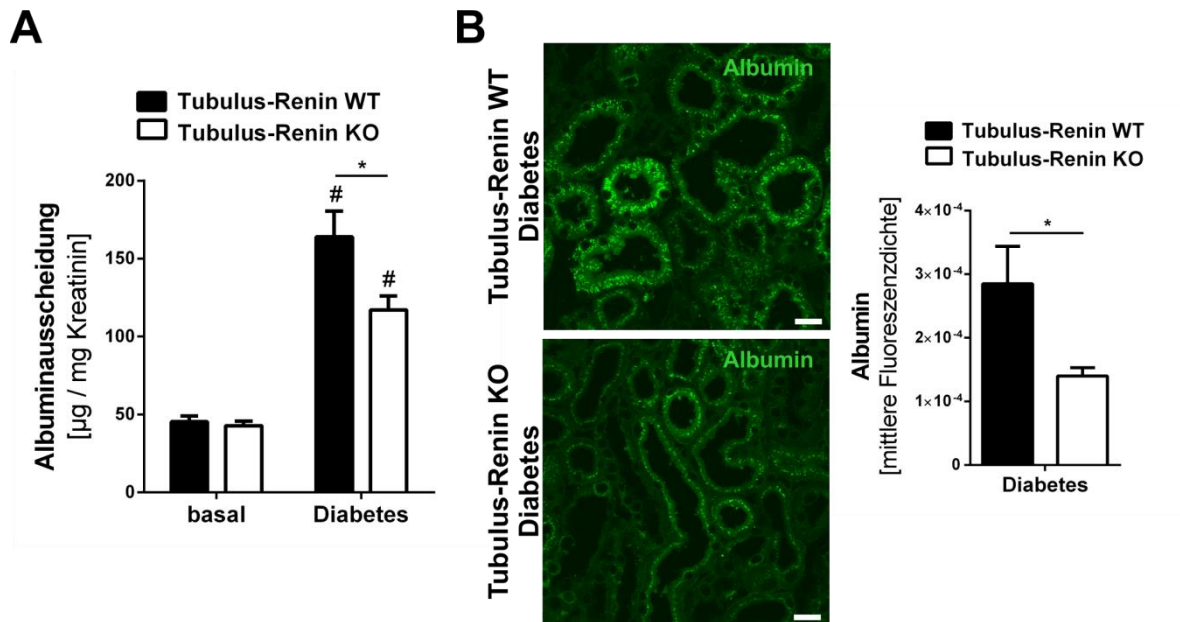




**Abb. 4.19: Prorenin und aktives Renin im Plasma der Tubulus-Renin WT und KO Tiere, basal und acht Wochen nach der STZ-Induktion. A. Prorenin:** Basal zeigten sich keine Unterschiede in den Plasma-Proreninkonzentrationen der beiden Genotypen (WT: n=13; KO: n=17). Nach Induktion des Diabetes stiegen in den Tubulus-Renin WT-Mäusen die Proreninspiegel deutlich an (n=9). In den KO-Tiere blieb ein solcher Anstieg aus (n=12). **B. Aktives Renin:** Die Tiere unterschieden sich basal nicht in ihrer Reninkonzentration (WT: n= 18; KO: 22). Im Diabetes sank das aktive Renin der Tubulus-Renin WT Mäuse (n=17), bei den KO Tieren hingegen stieg es an (n=12). \* p<0,01 vs. basal desselben Genotyps, oder wie durch den Balken angezeigt. # p<0,001 vs. basal desselben Genotyps, oder wie durch den Balken angezeigt.

#### 4.2.3.6 Untersuchung der Albuminausscheidung

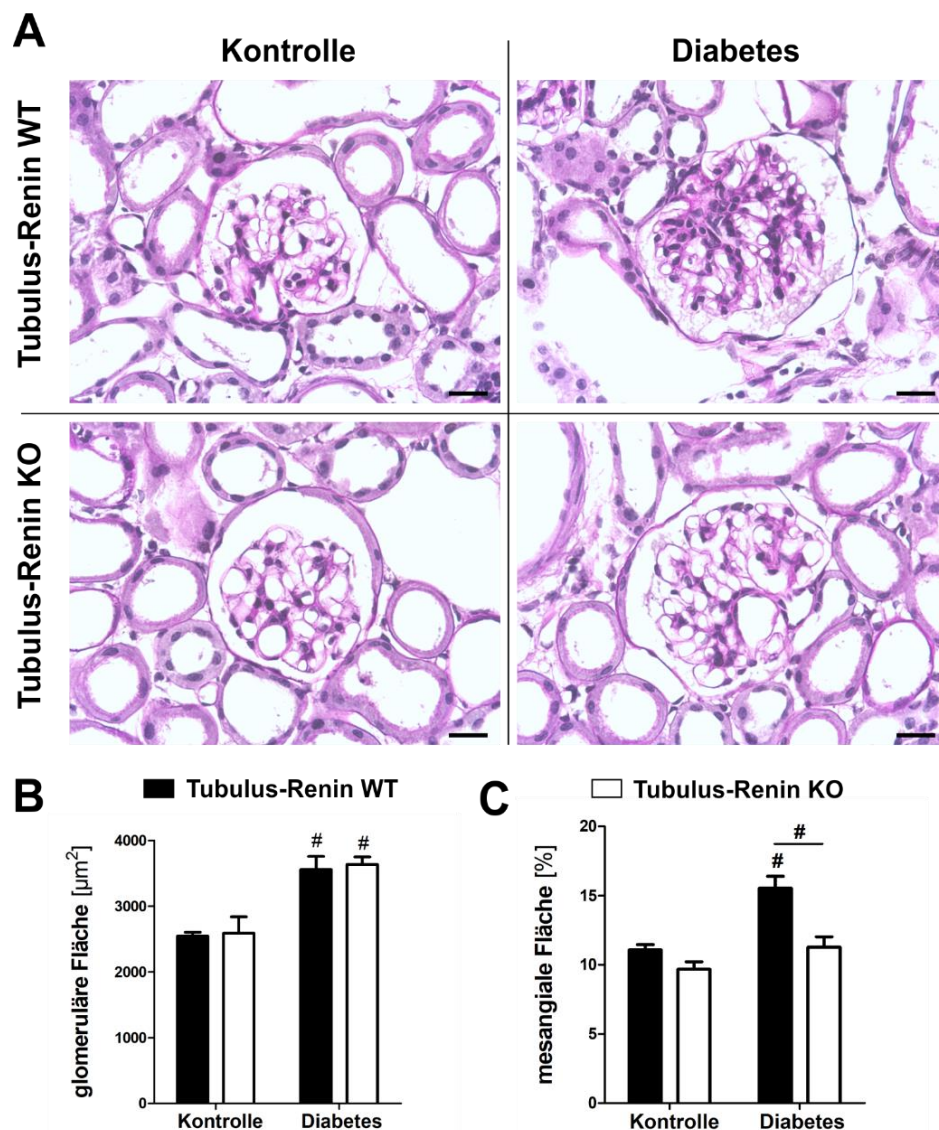
Bei renalen Erkrankungen wie der diabetischen Nephropathie kommt es charakteristischerweise zur Ausscheidung von Albumin im Urin. Unter basalen Bedingungen zeigten die Tubulus-Renin Knockout- und Wildtyp-Mäuse keinen Unterschied bezüglich ihrer Ausscheidung von Albumin (WT:  $45,3 \pm 3,9 \mu\text{g} / \text{mg}$  Kreatinin; KO:  $42,8 \pm 3,0 \mu\text{g} / \text{mg}$  Kreatinin; Abb. 4.20 A). Die Induktion des STZ-Diabetes führte nach achtwöchiger Dauer zu einer leichten Albuminurie im Spontanurin beider Genotypen. Dieser Anstieg war bei den Tubulus-Renin Knockout-Tiere allerdings signifikant geringerer als bei den Tubulus-Renin Wildtyp-Mäusen (WT STZ:  $164,1 \pm 16,5 \mu\text{g} / \text{mg}$  Kreatinin; KO STZ:  $117,1 \pm 9,0 \mu\text{g} / \text{mg}$  Kreatinin; Abb. 4.20 A). Die nachgewiesene Mikroalbuminurie könnte zum einen durch eine verstärkte glomeruläre Filtration, als Konsequenz einer Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere, zustande gekommen sein, oder aber Folge einer reduzierten tubulären Resorption des Albumins sein. Zur Klärung dieser Frage wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit einem Antikörper gegen Albumin angefärbt (Abb. 4.20 B). Vergleichbar mit der Albumin-Exkretion wurde in den STZ-behandelten Tubulus-Renin Knockout-Mäusen ein signifikant geringeres Albumin-Fluoreszenzsignal, als in den Wildtyp-Mäusen detektiert (Abb. 4.20 B).



**Abb. 4.20: Albuminausscheidung und Albumin-Immunfluoreszenzfärbung in Tubulus-Renin WT und KO Mäusen, basal und acht Wochen nach Diabetesinduktion.** **A.** Die Quantifizierung von Albumin im Spontanurin der Versuchstiere ergab einen signifikanten Anstieg der Albuminausscheidung nach Induktion des Diabetes in beiden Genotypen. Die Tubulus-Renin KO Mäuse (n=27) zeigte jedoch signifikant geringere Werte im Vergleich zu den Wildtypen (n=23). Die Ausscheidung von Albumin wurde auf die Kreatininkonzentration der jeweiligen Urinprobe bezogen. **B.** Die Auswertung der Fluoreszenzdichte ergab eine signifikant geringere Albuminfärbung in den Tubulus-Renin Knockout-Mäusen (n=6) verglichen mit den Wildtypen (n=5). \* p<0,05 vs. Tubulus-Renin WT bzw. wie durch den Balken angezeigt wird, # p<0,001 vs. basal desselben Genotyps. Maßstabsbalken: 20 µm.

#### 4.2.3.7 Histologische Untersuchungen

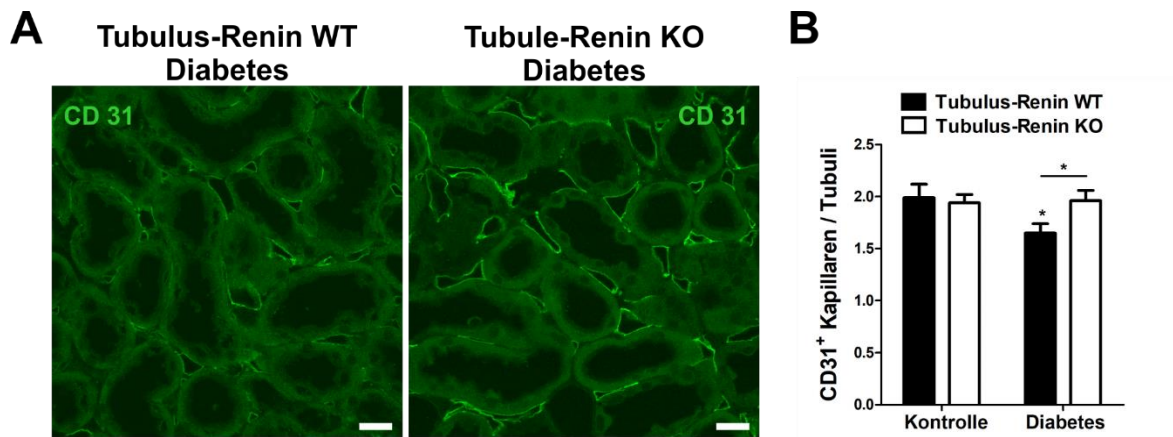
Initiales Anzeichen einer sich entwickelnden diabetischen Nephropathie ist neben der Mikroalbuminurie eine Hypertrophie der Glomeruli und die Expansion des intraglomerulären Mesangiums. Um diese Auswirkungen zu untersuchen wurden die Nieren mit einem PAS-Reagenz angefärbt (Abb. 4.21 A). Bei beiden Genotypen war die glomeruläre Fläche nach STZ-Behandlung deutlich größer als bei unbehandelten Tieren, Unterschiede zwischen den Genotypen fanden sich nicht (Abb. 4.21 B: KO: 2588 ± 252 µm<sup>2</sup> (Kontrolle) vs. 3635 ± 112 µm<sup>2</sup> (STZ); WT: 2544 ± 59 µm<sup>2</sup> vs. 3557 ± 200 µm<sup>2</sup> (STZ), p<0,01). Neben der Hypertrophie war bei STZ-behandelten Wildtypmäusen auch eine Expansion des Mesangiums erkennbar. Dieses Charakteristikum der diabetischen Nephropathie war bei STZ-induzierten Tubulus-Renin KO Mäusen nicht vorhanden (Abb. 4.21 C: WT: 11,08 ± 0,37% (Kontrolle) vs. 15,54 ± 0,87% (STZ); bzw. KO: 11,28 ± 0,75% (STZ), p<0,01).



**Abb. 4.21: Glomeruläre Hypertrophie und mesangiale Expansion.** **A** PAS-Färbung der Nierenschnitte von unbehandelten und STZ-induzierten Tubulus-Renin WT und KO Mäusen. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ . **B**. Die glomeruläre Fläche war bei beiden Genotypen nach STZ signifikant vergrößert. **C**. Die statistische Analyse der mesangialen Fläche (purpurfarben) zeigte eine Expansion des Mesangiums in den STZ-injizierten Tubulus-Renin WT Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren und diabetischen KO Tieren. Zur statistischen Auswertung wurde die mesangiale Fläche auf die glomeruläre Fläche bezogen. #  $p < 0,01$  vs. basal desselben Genotyps oder wie durch den Balken angezeigt.

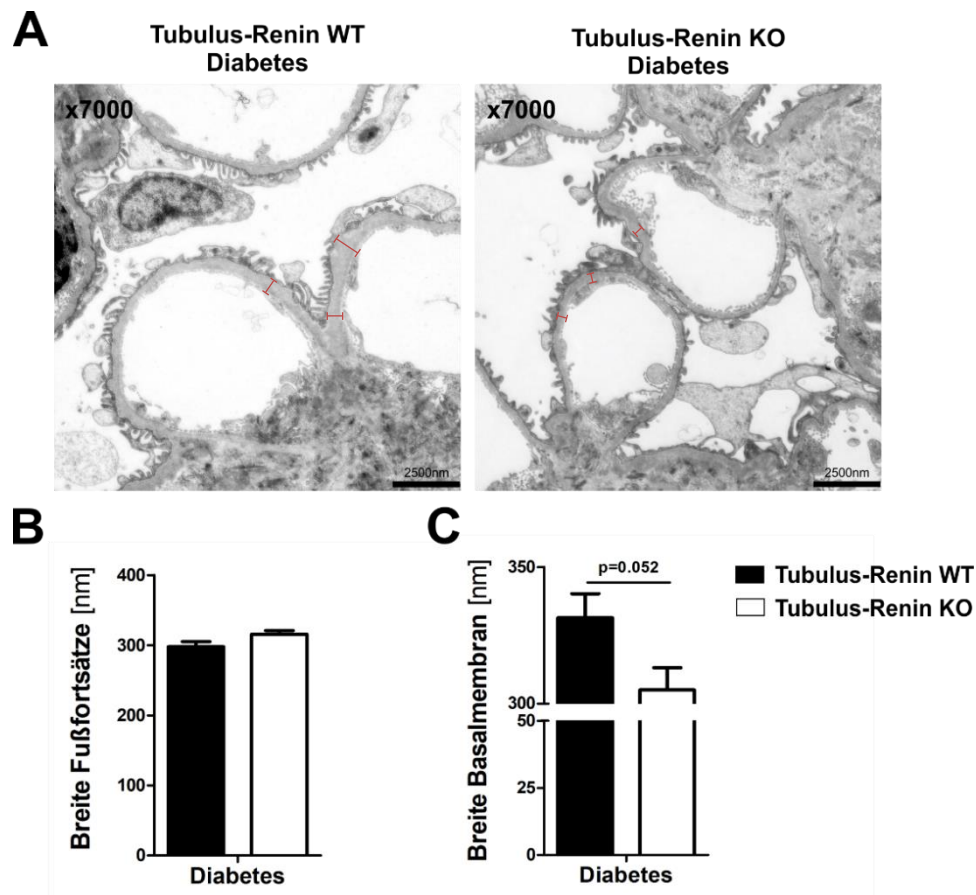
Eine weitere Veränderung, die im Rahmen der diabetischen Nephropathie auftritt, ist die Verminderung der Dichte peritubulärer Kapillaren. Zur Bestimmung der Kapillardichte wurden Paraffinschnitte mit einem Antikörper gegen CD31, einem Marker für Endothelzellen [270], gefärbt (Abb. 4.22 A). Neben der Anfärbung der glomerulären Kapillaren und des Endothels des arteriellen Gefäßsystems, zeigte sich auch ein dichtes Netzwerk peritubulärer Kapillaren. Das Auszählen aller CD31-markierten Kapillaren zeigte eine deutliche Abnahme der Kapillardichte in den Nieren diabetischer Tubulus-Renin Wildtyp-Mäuse acht Wochen nach Induktion des Diabetes im Vergleich zu nicht-diabetischen Wildtyp-Kontrolltieren und zu den diabetischen Tubulus-Renin KO Mäusen (Abb. 4.22 B: WT:  $1,99 \pm 0,13$  (Kontrolle) vs.  $1,65 \pm$

0,09 (STZ); bzw. KO:  $1,96 \pm 0,1$  (STZ),  $p < 0,05$ ). Bei den tubuluspezifischen Renin Knockout-Mäusen blieb die Dichte der CD31-markierten Kapillaren auch nach achtwöchiger Diabetesdauer unverändert (Abb. 4.22 B: KO:  $1,94 \pm 0,08$  (Kontrolle) vs.  $1,96 \pm 0,1$  (STZ), n.s.).



**Abb. 4.22: Auswertung der peritubulären Kapillardichte.** **A.** Immunfluoreszenzfärbung mit einem CD31-Antikörper (grün) bei diabetischen Tubulus-Renin WT und KO Mäusen. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m. **B.** Die peritubuläre Kapillardichte war in den Tubulus-Renin WT Mäusen acht Wochen nach Induktion des Diabetes (n=9) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (n=7) und den diabetischen Tubulus-Renin KO Mäusen (n=7) deutlich vermindert. Bei Tubulus-Renin Knockout-Mäusen hingegen nahm die Kapillardichte auch nach acht Wochen Diabetes nicht ab. Für die statistische Auswertung wurde die Menge der CD31-positiven Kapillaren auf die Anzahl der Tubuli pro Aufnahme bezogen. \*  $p < 0,05$  vs. basal oder wie durch den Balken angezeigt.

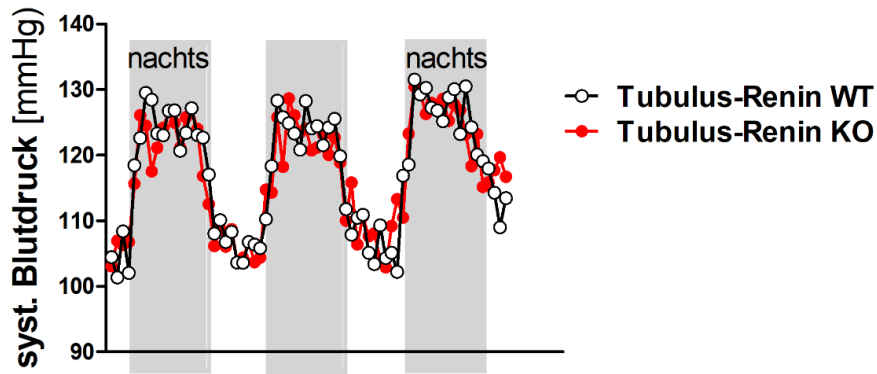
Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte die Ultrastruktur der Podozyten und mögliche Schäden in den Glomeruli der Versuchstiere untersucht werden (Abb. 4.23 A). Hier fanden sich acht Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus zwischen den Genotypen keine Unterschiede der Fußfortsatzbreite der Podozyten (Abb. 4.23 B: WT:  $298,5 \pm 7$  nm vs. KO:  $316 \pm 5$  nm, n.s.). Allerdings war die glomeruläre Basalmembran bei diabetischen Wildtypmäusen zumindest tendenziell dicker, als bei den Knockout-Mäusen (Abb. 4.23 C: WT:  $331 \pm 9$  nm (STZ) vs. KO:  $305 \pm 8$  nm (STZ);  $p = 0,052$ ).



**Abb. 4.23: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Glomeruli in STZ-diabetischen Tubulus-Renin Wildtyp- und Knockout-Mäusen.** **A.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen in 7000-facher Vergrößerung. **B.** Die Analyse der Fußfortsatzbreite ergab keinen Unterschied zwischen diabetischen Tubulus-Renin WT und KO Mäusen. **C.** Die statistische Auswertung der Basalmembrandicke zeigte eine stärkere Verdickung in den Tubulus-Renin WT Mäusen im Vergleich zu den diabetischen Knockout-Tieren. Die roten Linien zeigen beispielhaft die unterschiedlichen Dicken der Basalmembran.

#### 4.2.3.8 Blutdruck bei STZ-Diabetes

Die physiologische und pathophysiologische Signifikanz des tubulären Renin und Prorenins im Hinblick auf die Regulation des Blutdrucks ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass das tubuläre Renin den Blutdruck unabhängig von dem systemischen Renin modulieren kann [271, 272]. Um zu klären, ob der Blutdruck bei tubuluspezifischen Renin-KO Mäusen verändert ist, was möglicherweise für die beobachteten funktionellen Effekte verantwortlich sein könnte, wurden telemetrische Blutdruckmessungen über mehrere Tage durchgeführt. Wie in Abb. 4.24 zu sehen, unterschied sich der systolische Blutdruck von jeweils drei diabetischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen nicht. Auch fanden sich keine Unterschiede der Herzfrequenz, des diastolischen Blutdrucks und der Aktivität (nicht gezeigt). Auf die Untersuchung einer größeren Versuchsgruppe wurde daher verzichtet.



**Abb. 4.24: Telemetrische Bestimmung des arteriellen Blutdrucks in diabetischen Tubulus-Renin Wildtyp- und Knockout-Mäusen.** Der systolische Blutdruck unterschied sich im Mittel nicht zwischen Tubulus-Renin Wildtyp- und Knockout-Mäusen acht Wochen nach der Induktion des Diabetes. WT: n=3; KO: n=3.

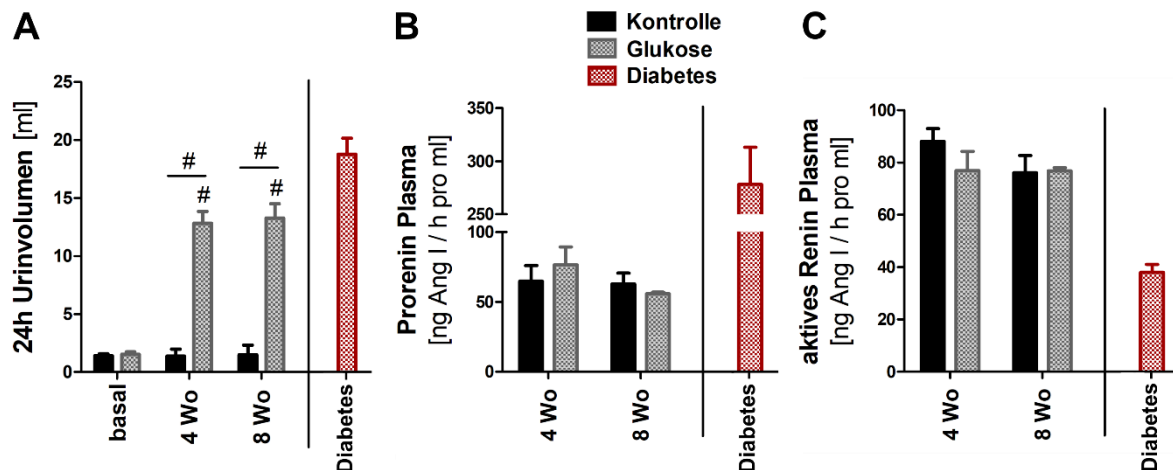
## 4.2.4 Untersuchung möglicher Mediatoren der erhöhten RAS-Aktivität beim Diabetes

### 4.2.4.1 Diurese

Aufgrund der osmotischen Wirkung nicht-resorbierter Glukose im Tubulus, tritt bei nicht behandelter Hyperglykämie häufig eine Polyurie auf [273]. Dies war auch bei unserem Mausmodell der Fall. Um zu klären, ob die vermehrte Wasseraufnahme und Urinausscheidung, unabhängig von den erhöhten Blutglukosespiegeln, eine mögliche Ursache für den Anstieg der Reninproduktion im Tubulus ist, wurde dem Trinkwasser von Wildtyp-Mäusen für acht Wochen 5% Glukose zugesetzt. Der süße Geschmack der Glukoselösung löste eine gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme und folglich ein 9-fach erhöhtes Harnvolumen in der Versuchsgruppe (Glukosegruppe) aus (Abb. 4.25 A; nach 4 Wochen:  $1,38 \pm 0,6$  ml (Kontrolle) vs.  $12,8 \pm 1,0$  ml (Glukosegruppe),  $p < 0,001$ ; nach acht Wochen:  $1,48 \pm 0,8$  ml (Kontrolle) vs.  $13,3 \pm 1,2$  ml (Glukosegruppe),  $p < 0,001$ ). Damit war die Diurese ähnlich ausgeprägt wie bei diabetischen Wildtyp-Mäusen (Abb. 4.25 A, roter Balken). Im Gegensatz zu den diabetischen Mäusen war die Glukose-Konzentration im Plasma und die Glukoseausscheidung im Urin unter der Zufuhr der Glukoselösung nicht erhöht. Die gesamte filtrierte Glukose wurde demnach im proximalen Tubulus wieder reabsorbiert (Daten nicht gezeigt).

Trotz der ausgeprägten Polyurie änderte sich weder das aktive Renin noch der Gehalt an inaktiven Prorenin im Plasma der Mäuse (Abb. 4.25 B & C). Sowohl nach vier-, als auch nach achtwöchiger Glukoseverabreichung war kein Unterschied zwischen der Kontroll- und Glukosegruppe zu erkennen (Prorenin 4 Wochen:  $64,66 \pm 11,29$  (Kontrolle) vs.  $76,59 \pm 12,67$  ng Ang I / h pro ml (Glukosegruppe); n.s.; Prorenin 8 Wochen:  $62,76 \pm 7,85$  (Kontrolle) vs.

55,85 ± 1,08 ng Ang I / h pro ml (Glukosegruppe); n.s.), (aktives Renin 4 Wochen: 87,98 ± 4,89 (Kontrolle) vs. 76,89 ± 7,29 ng Ang I / h pro ml (Glukosegruppe); n.s.; aktives Renin 8 Wochen: 76,04 ± 6,5 (Kontrolle) vs. 76,72 ± 1,24 ng Ang I / h pro ml (Glukosegruppe); n.s.). Zum Vergleich sind die Plasmaproreninwerte und die Konzentration an aktiven Renin diabetischer Mäuse in Abb. 4.25 B und C (rote Balken) dargestellt. Trotz ähnlich ausgeprägter Diurese waren beide Parameter bei diabetischen Tieren verändert (wie bereits in Punkt 4.2.3.5 gezeigt).



**Abb. 4.25: 24h-Urinvolumen, Prorenin und aktives Renin im Plasma von Kontrolltieren und unter erhöhter Trinkmenge (5%ige Glukoselösung).** A. Die Urinausscheidung war sowohl nach vier Wochen, als auch nach achtwöchiger Gabe von Glukose übers Trinkwasser deutlich erhöht. B. **Plasma-Proreninkonzentration:** Kein Unterschied zwischen hoher Trinkmenge (Glukose-Lösung) und Kontrollgruppe (Leitungswasser, normale Trinkmenge). C. **Aktives Renin im Plasma:** Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die roten Balken zeigen jeweils die Werte der Tubulus-Renin WT Mäuse acht Wochen nach der Induktion des Diabetes. #  $p < 0,01$  vs. basal oder wie durch den Balken angezeigt.

Auch die Bestimmung von Prorenin und aktiven Renin in den Nierenzonen ergab keine Unterschiede zwischen den Kontrollmäusen und den Tieren mit erhöhter Trinkmenge (5%ige Glukoselösung) (Tab. 4.2). In beiden Versuchstiergruppen waren die Konzentration von Prorenin und aktiven Renin im Kortex, äußerem und innerem Mark ähnlich.

**Tabelle 4.2: Prorenin und aktives Renin im Nierengewebe von Kontrolltieren und unter erhöhter Trinkmenge (5%ige Glukoselösung).** Bei beiden Parametern waren keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und Mäusen mit erhöhter Trinkmenge (acht Wochen Glukoseverabreichung) zu erkennen. Dargestellt sind MW ± SEM.

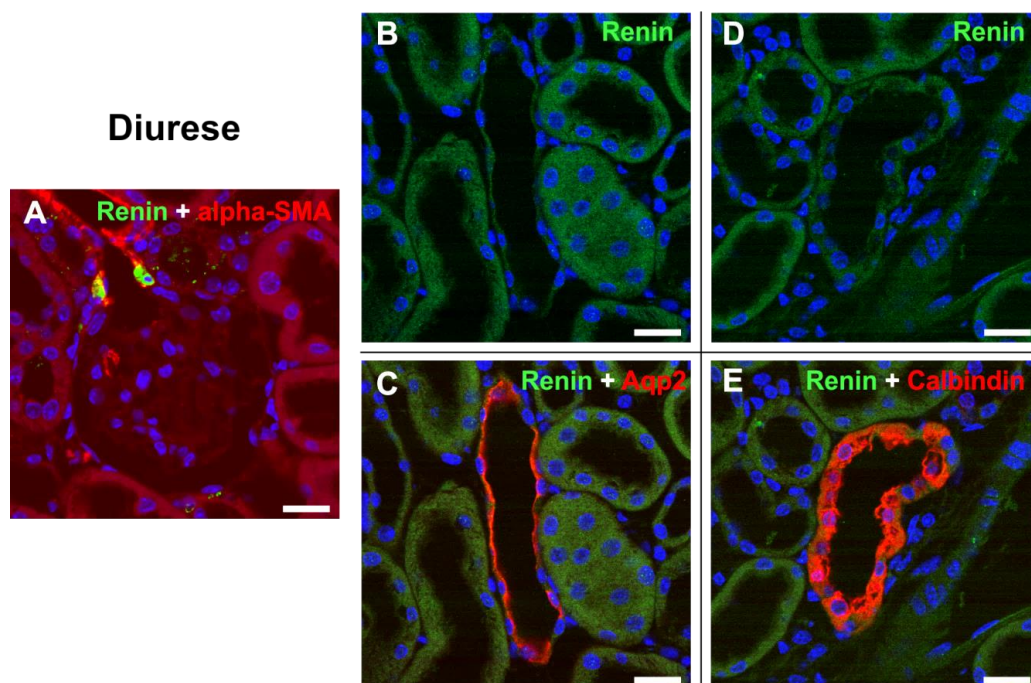
	Kontrolle	Glukose
<b>Prorenin</b>	<b>[ng Ang I / h pro ml]</b>	
Kortex	181,6 ± 21,7	119,4 ± 102,7
Äußeres Mark	53,4 ± 26,3	37,4 ± 24,1
Inneres Mark	1,2 ± 0,7	1,8 ± 0,4
<b>aktives Renin</b>	<b>[ng Ang I / h pro ml]</b>	
Kortex	526,2 ± 36,8	515,2 ± 22,4
Äußeres Mark	329,3 ± 83,4	356 ± 26,6
Inneres Mark	31,5 ± 0,9	32,4 ± 4,5

Die Renin mRNA Expression in den zonierten Nieren der beiden Versuchsgruppen wies ebenfalls keine Unterschiede auf (Tab. 4.3).

**Tabelle 4.3: Quantitative Realtime-PCR Analyse der Renin mRNA Expression im Nierengewebe von Kontrolltieren und unter erhöhter Trinkmenge (5%ige Glukoselösung).** Die beiden Versuchsgruppen wiesen auf mRNA Ebene keine signifikanten Unterschiede auf. Die Expression der Renin mRNA wurde auf das Housekeeper-Gen  $\beta$ -Actin normalisiert. Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM.

	Kontrolle (n=5)	Glukose (n=4)
<b>Renin mRNA / Actin</b>		
Kortex	2,10 $\pm$ 0,31	1,79 $\pm$ 0,13
Äußeres Mark	0,94 $\pm$ 0,23	0,73 $\pm$ 0,09
Inneres Mark	0,03 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,02

Des Weiteren wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Antikörpern gegen Renin, Aquaporin2, Calbindin sowie alpha-SMA angefärbt. Wie die Abb. 4.26 B-E zeigen, konnte kein Renin-Immunfluoreszenzsignal in den Sammelrohren und den distalen Tubuli der diuretischen Wildtyp-Mäuse nachgewiesen werden. Auch die JG-Zell-Reninexpression blieb durch die vermehrte Wasseraufnahme und das erhöhte Urinvolumen unverändert (Abb. 4.26 A).



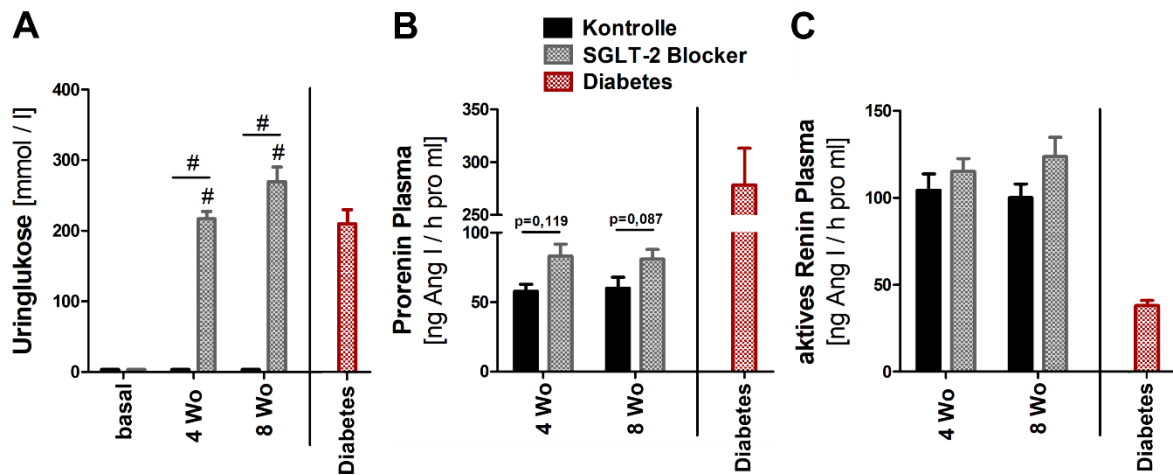
**Abb. 4.26: Immunfluoreszenzfarbungen von Wildtypmäusen unter erhöhter Trinkmenge (5%ige Glukoselösung).** A. Die Reninexpression der JG-Zellen (grün) wurde durch die achtwöchige Diurese nicht verändert. B.&C. Es konnte kein Reninsignal in den Sammelrohren (co-gefärbt mit Aqp2 in rot) von Mäusen mit erhöhter Trinkmenge (5%ige Glukoselösung) detektiert werden D.&E. Auch in den distalen Tubuli (co-gefärbt mit Calbinin in rot) fand sich keine Reninexpression in den Versuchstieren. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.



Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die erhöhte Trinkmenge und die daraus resultierende Polyurie keine Stimulation des tubulären Renins auslöste. Aufgrund dieser klaren Befunde wurde auf eine Vergrößerung der Stichprobe verzichtet.

#### 4.2.4.2 SGLT2 Blockade

Unter normoglykämischen Bedingungen wird die filtrierte Glukose fast vollständig über den Natrium-Glukose-Cotransporter 2 (SGLT2), der im S1 und S2 Segment des proximalen Tubulus lokalisiert ist, resorbiert [14, 274]. Bei Hyperglykämie reicht die Kapazität dieses Transporters und des im S3 Segment lokalisierten SGLT1 nicht mehr aus, um die Glukose vollständig zu resorbieren. Es kommt zu einem Anstieg der Glukosekonzentration in den distalen Tubulusabschnitten und schließlich im Urin. Um zu untersuchen, ob die erhöhte Glukosekonzentration im distalen Tubulus diabetischer Mäuse die Stimulation der tubulären Reninbildung auslöst, wurde der SGLT2 bei Wildtyp-Mäusen pharmakologisch gehemmt und so die Resorption von Glukose im proximalen Tubulus reduziert. Hierzu wurde den Mäusen über acht Wochen Empagliflozin über das Trinkwasser verabreicht (30 mg / kg KGW pro Tag; im Folgenden auch Empa-Gruppe). Tatsächlich erhöhte Empagliflozin die Glukosekonzentration im Urin sehr stark (Abb. 4.27 A; 4 Wochen: Wert nicht detektierbar (Kontrolle) vs.  $217 \pm 11$  mmol / dl (Empa-Gruppe),  $p < 0,001$ ; 8 Wochen: Wert nicht detektierbar (Kontrolle) vs.  $269 \pm 21$  mmol / dl (Empa-Gruppe),  $p < 0,001$ ). Die Glukosurie der Empagliflozin-behandelten Mäuse war etwa so ausgeprägt wie bei STZ-induzierten diabetischen Tubulus-Renin Wildtyp-Mäusen (siehe Abb. 4.27 A roter Balken). Obwohl die Plasmaproreninwerte in der Empa-Gruppe, im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren, nach vier und achtwöchiger Behandlung tendenziell leicht erhöht waren (4 Wochen:  $57,8 \pm 5$  (Kontrolle) vs.  $83,1 \pm 8,6$  ng Ang I / h pro ml (Empa-Gruppe), n.s.; 8 Wochen:  $60 \pm 7,9$  (Kontrolle) vs.  $81 \pm 6,8$  ng Ang I / h pro ml (Empa-Gruppe), n.s.) (Abb. 4.27 B), waren sie deutlich niedriger, als bei diabetischen Mäusen (roter Balken in Abb. 4.27 B). Die Konzentration an aktiven Renin im Plasma wurde durch die SGLT2-Blockade, im Gegensatz zu diabetischen Mäusen, nicht verändert (4 Wochen:  $104,2 \pm 9,5$  (Kontrolle) vs.  $115 \pm 7,5$  ng Ang I / h pro ml (Empa-Gruppe), n.s.; 8 Wochen:  $100 \pm 7,9$  (Kontrolle) vs.  $123,5 \pm 11,2$  ng Ang I / h pro ml (Empa-Gruppe), n.s.; Abb. 4.27 C).



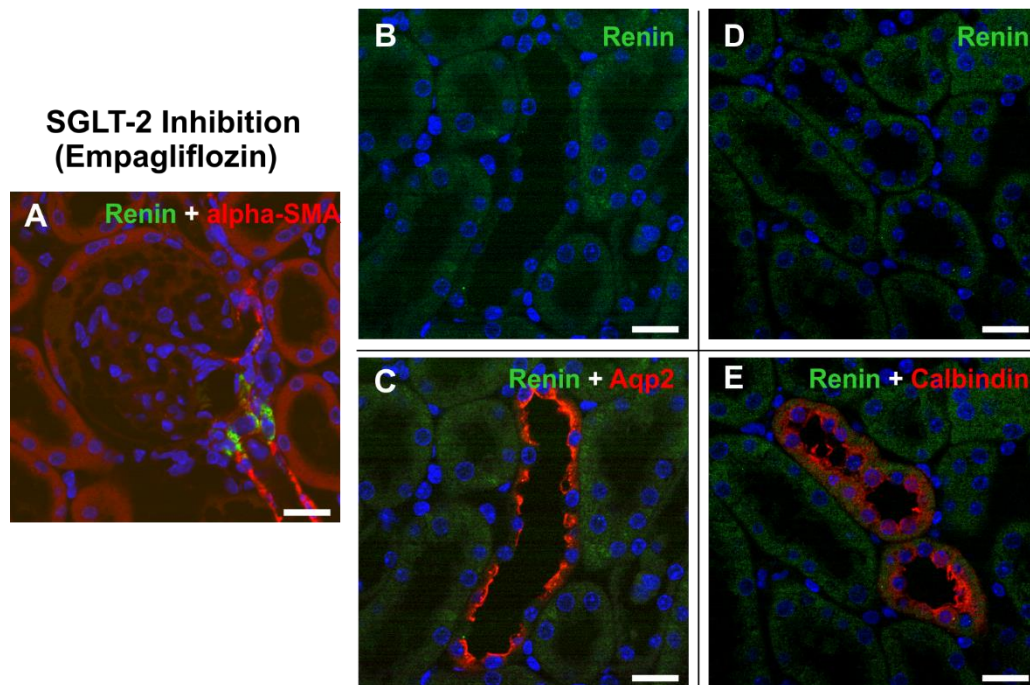
**Abb. 4.27: Glukoseausscheidung, Prorenin und aktives Renin im Plasma von Kontrolltieren (n=4) und Empagliflozin-behandelten Mäusen (n=8).** **A.** Empagliflozin erhöhte die renale Glukoseausscheidung. **B.** Die Hemmung des SGLT2 Transporters durch Empagliflozin führte zu einem tendenziellen Anstieg der Plasma Proreninkonzentration sowohl nach vier, als auch nach achtwöchiger Applikation. **C.** Empagliflozin hatte keinen Einfluss auf die Reninkonzentration im Plasma. In Rot sind jeweils die Balken der Tubulus-Renin WT Mäuse acht Wochen nach Diabetesinduktion dargestellt. # p<0,001 vs. basal oder wie durch den Balken angezeigt.

Empagliflozin hatte keinen Einfluss auf die renale Reninsynthese, da sich die Renin mRNA Expression im Kortex, äußerem und innerem Mark in beiden Versuchsgruppen nicht unterschied (Tab. 4.4).

**Tabelle 4.4: Quantitative Realtime-PCR Analyse der Renin mRNA Expression im Nierengewebe von Kontrollen und Empagliflozin-behandelten Mäusen.** Die beiden Versuchsgruppen wiesen auf mRNA Ebene keine signifikanten Unterschiede auf. Die Expression der Renin mRNA wurde auf das Housekeeper-Gen  $\beta$ -Actin normalisiert Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM.

	Kontrolle (n=4)	SGLT2-Blocker (n=8)
<b>Renin mRNA / Actin</b>		
Kortex	1,41 $\pm$ 0,22	1,22 $\pm$ 0,13
Äußeres Mark	0,75 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,08
Inneres Mark	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01

Schließlich führte die Blockade des SGLT2 und die daraus resultierenden höheren Glukosekonzentrationen in den distalen Tubuli zu keiner Veränderung der Reninexpression in den JG-Zellen (Abb. 4.28 A), Sammelrohren und distalen Tubuli (Abb. 4.28 B-E).



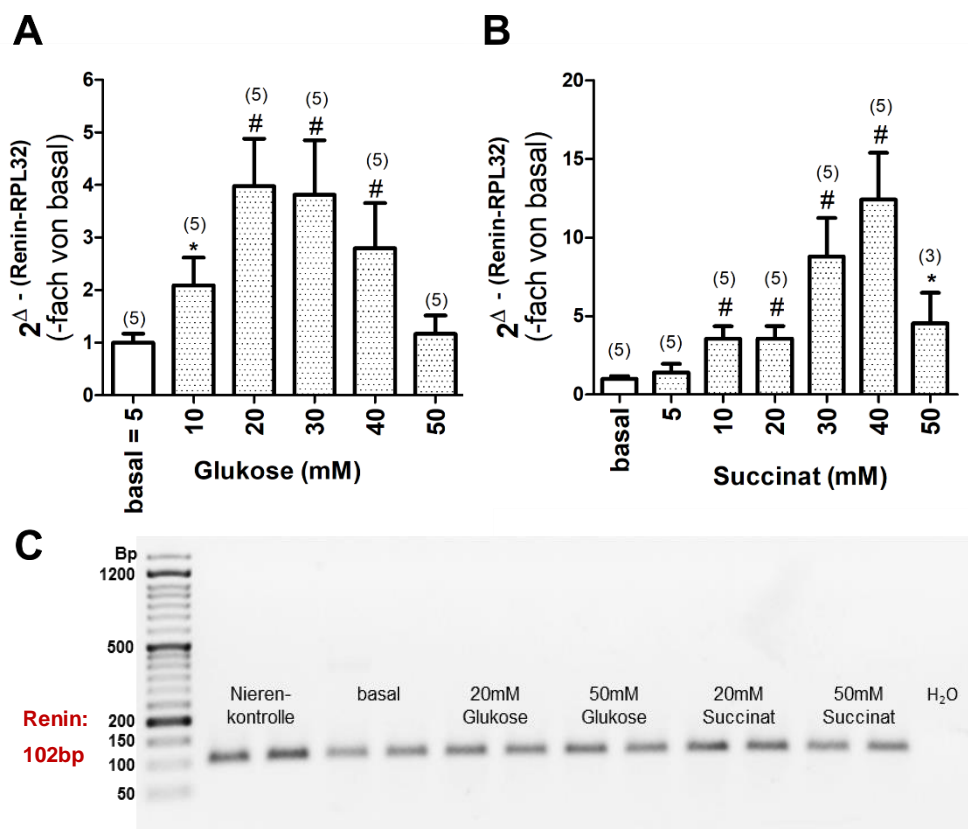
**Abb. 4.28: Immunfluoreszenzfärbung von Empagliflozin-behandelten Wildtypmäusen.** A. Die Reninexpression (grün) der JG-Zellen blieb durch die achtwöchige Gabe von Empagliflozin unverändert. **B.&C.** Es konnte kein Reninsignal in Sammelrohren (gefärbt mit einem Aqp2-AK in rot) der behandelten Mäuse detektiert werden **D.&E.** Auch in den distalen Tubuli (gefärbt mit einem Calbindin-AK in rot) kam es zu keiner Reninexpression in den Versuchstieren. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Zusammenfassend führte die Blockade des SGLT2 im proximalen Tubulus der Niere und die damit verbundene Glukosurie zu einer tendenziell erhöhten Proreninkonzentration im Plasma, die Reninaktivität wurde durch Empagliflozin nicht beeinflusst. Auch waren immunhistochemisch und auf mRNA Ebene keine Veränderungen der Reninexpression nachweisbar.

#### 4.2.4.3 *In vitro* Stimulation der tubulären Reninexpression durch Glukose und Succinat

Es gibt Hinweise, dass hohe Glukosespiegel das lokale RAS in der Niere aktivieren können. So wurde gezeigt, dass Podozytenzelllinien auf erhöhte Glukosespiegel im Medium mit einer gesteigerten Renin mRNA Expression und einer daraus resultierenden Erhöhung der ANG II-Konzentration antworten [275]. Kürzlich wurde auch ein parakriner Signalweg in der Niere beschrieben, durch den hohe Glukosespiegel die Freisetzung von Renin aus den JG-Zellen auslösen können. Diese Signalkaskade beinhaltet unter anderem die lokale Ansammlung des Citrat-Zyklus Intermediates Succinat und die Aktivierung seines Rezeptors GRP91. Dieser Rezeptor stellt daher möglicherweise eine Verbindung zwischen einer Hyperglykämie und der Aktivierung des lokalen intrarenalen RAS dar [276-278].

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob hohe Glukosekonzentrationen oder Succinat direkt die Reninbildung in Sammelrohrzellen (Sammelrohrzelllinie mCT1) stimulieren können. Tatsächlich war die Renin mRNA Abundanz in Sammelrohrzellen die für 24 Stunden einer Glukosekonzentration von 10 mM ausgesetzt waren doppelt so hoch als unter Kontrollbedingungen (5 mM Glukose; Abb. 4.29 A). Bei der Stimulation mit 20 mM Glukose erreichte die Renin mRNA Expression ihr Maximum. Die Zugabe von 25 mM steigerte die Reninexpression nicht weiter und eine Erhöhung der Glukosekonzentration auf 40 mM bzw. 50 mM führte zu einem Absinken der Reninexpression auf nahezu basale Ausgangswerte. Eine Erhöhung der Osmolarität mit NaCl bzw. Mannitol stimulierte die Renin mRNA Expression nicht.



**Abb. 4.29: Stimulation der Renin mRNA Expression in mCT1 Zellen.** **A.** Glukose stimulierte die Renin mRNA konzentrationsabhängig bis zu einer Konzentration von 30 mM Glukose. **B.** Succinat stimulierte die Renin mRNA Expression konzentrationsabhängig bis zu einer Konzentration von 40 mM Succinat Die Renin mRNA Expression wurde auf die Expression des Housekeeper-Gens RPL32 bezogen. **C.** Abbildung des PCR-Produkts (102bp) für Renin auf einem 2%igen Agarosegel. Die Niere dient als Positivkontrolle, Wasser als Negativkontrolle. \*  $p < 0,05$  vs. basal; #  $p < 0,01$  vs. basal. Die Anzahl der Stimulationsexperimente ist über jedem Balken in Klammern aufgeführt.

Die 24-stündige Stimulation der mCT1 Zellen mit 5 mM Succinat zeigten keinen merklichen Effekt auf die Reninexpression der Zellen (Abb. 4.29 B). Erst die Zugabe von 10 mM Succinat stimulierte die Renin mRNA Expression auf des 3,5-fache. Die Expression von Renin wurde

durch 30 bzw. 40 mM Succinat bis auf das 10-fache, im Vergleich zum Basalwert, gesteigert. Höhere Succinatkonzentrationen führten zu keinem weiteren Ansteigen der Renin mRNA Expression und, ähnlich wie bei dem Effekt von Glukose, nahm die Expression von Renin bei 50 mM Succinat wieder ab.

## 5 Diskussion

### 5.1 Wahl des geeigneten Mausmodells

#### 5.1.1 Rolle des Sammelrohr-Renins bei der Nierenentwicklung – sammelrohrspezifische Renin KO Maus

Da bekannt ist, dass Renin einen bedeutenden Faktor für die Nephrogenese darstellt und die lokale Bildung von Renin im Sammelrohr an der Entwicklung der Niere, insbesondere des Sammelrohrsystems, beteiligt sein könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit zu Beginn geklärt, ob das Fehlen des sammelrohrspezifischen Renins Auswirkungen auf die Nierenentwicklung der Mäuse hat. Sammelrohrspezifische Renin KO Mäuse (Aqp2-Cre/Ren KO) wiesen keine erhöhte perinatale Sterblichkeit auf und entwickelten sich normal. Die Nierenmorphologie der Knockout-Tiere war unauffällig, insbesondere konnte keine Hydronephrose, Atrophie der Papille, interstitielle Fibrose oder glomerulosklerotische Veränderung nachgewiesen werden. Auch die Anzahl der Sammelrohre war vergleichbar mit Kontrolltieren. Schließlich hatten auch erwachsene Aqp2-Cre/Ren KO Mäuse eine normale Urinausscheidung und Urinosmolarität, sodass, zumindest im verwendeten Mausmodell, kein Hinweis auf eine wesentliche Bedeutung des tubulären Renins in der Nierenentwicklung zu erkennen war. Auch in einer unabhängig generierten Aqp2-Cre/Ren KO Linie wurden bei ausgewachsenen Mäusen keine Störungen der Urin- und Elektrolytausscheidung festgestellt, was unsere Ergebnisse bestätigt [272]. Die Ableitung klarer Schlussfolgerungen aus diesen Ergebnissen wird jedoch durch mehrere Faktoren eingeschränkt. Zum einen müssen wir in Betracht ziehen, dass die verwendete Cre-Linie während der Nierenentwicklung keine ausreichende Aktivität besaß, um das Reninogen suffizient zu deletieren. Eine möglicherweise vorhandene Restexpression von Renin im Tubulus könnte ausreichend für eine normale Nierenentwicklung sein. Auch ist denkbar, dass der Aqp2-Promotor erst zu einem Zeitpunkt ausreichend aktiv ist, an dem die Funktion des tubulären Renins bereits nicht mehr für die vollständige Nierenentwicklung benötigt wird. Aqp2-mRNA wird erstmals bei Mäusen ab dem Embryonaltag E16 in der Ureterknospe nachgewiesen, Protein ab dem Embryonaltag E18. Eine deutliche Verstärkung der Aqp2-Expression tritt erst postnatal auf und erreicht vier Wochen nach der Geburt ihr Plateau [279]. Bei Mäusen findet sich Renin im Nierenmesenchym zum ersten Mal ab dem 14-15. Embryonaltag [164]. Eine große zeitliche Diskrepanz zwischen dem erstmaligen Auftreten von Aqp2 in den Ureterknospen und Renin im Nierenmesenchym scheint es somit nicht zu geben. Da nicht bekannt ist, ob und wann Renin in den Ureterknospen oder den Sammelrohren während der Nierenentwicklung exprimiert wird, bleibt dieser Punkt weiter ungeklärt.

Unter der Annahme, dass die genannten Fehlerquellen nicht zutreffen, wäre zu folgern, dass Sammelrohr-Renin keine wesentliche Rolle in der Nierenentwicklung spielt oder dass das Fehlen des Sammelrohr-Renins vom juxtaglomerulären Renin kompensiert werden kann. Im Gegensatz zu den tubulusspezifischen Renin Knockoutmäusen ist bei Mäusen mit globaler Deletion des Renins eine Kompensation des fehlenden Tubulus-Renins durch andere Quellen nicht möglich und entsprechende Entwicklungsdefekte sind die Folge. Ähnliche Nierenentwicklungsstörungen treten nicht nur bei genetisch bedingtem Fehlen von Renin auf, auch bei intrauteriner Exposition mit ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptor-Blockern wurden renale Veränderungen wie unvollständig entwickelte proximale Tubuli, Atrophie der Papille und Verdickung der Gefäßwand von Arterien und Arteriolen beschrieben [280, 281]. Alternativ ist denkbar, dass die renalen Entwicklungsstörungen bei Mäusen mit globaler Deletion im RAS nicht auf der fehlenden Wirkung von ANG II als tubulärem Differenzierungsfaktor beruhen, sondern eher die Folge einer schweren Hypotension und damit einer renalen Minderdurchblutung sind. Tatsächlich sind sehr ähnliche Nierenentwicklungsdefekte auch bei intrauterinen Störungen, die zu einer renalen Hypoperfusion und dadurch bedingt sogar zu einer Stimulation des RAS führen, beobachtet worden [282, 283]. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass meine Ergebnisse klar zeigen, dass Aqp2-Cre/Renin Knockout-Mäuse keine renalen Entwicklungsstörungen aufweisen. Wäre dies der Fall gewesen, hätten die Experimente eine funktionelle Bedeutung des Tubulus-Renins in der Nierenentwicklung belegt. Umgekehrt können die durchgeführten Experimente nicht ausschließen, dass tubuläres Renin eine Rolle in diesem Prozess spielt.

Auch für die weiteren Experimente war eine möglichst vollständige Deletion des Reningens im Sammelrohr sehr wünschenswert, was die ausreichende Expression und Aktivität der Cre-Rekombinase in den Hauptzellen der Sammelrohre voraussetzte. Um diese abschätzen zu können, wurde die sammelrohrspezifische Aqp2Cre-Linie mit der Cre-Reporter Maus „mTmG“ [255] gekreuzt. Die fluoreszenz-mikroskopischen Übersichtsaufnahmen der Nierenschnitte der Aqp2-Cre-Mäuse zeigten ein unvollständiges Expressionsmuster der Cre-Rekombinase in den renalen Sammelrohren. Insbesondere kortikal wiesen nur wenige Sammelrohre die Bildung des grün fluoreszierenden mG-Proteins auf, welches nach erfolgreicher Aktivierung der Cre-Rekombinase erscheinen sollte. Zur Papille hin schien die Aktivität der Cre-Rekombinase deutlich höher zu sein. Die Co-Färbung mit dem Hauptzellmarker Aqp2 zeigte zudem, dass auch innerhalb einzelner Sammelrohre nicht alle Hauptzellen erfolgreich rekombiniert waren. Da aus Voruntersuchungen anderer Gruppen damit zu rechnen war, dass gerade die kortikalen Sammelrohrhauptzellen Renin exprimieren können, schien das Aqp2-Cre-Modell nicht dazu geeignet zu sein, weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Sammelrohr-Renins durchzuführen. Das unvollständige Expressionsmuster in diesem Modell ist vermutlich auf eine fehlende oder nicht ausreichende

Expression der Cre-Rekombinase in den Zellen der Sammelrohre zurückzuführen. So war auffällig, dass im Nierenkortex zwar immunhistochemisch natives Aqp2 nachweisbar war, allerdings keine ausreichende Aktivität der Aqp2 getriebenen Cre-Rekombinase. Ein Grund hierfür könnte die verwendete Promotorsequenz des Aquaporin2-Gens sein, da bereits Unterschiede in der Promotorsequenz um einige Basen zu einer Varianz in der Expression führen können, so dass in den kortikal gelegenen Sammelrohren die Cre-Rekombinase nicht mehr ausreichend aktiv war.

Auch die Renin mRNA Expression der Aqp2-Cre/Renin Knockout-Mäuse (Daten wurden nicht gezeigt) bestätigte die Unterschiede in der Rekombinaseaktivität entlang der Nierenzonen und belegte eine starke Variabilität in der Deletionseffizienz, je nach dem, aus welcher Zone der Niere die Sammelrohre für die mRNA Expression isoliert wurden.

Unter Verwendung dieser sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Maus kann somit keine klare Schlussfolgerung über die funktionelle Rolle des tubulären Renins während der Nierenentwicklung getroffen werden. Ein Modell mit vollständiger Deletion des tubulären Reningens wäre für weitere Untersuchungen, im Hinblick auf die Beteiligung des lokalen Renin-Systems bei der Entwicklung der Niere, zwingend notwendig.

### 5.1.2 Tubulusspezifische Renin KO Maus

Auf Grund der unzureichenden Aktivität der Cre-Rekombinase in dem sammelrohrspezifischen Renin KO Mausmodell wurde für die weiteren Versuche eine induzierbare tubulusspezifische Renin Knockout-Maus (Pax8/TetO-Cre/Ren1<sup>flox/flox</sup>) verwendet. Hier erfolgte die Deletion des Reningens in dem gesamten Tubulussystem erst nach Abschluss der Nierenentwicklung. Induzierbare Cre-Systeme werden vor allem dann eingesetzt, wenn das Ausschalten eines Gens zu embryonal-letalen Phänotypen führt oder die Jungtiere sterben, bevor die Organe und Gewebe vollständig entwickelt sind. Mäuse mit induzierbaren Cre-Systemen können hingegen mit uneingeschränkter Genfunktion heranwachsen und die Cre-Rekombinase wird erst durch die Gabe von z.B. Doxycyclin über das Trinkwasser im Erwachsenenalter aktiviert. Ebenso wie die Aqp2-Cre Maus wurde die induzierbare Pax8/TetO-Cre/Ren1<sup>flox/flox</sup> mit der Cre-Reporter Maus (mTmG) gekreuzt [255], um histologisch die Lokalisation der Cre-Expression in der Niere abschätzen zu können. Bereits auf den Fluoreszenzaufnahmen war erkennbar, dass das System sehr genau reguliert wird. Ohne Doxycyclin-Gabe war nur die rote mT-Fluoreszenz detektierbar, was darauf schließen lässt, dass die Cre-Rekombinase unter diesen Umständen in der Niere nicht aktiv ist. Nach Induktion mit Doxycyclin war die grüne mG-Fluoreszenz in fast allen Zellen des Tubulussystems erkennbar. Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen Pax8-Aktivität in der Niere [256]. JG-Zellen, Glomeruli, Blutgefäße und interstitielle Zellen waren von der



Cre-Expression ausgenommen und fluoreszierten weiterhin rot. Die Rekombinationseffektivität in der induzierbaren Tubulus-Renin KO Maus war sehr gut und es zeigte sich, dass im Vergleich zum Aqp2-Cre Modell eine deutlich homogenere Cre-Aktivität gewährleistet war. Das Resultat spiegelte sich auch in den Daten der Renin mRNA Expressionsanalyse wieder. Diese war in isolierten Sammelrohren von Knockout-Mäusen auf ca. 15% der Wildtypen reduziert, was eine gute Deletionseffizienz des Reningens im Sammelrohr bestätigte. Das Fehlen des lokal produzierten Renins hatte keinen Einfluss auf die untersuchten funktionellen Parameter der Mäuse. In den Tubulus-Renin Knockout-Mäusen konnten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern keine Unterschiede im Körper- und Nierengewicht festgestellt werden. Auch Urinvolumen, Elektrolytausscheidung ( $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ ), Urin pH-Wert, sowie der Hämatokrit der Mäuse waren vergleichbar. Dies deckte sich mit den Ergebnissen vom Ramkumar und Kohan zu der Rolle von Sammelrohr-Renin für die Nierenfunktion [284]. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Deletion des Reningens im Tubulussystem bei ausgewachsenen Mäusen unter physiologischen Bedingungen keine wesentliche funktionelle Rolle zu spielen scheint.

## **5.2 Rolle des lokalen Renin-Systems bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie**

Da, zumindest nach den ersten Untersuchungen, das Tubulus-Renin unter physiologischen Bedingungen keine funktionelle Bedeutung hat, lag der Fokus im zweiten Teil der Arbeit auf der Rolle des intrarenalen Renin-Systems beim Diabetes mellitus bzw. bei der Entwicklung und Progression der diabetischen Nephropathie.

Für die Behandlung dieser komplexen Erkrankung kommen, neben der Kontrolle des Blutzuckerspiegels, vorrangig Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Systems zum Einsatz. Die Wirksamkeit dieser RAS Inhibitoren bei diabetischen Patienten mit renaler Schädigung wurde bereits in vielen großangelegten Humanstudien belegt [226-228]. Die Pathogenese der diabetischen Nephropathie ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, scheint aber mit einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems in Verbindung zu stehen. Allerdings lassen sich weder bei Patienten noch bei Tiermodellen mit diabetischer Nephropathie eindeutige Hinweise für eine Aktivierung des systemischen RAS, wie z.B. eine erhöhte Plasminogenaktivität, finden [135, 229, 285]. Dies führte zu der Überlegung, dass beim Diabetes nicht das systemische, sondern ein lokales intrarenales RAS aktiv sein und pathologische Effekte in der Niere auslösen könnte. Um diese Hypothese, dass es beim Diabetes in der Niere lokal zu einer vermehrten Produktion von Renin kommt, zu überprüfen, wurden verschiedene immunhistochemische Untersuchungen an zwei diabetischen Mausmodellen durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen war ausschließlich in den JG-Zellen

eine Reninexpression nachweisbar, während nach Induktion eines Typ 1 Diabetes mit Hilfe des  $\beta$ -Zelltoxins STZ eine deutliche Reninexpression im distalen Nephron (distaler Tubulus und Sammelrohr) detektiert werden konnte. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe von Peti-Peterdi, die eine Zunahme der Renin-speichernden Vesikel in den Sammelrohren von STZ-diabetischen Ratten mittels Quinacrine-Färbung nachweisen konnte [124]. Die verstärkte tubuläre Expression von Renin beschränkte sich nicht nur auf Mäuse mit einem Diabetes mellitus Typ 1, sondern war auch in einem Mausmodell mit einer progressiven diabetischen Nephropathie, ausgelöst durch einen Typ 2 Diabetes (BTBR ob/ob), zu sehen. Die BTBR ob/ob Mäuse entwickeln neben ihrer Insulinresistenz auch eine ausgeprägte Fettleibigkeit, bedingt durch das Fehlen des Hormons Leptin. Der andauernde hyperglykämische Zustand mit Blutglukosewerten von etwa 350-400 mg / dl ( $\sim 20$  mmol / l) [258] war auch in den Typ 1 diabetischen Wildtypmäusen zu finden und scheint vermutlich der Auslöser für die verstärkte Reninexpression im Tubulus dieser Mäuse zu sein. Die Aktivierung des tubulären Renin-Systems durch einen Diabetes mellitus war nicht nur im Mausmodell nachweisbar. Auch in humanen Nierenbiopsien von Typ 1 und Typ 2 Diabetikern konnten ich erstmals eine deutliche Reninexpression im Tubulussystem nachweisen, was nahelegt, dass die Aktivierung des gewebeständigen RAS nicht nur im Tiermodell, sondern auch beim Menschen eine relevante Rolle einnehmen könnte. Zudem weist die erhöhte Reninexpression in Nieren von Mäusen und Patienten mit Typ 1 und mit Typ 2 Diabetes darauf hin, dass die Aktivierung des tubulären Renin-Angiotensin-Systems unabhängig von der Ursache der Hyperglykämie ist. Schließlich scheint die Stimulation des tubulären Renins nicht durch Insulin vermittelt zu sein, da die Insulinkonzentration beim Typ 1 Diabetes vermindert, beim Typ 2 Diabetes aber in der Regel erhöht ist [177].

Experimente an einem transgenen Renin-Reporter-Mausmodell zeigten, dass der Reninpromotor in Tubuluszellen beim Diabetes mellitus aktiviert ist und die zuvor nachgewiesene tubuläre Renin-Proteinexpression das Resultat einer lokalen Produktion sein könnte und nicht ausschließlich auf einer Aufnahme aus der tubulären Flüssigkeit oder dem Interstitium beruht. In diesen BAC Ren-GFP Mäusen [257] fand sich keine GFP-Expression unter Normoglykämie. Allerdings zeigte sich, analog zur Renin-Proteinexpression, eine deutliche GFP-Färbung und damit Aktivität des Reninpromotors in den Sammelrohren diabetischer Tiere. Die tubuläre Reninsynthese wurde schließlich durch eine Renin *in situ* Hybridisierung gestützt, die das Vorhandensein der Renin mRNA in den Tubuli diabetischer Mäuse bestätigte. Der Nachweis einer tubulären Synthese von Renin mRNA beim Diabetes mellitus ist von besonderer Relevanz, da auch die Aufnahme von Renin aus der Tubulusflüssigkeit oder dem Interstitium in die Nierentubuli zu einer verstärkten lokalen Aktivierung des RAS beim Diabetes führen könnte [286]. Da Renin, mit seinem Molekulargewicht von etwa 41 kDa [287] unterhalb der glomerulären Filtrationsgrenze liegt,

kann es den glomerulären Filter zumindest teilweise passieren. Zusätzlich kann eine Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsbarriere, wie sie bei einem langanhaltenden Diabetes auftreten kann, dazu führen, dass die Filtration von RAS-Komponenten, wie Renin und Angiotensinogen, weiter zunimmt. Das so in das primäre Ultrafiltrat gelangte Renin könnte ähnlich dem Angiotensinogen endozytotisch über Megalin in den proximalen Tubulus [106, 288, 289], oder aber über die Bindung an den Prorenin-Rezeptor (PRR) [286, 290] in Tubuluszellen aufgenommen werden. Da auch das ACE im Tubulussystem der Niere exprimiert wird [123, 125, 131], wären somit alle Komponenten für die Aktivierung des RAS vorhanden. Welchen Beitrag die filtrierte Komponenten des RAS für die Aktivierung des lokalen Systems beim Diabetes wirklich leisten, ist noch nicht geklärt. Die Daten aus dieser Arbeit zeigen jedoch klar, dass es unter hyperglykämischen Bedingungen tatsächlich zu einer lokalen Bildung von Renin in den renalen Tubuli kommt und die filtrierte Anteile, wenn überhaupt nur eine verstärkende Wirkung innehaben.

Unerwartet war der Nachweis von Renin mRNA im Interstitium der diabetischen Tiere. So scheinen auch interstitielle Zellen in der Lage zu sein unter pathologischen Bedingungen Renin zu produzieren. In der gesunden Niere treten interstitielle Zellen kaum in Erscheinung und ziehen daher weniger Aufmerksamkeit auf sich. Bei Entzündungsprozessen und bei Fibrosierung der Niere rückt das renale Interstitium aber in den Fokus [291]. Da es auch bei der diabetischen Nephropathie zu einer glomerulären und tubulointerstitiellen Fibrose kommt, liegt die Vermutung nahe, dass auch die interstitiellen Zellen an der Entstehung und Progression dieser Erkrankung beteiligt sein könnten. Die Produktion und Sekretion von Renin aus perivaskulären interstitiellen Zellen, ausgelöst durch eine persistierende Hypotonie oder Salzverlust, wurde bereits beschrieben [291]. Diese Zellen vollziehen dabei eine Transdifferenzierung in hyperplasierte Renin-produzierende Zellen [292, 293]. Auch während der Nephrogenese sind interstitielle Perizyten in der Lage Renin zu synthetisieren, und auch hier wird die Zahl der Renin-exprimierenden Perizyten an den Bedarf angepasst [294]. Ein immunhistochemischer Nachweis des Reninproteins im Interstitium konnte in dieser Arbeit nicht erbracht werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass das Reninprotein ähnlich dem Glykoprotein-Hormon Erythropoetin [295] von den interstitiellen Zellen zwar gebildet wird (mRNA Expression), nicht aber in ausreichender Menge gespeichert wird und so nach der Synthese sofort freigesetzt wird.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass neben den tubulären Zellen, auch interstitielle Zellen, unter diabetischen Bedingungen, in der Lage sind Renin zu produzieren und so zu einer Aktivitätssteigerung des Renin-Angiotensin-Systems beitragen. Ob und wie die Reninbildung in interstitiellen Zellen beim Diabetes mellitus die Aktivität des lokalen RAS steigert und so zur Entwicklung der diabetischen Nephropathie beiträgt ist derzeit völlig unklar und wird in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

### 5.2.1 Rolle des lokalen Renin-Systems bei den STZ-diabetischen tubulusspezifischen Renin WT und KO Mäusen

Da unsere Daten eine eindeutige Erhöhung der tubulären Reninsynthese im diabetischen Zustand zeigten, wurde an der tubulusspezifischen Renin Knockout-Mauslinie der tatsächliche Einfluss der tubulären Reninbildung auf die Entstehung und Progression der diabetischen Nephropathie untersucht. Die immunhistochemischen Analysen zeigten erneut eine deutliche Reninexpression in Sammelrohren und distalen Tubuli der diabetischen Tubulus-Renin Wildtypmäuse. Allerdings waren auch in den Nieren der Tubulus-Renin KO Mäuse einige Renin-positive Sammelrohre zu erkennen. Dies könnte zum einen auf eine Aufnahme von Renin aus dem Extrazellulärraum zurückzuführen sein. Wahrscheinlicher erscheint aber eine unvollständige Deletion des Reningens und damit eine Restexpression des tubulären Renins in den Knockout-Tieren. Tatsächlich konnte im verwendeten Mausmodell keine 100%ige Deletion des Reningens in den Tubuli erreicht werden, diese war lediglich auf etwa 15% der WT-Expression reduziert.

Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Reduktion des tubulären Renins in den Knockout-Mäusen zu einer deutlich mildereren Ausprägung diabetes-bedingter Nierenschäden führte. Diese nephroprotektive Wirkung zeigte sich durch eine im Vergleich zu den diabetischen Wildtypen signifikant verringerte Albuminausscheidung. Die Albuminurie ist ein typischer Schädigungsmarker von Nephropathien. Unter physiologischen Bedingungen verhindert die glomeruläre Filtrationsbarriere die Filtration von Albumin aufgrund ihrer großen- und ladungsselektiven Eigenschaften nahezu vollständig [296]. Das trotzdem glomerulär filtrierte Albumin wird endozytotisch im proximalen Tubulus aufgenommen und unter Spaltung in einzelne Aminosäuren basolateral wieder in den Blutkreislauf zurückgegeben. Wird die Transportkapazität im proximalen Tubulus allerdings überschritten, kommt es zur Albuminurie [8]. Die erhöhte Albuminurie bei den diabetischen Tubulus-Renin WT Mäusen im Vergleich zu den Knockout-Tieren deutet auf eine stärkere Schädigung des glomerulären Filters hin. Diese Folgerung wird durch die verstärkte Albuminfärbung im proximalen Tubulus von Wildtypmäusen untermauert, die ebenfalls für eine verstärkte Filtration des Albumins bei den diabetischen Wildtypen spricht. Insgesamt ist das Ausmaß der vorliegenden Albuminurie in den beiden Genotypen nach acht Wochen Diabetes aber äußerst gering und lässt auf eine eher mild ausgeprägte renale Schädigung schließen. Neben der geringeren Ausscheidung an Albumin zeigten die Tubulus-Renin KO Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern auch eine geringere Expansion des glomerulären Mesangiums, ein weiteres initiales Anzeichen für eine sich entwickelnde diabetische Nephropathie [196]. Weitere Befunde, wie eine verminderte Dichte der peritubulären Kapillaren und eine stärker ausgeprägte Verdickung der glomerulären Basalmembran in den

diabetische Tubulus-Renin Wildtypen, sprechen ebenfalls dafür, dass sich das Vorhandensein von tubulärem Renin negativ auf die Entwicklung und Progression der diabetischen Nephropathie auswirkt. Da wie bereits erwähnt, die Deletion des tubulären Renins in den Knockout-Tieren nicht vollständig erfolgte und noch immer eine lokale Restaktivität vorhanden war, wird womöglich der nephroprotektive Effekt des fehlenden Renins in dem verwendeten Modell unterschätzt. Die Restaktivität in den Knockout-Tieren spiegelte sich sowohl auf mRNA Ebene, als auch in den Färbungen wieder. So war basal die Renin mRNA Expression in den kortikalen Tubuli nur um etwa die Hälfte der WT-Expression reduziert und auch in 20% der Sammelrohre der diabetischen Tubulus-Renin KO Mäusen konnte ein Reninsignal detektiert werden. Eine bessere Deletionseffizienz wäre somit wünschenswert gewesen und hätte vermutlich die gezeigten nephroprotektiven Effekte noch verstärkt.

Die vorliegenden Daten werfen nun die Fragen auf, warum bei den diabetischen Tubulus-Renin Knockout-Mäusen eine weniger ausgeprägte Schädigung der Nieren vorliegt, bzw. wie das erhöhte tubuläre Renin im Wildtyp seine progressionsfördernden Effekte vermittelt?

Es scheint eher unwahrscheinlich, dass das tubuläre Renin über eine Beeinflussung des zirkulierenden bzw. JG-Zell-Renins auf die diabetische Nephropathie einwirkt. Hier sollte, in Analogie zu den positiven Effekten der pharmakologischen RAS-Blockade, eine reduzierte Aktivität des zirkulierenden RAS nephroprotektiv wirken. Tatsächlich war, trotz stärkerer Nierenschäden, das systemische RAS bei den diabetischen Tubulus-Renin Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den Knockout-Tieren unterdrückt. Dies zeigte sich in der verminderten glomerulären Renin mRNA Expression und an der geringeren Konzentration an aktiven Renin in Tubulus-Renin WT Mäusen. Ähnliches konnte bereits bei Diabetikern und in diabetischen Tiermodellen beobachtet werden [135, 229, 285].

Weiter gegen eine direkte Auswirkung des systemischen Renins auf die renale Schädigung sprechen die erhöhten Plasmakonzentrationen an aktiven Renin in den diabetischen Tubulus-Renin Knockout-Mäusen. Trotz der doppelt so hohen Level an zirkulierendem Renin fielen die diabetischen Nierenschäden in den Tubulus-Renin KO Tieren deutlich geringer aus. Der Grund für die Hochregulation an aktiven Renin im Plasma der Knockout-Mäuse ist nicht bekannt. Nahe liegend wäre aber, dass das Fehlen von tubulärem Renin durch die Freisetzung von Renin aus den JG-Zellen kompensiert wird, es also zu einem Zusammenspiel beider Renin-Systeme kommt um so beispielsweise die Regulation des Blutdrucks zu gewährleisten. Im Diabetes könnten die hohen tubulären Reninspiegel lokal zu einer verstärkten Bildung von ANG II führen, welches wiederum die tubuläre Natrium-Rückresorption im distalen Tubulus und im Sammelrohr über den epithelialen Natriumkanal ENaC stimuliert [297, 298]. Die lokale Bildung von ANG II könnte also über diesen Mechanismus den Blutdruck erhöhen. Um dem Blutdruckanstieg entgegenzuwirken, sind bei

den Tubulus-Renin WT Mäusen die Konzentrationen an aktiven Renin im Plasma erniedrigt und so kann über die verringerten systemischen ANG II-Spiegel der Blutdruck wieder stabilisiert werden. Lokales und systemisches Renin-System scheinen also in Bezug auf die Einstellung des Blutdrucks im Diabetes eine funktionelle Einheit zu bilden. Es ist zu vermuten, dass dieses Zusammenspiel der beiden Renin-Systeme nur zu Beginn einer diabetischen Nierenerkrankung auftritt bzw. noch ausreichend funktionsfähig ist. Bei einer fortgeschrittenen klinisch manifesten diabetischen Nephropathie liegen bei 60% der Patienten erhöhte Blutdruckwerte vor [299].

Da wie oben beschrieben, trotz stärkerer Nierenschäden, das systemische RAS bei den diabetischen Tubulus-Renin Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den Knockout-Tieren unterdrückt war, rückte der ursprüngliche Gedanke, dass die Nierenschädigung im Diabetes über das systemische RAS ausgelöst wird, in den Hintergrund und der Fokus richtete sich mehr auf die Rolle des lokalen Gewebe-RAS. So wurde gezeigt, dass trotz normaler bzw. reduzierter Konzentration an aktiven Renin im Plasma, der Gehalt an intrarenalem Renin beim Diabetes erhöht ist [229] und somit vermutlich eine gegensätzliche Regulation des lokalen zum systemischen Systems vorliegt [134]. Ähnliches wurde bereits für ANG II-abhängige Hypertonusformen beschrieben. So hemmen hohe ANG II-Spiegel, zum Teil über den resultierenden Blutdruckanstieg, die Reninsynthese und -freisetzung in den reninbildenden JG-Zellen [29, 40]. Im Gegensatz dazu, wird lokal im Sammelrohr und im medullären Nierengewebe die Reninexpression durch hohe ANG II-Plasmakonzentrationen stimuliert [113, 114, 120-123]. *In vitro* Experimente zeigten, dass ANG II im Sammelrohr den AT1-Rezeptor aktiviert, was zu einer Proteinkinase C-vermittelten Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und der CREB-Phosphorylierung (cAMP-responsive element binding protein) führt. Über diesen Signalweg wird schließlich die Reninexpression stimuliert [300]. Eine ähnliche Regulation der lokalen Reninexpression könnte auch im Diabetes denkbar sein. Versuche zur Bestimmung der Angiotensin II-Plasmakonzentration in den Tubulus-Renin Mäusen waren bisher ohne Erfolg und müssten für das weitere Aufklären eines möglichen ANG II-beteiligten Wirkmechanismus noch erbracht werden.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des lokalen intrarenalen RAS ist das Prorenin, dessen Rolle vor allem beim Diabetes mellitus diskutiert wird. So steigt bei diabetischen Ratten nicht nur die Proreninkonzentration im Plasma an, sondern parallel dazu auch die Bildung von Prorenin im Sammelrohr [124]. Dies könnte insofern interessant sein, als auch bei Patienten mit Diabetes mellitus, v.a. bei denjenigen mit mikrovaskulären Komplikationen, erhöhte Proreninkonzentration im Plasma beschrieben wurden [245, 246, 301]. Dieser Befund konnte mit Hilfe des verwendeten Mausmodells bestätigt werden. In den diabetischen Tubulus-Renin Wildtypen war eine Verdopplung der Proreninkonzentration im Vergleich zum basalen Ausgangswert zu beobachten. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in den Werten des

Gewebe-Prorenins wieder. Sowohl im Kortex, als auch in der Medulla der Tubulus-Renin WT Mäuse, war der Gehalt an Prorenin acht Wochen nach der Induktion des Diabetes signifikant erhöht. Dieser Anstieg blieb in den Knockout-Tieren aus und lieferte somit einen Hinweis darauf, dass zwischen den Proreninspiegeln im Plasma und dem tubulären Renin-System beim Diabetes ein Zusammenhang besteht. Die Konzentration an aktiven Renin im Nierengewebe der Versuchstiere änderte sich nach der Induktion des Diabetes hingegen nicht.

Bei der Analyse des Gewebe-Prorenins und Renins kann eine Kontamination durch das im Blut enthaltene Prorenin und Renin nicht ausgeschlossen werden. Hier scheint, vor allem in der mit vielen Gefäßen durchzogenen Medulla, die Gefahr hoch zu sein. Die Analyse des Proreningehalts im Plasma spiegelte sich auch in den renalen Geweben wider. In den Tubulus-Renin Wildtypmäusen war nach Induktion des Diabetes ein deutlicher Anstieg des Prorenins sowohl im Plasma als auch im Kortex und der Papille zu erkennen. In den Knockout-Tieren bleibt dieser Anstieg jeweils aus. Für das aktive Renin ist jedoch ein völlig anderes Muster in Plasma und den Gewebeproben, v.a. im medullären Gewebe, zu erkennen. Da die beiden Werte für Renin und Prorenin jeweils aus denselben Proben entstanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass mögliche Kontaminationen aus dem Blut zu vernachlässigen sind.

Aus diesen Daten geht somit hervor, dass unter hyperglykämischen Bedingungen das lokale Renin-System tatsächlich aktiviert wird und diese Steigerung mit einer vermehrten Bildung und Freisetzung von inaktiven Prorenin einhergeht.

Des Weiteren war die Konzentration von aktiven Renin im Urin der diabetischen Tubulus-Renin Wildtypen deutlich erhöht. Im Vergleich dazu fiel die Reninausscheidung der diabetischen Knockout-Tiere viel geringer aus. Das im Urin detektierte Renin könnte Folge von glomerulärer Filtration sein, oder aber aus der lokalen tubulären Produktion stammen. Eine Filtration ist zwar durchaus denkbar, allerdings wird diese von einer nahezu vollständigen tubulären Reabsorption des Renins begleitet, wie bei Mäusen gezeigt wurde [302]. Erst bei einer stark beeinträchtigten glomerulären Filtrationsbarriere könnte die tubuläre Endozytosekapazität überschritten werden und filtrierte Renin in den Urin gelangen. Die glomeruläre Filtrationsbarriere war bei den Tubulus-Renin WT Mäusen im Vergleich zu den Knockout-Tieren geringfügig stärker geschädigt, was sich an der vermehrten Ausscheidung von Albumin zeigte. Es könnte also durchaus die Möglichkeit bestehen, dass in den Tubulus-Renin WT Mäusen auch mehr Renin filtrierte wurde. Da aber die Konzentrationen des aktiven Renins im Plasma der Wildtypen deutlich geringer ausfiel, als bei den Knockout-Mäusen, erscheint dieser Punkt eher unwahrscheinlich und es kann davon ausgegangen werden, dass das Renin im Urin lokal produziert wurde.

Im Gegensatz zum aktiven Renin, konnte kein Prorenin im Urin nachgewiesen werden. Angesichts der Tatsache, dass überwiegend Prorenin aus den distalen Nephronabschnitten freigesetzt wurde, war dieser Befund unerwartet. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Tubuluszellen auf ihrer tubulären Seite aktives Renin und auf der basolateralen Seite Prorenin freisetzen. Dieses Prorenin könnte dann über die peritubulären Kapillaren in das Blut und die systemische Zirkulation gelangen. Entsprechend wären die Proreninkonzentrationen im Plasma bei tubulärer Renindeletion vermindert, was zumindest im Diabetes ja auch der Fall ist. Die tubuläre Sekretion von aktiven Renin würde die erhöhte Reninkonzentration im Urin bei Wildtypmäusen erklären und würde zudem im Einklang mit der reduzierten Konzentration von aktiven Renin bei tubulärer Renindefizienz stehen. Neben einer gerichteten Sekretion von aktiven Renin und Prorenin könnte in das Tubuluslumen sezerniertes Prorenin vor seiner Ausscheidung auch durch tubuläre Proteasen in aktives Renin umgewandelt werden [303, 304].

Darüber hinaus stellt die Ausscheidung von Renin im Urin einen guten Indikator für die Aktivität des lokalen RAS, bzw. für den Therapieerfolg von RAS-Blockern in der Niere dar. Der medikamentöse Einsatz von Inhibitoren dieses Systems führte zu einer deutlichen Senkung der Reninausscheidung und dieser Effekt trat unabhängig von Veränderungen des Plasmarenins auf [301, 303, 305].

### **5.2.2 Mögliche Wirkungsmechanismen der gesteigerten lokalen Reninsynthese**

Wie genau das tubuläre Prorenin und Renin die Progression der diabetischen Nephropathie moduliert, wurde noch nicht endgültig geklärt, es könnten jedoch mindestens zwei Wirkungsmechanismen beteiligt sein:

Eine Möglichkeit ist, dass das tubuläre Renin zu einer erhöhten AT1-Rezeptor-Aktivierung führt. So könnte luminales Angiotensinogen, welches aus dem proximalen Tubulus stammt oder glomerulär filtriert wird [106, 108], durch das von den Sammelrohren und distalen Tubuli ins Lumen sezernierte Renin zu ANG I gespalten werden. Da auch das Angiotensin-Converting-Enzym im Tubulussystem der Niere exprimiert wird [125], könnte so lokal ANG II gebildet werden (Abb. 5.1). Über die Bindung an den AT1-Rezeptor fungiert ANG II nicht nur als Vasokonstriktor, sondern kann auch das Zellwachstum, Entzündung und Fibrose stimulieren [237, 238]. So kommt es zur Bildung von TNF- $\alpha$  [239], IL-6 [240], NF $\kappa$ B [241] und TGF- $\beta$  [242], also von Komponenten, die maßgeblich an renalen Entzündungsprozessen und der Fibrosierung bei chronischen Nierenerkrankungen beteiligt sind. Auf diese Weise wirkt ANG II zum einen als ein proinflammatorischer Mediator bei Nierenschäden, in dem es die



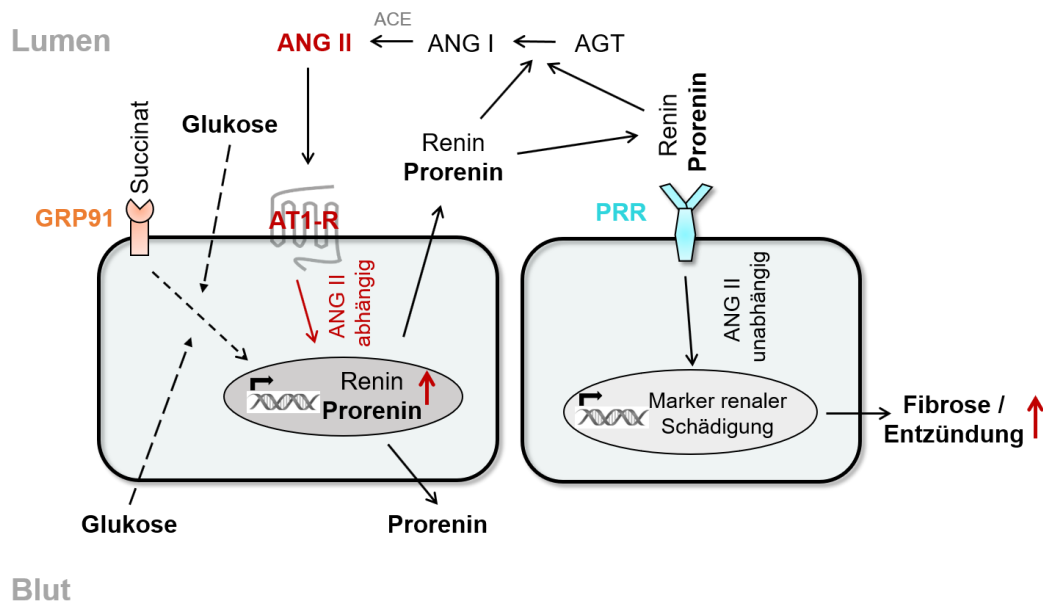
Infiltration von Entzündungszellen, wie Makrophagen und Lymphozyten in die Glomeruli und ins Interstitium fördert [306]. Zudem fungiert ANG II über die Wirkung von TGF- $\beta$  als Wachstumsfaktor für Mesangialzellen und erhöht die Expression und Synthese von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Laminin und Kollagenen [307]. Ein Prozess, der auch maßgeblich an der Entwicklung von Glomerulosklerose beteiligt ist. ANG II scheint auch bei der Entstehung der tubulointerstitiellen Fibrose eine Rolle zu spielen, in dem es die phänotypische Veränderung von Fibroblasten zu Myofibroblasten fördert. Diese aktivierten Fibroblasten proliferieren, dringen in die periglomerulären und peritubulären Räume ein und tragen so zur Matrixablagerung im tubulointerstitiellen Bereich bei [308, 309]. Aus *in vitro* Experimenten geht hervor, dass auch Tubuluszellen auf hohe ANG II-Spiegel reagieren und so beispielsweise im proximalen Tubulus eine Hypertrophie sowie eine erhöhte Synthese von extrazellulären Matrixproteinen verursachen können [310]. Darüber hinaus fördert ANG II über TGF- $\beta$  die epithelial-mesenchymale Transition von Sammelrohrzellen [311] und proximalen Tubuluszellen [312] zu Fibroblasten. ANG II ist außerdem an der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt, die als Hauptauslöser der diabetischen Komplikationen angesehen werden [26]. Als wichtigster Modulator der renalen NAD(P)H Oxidase, die in Mesangialzellen, proximalen Tubuluszellen, glatten Gefäßmuskelzellen, in Fibroblasten sowie in Podozyten identifiziert wurde, kann ANG II über deren Aktivierung intrazellulär die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  steigern und so renale Schäden verstärken [212]. Auf diese Weise ist ANG II in der Lage die Bildung von ROS in den Podozyten zu erhöhen und über TGF- $\beta$ -abhängige Signalwege zur Verdickung der glomerulären Basalmembran, Expansion des Mesangiums und schließlich zur Glomerulosklerose beizutragen [313].

Eine weitere Möglichkeit, wie das tubuläre Renin auf die Entstehung der diabetischen Nephropathie Einfluss nehmen könnte, ist über die Bindung an den PRR. Die Expression des PRR ist in diabetischen Ratten und Mäusen entlang des Nephrons erhöht [249, 314] und sowohl Prorenin als auch Renin können mit hoher Affinität gebunden werden [136]. Bis zur Entdeckung dieses Rezeptors im Jahr 2002 [136] wurde dem Prorenin als inaktiven Vorstufe von Renin keine große physiologische Bedeutung zugeschrieben. Das Vorhandensein von hohen Proreninspiegeln, zusammen mit einer erhöhten renalen PRR-Expression [249, 315] beim Diabetes, legten aber einen funktionellen Beitrag des PRR zur Entwicklung der diabetischen Nephropathie nahe. So kann Prorenin zum einen über die Bindung an den PRR aktiviert werden, die Umwandlung von Angiotensinogen zu ANG I katalysieren und lokal die ANG II-Synthese erhöhen, oder aber ANG II-unabhängige Effekte auslösen (Abb. 5.1). Wie Matavelli und Kollegen zeigten, kann so auch ohne die Beteiligung von ANG II die renale Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1  $\beta$  [249] beim Diabetes gesteigert werden und chronische Entzündungsprozesse weiter vorantreiben. Darüber

hinaus, kann über die Bindung an den PRR, eine Kaskade von intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen initiiert werden, einschließlich der Phosphorylierung von extrazellulärer signalregulierter Kinase (ERK) 1 und 2 [316] sowie einer gesteigerten Produktion von TGF- $\beta$  [250] und Matrixproteinen, die maßgeblich an der Fibrosierung bei diabetischen Nierenerkrankungen beteiligt sind [317]. Mit dem erfolgreichen Einsatz eines PRR-Blockers (auch genannt: handle region peptide HRP) wurde die Rolle dieses Rezeptors bei der Pathogenese der diabetischen Nephropathie noch weiter gefestigt. So führte die Blockade des PRR nicht nur zu einer Hemmung der Progression der Nephropathie [318, 319], sondern zu einer Regression der Glomerulosklerose und einer damit einhergehenden Verringerung der Albuminurie im diabetischen Tiermodell [320]. Die genaue Funktion des PRR im Zusammenhang mit chronischen Nierenerkrankungen wird jedoch noch immer kontrovers diskutiert [321]. In jüngeren Untersuchungen mit transgenen Versuchstieren tauchten einige Widersprüche bezüglich der Wirkung der PRR-Blockade mittels HRP auf. So konnte in diesen Studien kein nephroprotektiver, sondern ein potentiell schädigender Effekt von HRP in Kombination mit dem Renin-Inhibitor Aliskiren festgestellt werden [322, 323]. Auch Befunde aus *in vivo*-Studien stellen die Rolle der erhöhten Proreninlevel bei der Entstehung von renalen Schäden in Frage. Bei transgenen Ratten und Mäusen mit einer Überexpression von Prorenin und damit stark erhöhten Plasmaprorenin-Konzentrationen, über einen Zeitraum von 12 bzw. 18 Monaten, zeigten sich keine Blutdruck-unabhängigen (ANG II vermittelten) glomerulären Schädigung oder renale Läsionen [324, 325]. Diese Experimente fokussierten sich jedoch einzig auf den Effekt des erhöhten systemischen Prorenins und ließen die lokalen Gewebekonzentrationen an Prorenin völlig außer Acht. Womöglich wird aber ein Großteil der schädigenden Wirkung über das lokal erhöhte Renin-System gesteuert, welches nicht in der Zirkulation auftritt.

Ein weiteres Problem bei den bisher durchgeführten *in vitro*-Experimenten zum PRR, sind die verwendeten Konzentrationen von Prorenin. Für die lokale Bildung von ANG II, bzw. für das Auslösen intrazellulärer Signalwege wären Konzentrationen erforderlich, die in etwa 800-, bzw. 4000-fach höher sind, als die tatsächlichen Plasmakonzentrationen von Prorenin und Renin beim Menschen [326]. Diese liegen im physiologischen Zustand im pikomolaren Bereich [327]. Das wiederum wirft die Frage auf, ob die Prorenin- und Reninkonzentrationen stark genug ansteigen können, um mit dem PRR *in vivo* zu interagieren. Die detektierten Prorenin und Reninkonzentrationen im renalen Gewebe waren in der Tat höher als die im Plasma und nach der Induktion des Diabetes konnte zu dem noch ein weiterer Anstieg des Prorenins in Kortex und Medulla festgestellt werden. Somit könnte durchaus die Möglichkeit bestehen, dass ausreichend Prorenin und Renin lokal in der Niere akkumuliert, um über den PRR entweder die ANG II-Synthese oder MAPK-Signalwege zu stimulieren und so zu einer

lokalen Schädigung des Tubulussystems oder der glomerulären Filtrationsbarriere beizutragen.



**Abb. 5.1: Mögliche Wirkmechanismen von Prorenin, Renin und Angiotensin II (ANG II) im Sammelrohr beim Diabetes.** AT1-R: Angiotensin II Typ 1-Rezeptor, PRR: Prorenin Rezeptor, GPR91: Succinat Rezeptor.

Wie genau die Schäden in den diabetischen Tubulus-Renin Wildtyp-Mäusen an Hand der oben genannten möglichen Wirkungsmechanismen ausgelöst werden, konnte noch nicht geklärt werden. Die Schäden zeigten sich überwiegend am Glomerulus (Mesangiale Expansion und Verdickung der Basalmembran) und im peritubulären Kapillarsystem durch die Abnahme der Kapillardichte. Das Vorhandensein des PRR auf den Mesangialzellen und Podozyten [328] könnte eine mögliche Erklärung für die verstärkte glomeruläre Schädigung in den Tubulus-Renin WT Mäusen darstellen. Die hohen Proreninspiegel der Tubulus-Renin Wildtyp-Mäusen könnten an die PRR binden und wie bereits erwähnt intrazelluläre Signalwege aktivieren, die zur Schädigung der Podozyten beitragen oder die Proliferation der mesangialen Zellen fördern.

Eine Reduktion der peritubulären Kapillardichte findet sich in vielen progressiven Nierenerkrankungen [204] und auch in unseren diabetischen Tubulus-Renin WT Mäusen konnte mit Hilfe einer CD31-Färbung eine solche Abnahme festgestellt werden. Die Aufrechterhaltung peritubulären Mikrogefäße ist von Faktoren der vaskulären Regeneration und Angiogenese, wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) abhängig. Sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Tiermodellen chronischer Nierenerkrankung konnte eine Verminderung der VEGF-Expression im Nierengewebe gezeigt werden [329, 330]. Zusammenhänge zwischen dem Renin-Angiotensin-System und der Regulation von VEGF wurde bereits in einigen Studien beschrieben. Hier zeigte sich zum

einen, dass Renin und ANG II potente Stimulatoren für die Aufrechterhaltung von VEGF darstellen [331, 332]. Im Gegensatz dazu, konnte eine andere Arbeitsgruppe eine inhibitorische Wirkung von ANG II auf die Expression von VEGF in murinen Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife feststellen [333]. Eine klare Schlussfolgerung kann also aus diesen Befunden nicht gezogen werden, denkbar ist aber, dass sich das lokal aktivierte Renin-System über eine mögliche Erhöhung der ANG II-Spiegel auch negativ auf die VEGF-Expression und peritubuläre Kapillardichte der diabetischen Tubulus-Renin Wildtypen auswirken kann.

Um potentiellen Wirkungsweisen noch weiter nachzugehen, wurde eine Analyse der ANG II-Konzentrationen in den diabetischen Tubulus-Renin Mäusen sowohl im Plasma, als auch in den verschiedenen Nierenkompartimenten mit Hilfe eines ANG II-ELISAs und per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Leider waren die Ergebnisse aus den ELISA-Messungen nicht reproduzierbar und lieferten somit keine aussagekräftigen Daten. Auch die Messergebnisse aus der HPLC-Analyse konnten für die Arbeit nicht verwendet werden. In den renalen Gewebeproben fand sich eine Kontamination mit ANG II aus dem Blut wieder. Die Verabreichung einer definierten Menge an ANG II verdeutlichte diesen Befund und zeigte, dass vor allem die medullären Anteile der Niere erheblich von der Kontamination betroffen waren.

Die Bestimmung der ANG II-Konzentrationen steht somit noch aus und könnte weitere Einblicke in die Wirkungsweise des lokalen Renin-Systems unter hyperglykämischen Bedingungen ermöglichen und aufklären, ob die schädigenden Effekte tatsächlich auf eine vermehrte ANG II-Bildung zurückzuführen sind. Erhöhte ANG II-Konzentrationen, die auf der lokalen intrarenalen Bildung beruhen, könnten darüber hinaus eine Erklärung für die niedrigen Reninkonzentrationen im Plasma liefern und die gegensätzliche Regulation von systemischem und lokalem RAS beim Diabetes bestätigen.

Zusammengefasst konnte bis jetzt kein Wirkmechanismus identifiziert werden, der eine eindeutige Erklärung für die verstärkte Nierenschädigung, ausgelöst durch die Aktivierung des lokalen Renin-Systems im Sammelrohr und distalen Tubuli, liefert. Womöglich lassen sich die oben beschriebenen Wirkungsweisen auch nicht klar voneinander abgrenzen und der tatsächliche Effekt ist auf ein Zusammenwirken von hohen lokalen ANG II-Konzentrationen und der Induktion von intrazellulären Signalwegen über den PRR zurückzuführen.

### **5.2.3 Mögliche Ursachen für die gesteigerte lokale Reninsynthese**

Um der Frage weiter nachzugehen, was die Stimulation der Reninsynthese in den Sammelrohren und distalen Tubuli der Mäuse beim Diabetes auslöst, wurden Diurese-

Experimente, Versuche mit einem SGLT2 Blocker und *in vitro* Stimulationsversuche an einer Sammelrohrzelllinie durchgeführt.

Da als Nebeneffekt der Hyperglykämie häufig eine Polyurie und ein vermehrtes Durstgefühl auftreten [273], wurde bei unbehandelten Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Urinausscheidung über die Aufnahme von gesüßtem Wasser induziert. Die gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme und die damit einhergehende Polyurie hatten jedoch keinerlei Einfluss auf die Reninsynthese und -sekretion im Tubulussystem der Mäuse. Das erhöhte Urinvolumen, das in diesem Versuchsmodell unabhängig von der Hyperglykämie auftrat, konnte somit als Ursache für die gesteigerte Aktivität des lokalen RAS ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus liegt bei einem chronischen Diabetes auch häufig eine Glukosurie vor. Hier reicht die Kapazität des Natrium-Glukose-Cotransporters im proximalen Tubulus nicht aus, um die filtrierte Glukose im Primärharn wieder zurück ins Blut zu transportieren. Als Folge treten erhöhte Glukosekonzentrationen in den distalen Tubulusabschnitten der Niere auf, die anschließend mit dem Urin ausgeschieden werden [14]. Um zu überprüfen, ob die erhöhte Glukosekonzentration im distalen Tubulus und im Sammelrohr zu einer Aktivierung des lokalen Renin-Systems führt, wurde den Mäusen ein SGLT2-Blocker verabreicht. Aus Daten einer Micro-Array Analyse unserer Gruppe geht hervor, dass die Mäuse im Sammelrohr diverse Glukosetransporter exprimieren (SGLT 1, 9-12, GLUT 1,2), über die die erhöhte Glukose in die Zellen aufgenommen werden könnte um dort das lokale Renin-System zu steigern. Die in den Mäusen über Empagliflozin hervorgerufene Glukosurie, ohne weitere Nebenwirkungen eines Diabetes, hatte jedoch auch keinen signifikanten Effekt auf das lokale RAS. Weder auf mRNA Ebene noch immunhistochemisch konnte eine Erhöhung der Reninexpression detektiert werden. Lediglich bei den Proreninwerten im Plasma war nach 4 Wochen Empagliflozin ein leichter Trend zu erhöhten Werten zu erkennen. Der Effekt wurde nach weiteren vier Wochen Behandlung mit dem SGLT2 Blocker noch etwas deutlicher. Möglicherweise hätte eine längere Verabreichungsdauer einen noch stärkeren Effekt nach sich gezogen. Die im Lumen vorliegende hohe Glukosekonzentration in den distalen Tubuli kann daher momentan zumindest noch nicht gänzlich als eine mögliche Ursache der Aktivitätssteigerung des lokalen Renin-Systems ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten wurde der Hypothese nachgegangen, dass hohe Glukose-, bzw. Succinatkonzentrationen, wie sie für das diabetische Milieu charakteristisch sind, zu einer direkten Aktivierung des lokalen Renin-Systems im Sammelrohr führen. Die Arbeitsgruppe von Peti-Peterdi hatte bereits gezeigt, dass hohe Glukosespiegel das lokale RAS in der Niere auf indirektem Weg aktivieren können [334]. Die diabetesbedingte intratubuläre Anreicherung des Citrat-Zyklus Intermediats Succinat führt zu einer Aktivierung des G-Protein-gekoppelten metabolischen Rezeptors GRP91 (auch genannt Succinat Rezeptor 1, kurz Sucnr1) der Macula densa Zellen und über die resultierende Bildung von

PGE<sub>2</sub> zu einer gesteigerten Reninfreisetzung aus den JG-Zellen [74]. Das freigesetzte Renin trägt zu einer Erhöhung der zirkulierenden ANG II-Spiegel bei und kann, wie bereits beschrieben [113, 114, 120], das tubuläre Renin-System aktivieren. Da der GPR91 auch in den Sammelrohrzellen von Mäusen zu finden ist (ersichtlich aus Micro-Array Daten unserer Gruppe), könnte lokal über einen ähnlichen Mechanismus die Reninsynthese im Diabetes gesteigert werden (Abb. 5.1). Ein weiterer Anhaltspunkt dafür findet sich in diabetischen GPR91 Knockout-Mäusen. Die normalerweise bei diabetischen Mäusen vorliegenden erhöhten Werte von renalem und Plasma Prorenin scheinen hier aufgehoben zu sein [73]. Der GPR91 könnte somit eine indirekte Verbindung zwischen der Hyperglykämie und der Aktivierung des lokalen intrarenalen RAS darstellen [276-278]. Aus den Daten meiner Arbeit geht hervor, dass sowohl über die Zugabe von Glukose, als auch über eine erhöhte Menge an Succinat die Renin mRNA Expression in den verwendeten Sammelrohrzellen gesteigert werden konnte. Da jedoch die Stimulation bei Succinat deutlich stärker ausfiel, könnte man vermuten, dass der hier gezeigte Effekt ausschließlich über den GPR91-gekoppelten Weg abläuft. Die Glukose muss in der Zelle erst verstoffwechselt werden, bis sie schließlich im Mitochondrium zu Succinat umgewandelt werden kann. Wie viel von der eingesetzten Glukosemenge in den verwendeten Sammlerohrzellen auch wirklich zu Succinat wird, ist jedoch nicht klar. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Stimulationsstärke der beiden Komponenten darstellen. Eine Beteiligung des Succinat-Rezeptors an der Aktivierung des Sammelrohr-Renins scheint somit durchaus nahe zu liegen. Ein direkter Effekt der hohen Glukosekonzentrationen auf die Renin mRNA Expression, wie es zuvor auch schon in Podozytenzelllinien beschrieben wurde [275], könnte hier aber auch denkbar sein.

## 5 Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist zentral an der Regulation des Salz- und Wasserhaushalts des Körpers und des Blutdrucks beteiligt. Darüber hinaus spielt das RAS auch eine tragende Rolle bei der Nephrogenese. Beim Menschen können Mutationen in Genen, die für Komponenten des RAS-Systems kodieren zu schweren Entwicklungsstörungen der Niere führen, die häufig letal enden. Auch bei Mäusen mit genereller Deletion einzelner RAS-Komponenten treten ähnliche renale Veränderungen auf. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle des Sammelrohr-Renins während der Nierenentwicklung untersucht und mit Hilfe einer sammelrohrspezifischen Renin Knockout-Maus (Aqp2-Cre/Ren KO) der Frage nachgegangen, ob die durch generelle Deletion einzelner Komponenten des RAS induzierten morphologischen und funktionellen Veränderungen in der Niere auf das Sammelrohr-Renin zurückzuführen sind. Der Vergleich der Nierenmorphologie und der Nierenfunktion von Aqp2-Cre/Ren KO Mäusen mit ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (Aqp2-Cre/Ren WT) ergab jedoch keine auffälligen Unterschiede, so dass sich aus diesen Untersuchungen keine tragende Rolle des tubulären Renins für die Nierenentwicklung ableiten lässt.

Neben seiner physiologischen Funktion kommt dem RAS auch eine wesentliche Bedeutung bei Nierenerkrankungen, wie beispielsweise der diabetischen Nephropathie, zu. Es gibt erste Hinweise, dass bei dieser Erkrankung eine Aktivierung des lokalen renalen RAS vorliegt, die pathologische Effekte in der Niere auslösen kann und so die Entwicklung und Progression der diabetischen Nephropathie vorantreibt. Da eigene Voruntersuchungen an diversen Diabetesmodellen eine verstärkte Reninexpression in den distalen Tubulusabschnitten, vor allem im Sammelrohr, gezeigt hatten, wurde im zweiten Teil der Arbeit der Einfluss des tubulären Renins auf die renale Schädigung bei Diabetes mellitus mit Hilfe einer tubulusspezifischen Renin Knockout-Maus (Tubulus-Renin KO) untersucht. Acht Wochen nach Induktion des Diabetes wurde eine Aktivierung des lokalen Renin-Systems, erkennbar an einer erhöhten Renin mRNA Expression in Kortex und Medulla, zusammen mit erhöhten Proreninwerten im renalen Gewebe der Tubulus-Renin WT festgestellt. In den diabetischen Tubulus-Renin KO Tieren blieb dieser Anstieg aus. Parallel zu der gesteigerten lokalen Aktivität des Renin-Systems, konnten auch erhöhte Renin-Spiegel im Urin der diabetischen Tubulus-Renin WT detektiert werden. Da Renin im Urin der Knockout-Tiere in deutlich geringerem Ausmaß zu finden war, kann davon ausgegangen werden, dass der Ursprung in einer lokalen Produktion liegt. Darüber hinaus waren die Plasmapreninkonzentrationen nach der Induktion des Diabetes in den Tubulus-Renin WT Mäuse erniedrigt, ein Indiz dafür, dass das systemische RAS beim Diabetes gehemmt wird. Die im Vergleich zu den Knockout-Mäusen hohen Plasmaproreninlevel der diabetischen Tubulus-Renin Wildtypen, so wie die

erhöhten Gewebe-Konzentrationen des Prorenins sprechen dafür, dass das Prorenin bei dieser Erkrankung eine tragende Rolle spielt und der Tubulus eine wichtige Prorenin-Quelle im Diabetes darstellt. Neben der Aktivierung des lokalen Renin-Systems, wiesen die Tubulus-Renin WT Mäuse eine deutlich stärkere renale Schädigung im Vergleich zu den diabetischen Knockout-Tieren auf. Dies zeigte sich in den Wildtypen durch eine Expansion des glomerulären Mesangiums, einer geringeren Dichte an peritubulären Kapillaren, einer Verdickung der glomerulären Basalmembran und einer erhöhten Albuminurie.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit erstmalig, dass die lokale tubuläre Reninbildung für den bekannten Anstieg der Proreninkonzentration im Plasma verantwortlich ist und zudem einen wesentlichen progressionsfördernden Faktor bei der diabetischen Nierenerkrankung darstellt.



## 6 Literatur

1. Klinker, R., et al., *Lehrbuch der Physiologie*. Vol. 6th. ed. 2009: Georg Thieme Verlag
2. Schnermann, J.B. and S.I. Sayegh, *Kidney Physiology*. 1998: Lippincott-Raven.
3. Tisher CC. and M. KM., *Anatomy of the Kidney*, in *The Kidney*, Brenner B. and R. F., Editors. 1991. p. 3-75.
4. Bulger, R.E., et al., *Endothelial characteristics of glomerular capillaries in normal, mercuric chloride-induced, and gentamicin-induced acute renal failure in the rat*. *J Clin Invest*, 1983. **72**(1): p. 128-41.
5. Wartiovaara, J., et al., *Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(10): p. 1475-83.
6. Haraldsson, B., J. Nystrom, and W.M. Deen, *Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(2): p. 451-87.
7. Schmidt, R., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31 ed. 2010: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
8. Russo, L.M., et al., *The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states*. *Kidney Int*, 2007. **71**(6): p. 504-13.
9. Greten H., Rinninger F., and G. T., *Innere Medizin*. 2010: Georg Thieme Verlag
10. Marsenic, O., *Glucose control by the kidney: an emerging target in diabetes*. *Am J Kidney Dis*, 2009. **53**(5): p. 875-83.
11. Triplitt, C.L., *Understanding the kidneys' role in blood glucose regulation*. *Am J Manag Care*, 2012. **18**(1 Suppl): p. S11-6.
12. Wood, I.S. and P. Trayhurn, *Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins*. *Br J Nutr*, 2003. **89**(1): p. 3-9.
13. Abdul-Ghani, M.A., R.A. DeFronzo, and L. Norton, *Novel hypothesis to explain why SGLT2 inhibitors inhibit only 30-50% of filtered glucose load in humans*. *Diabetes*, 2013. **62**(10): p. 3324-8.
14. Vallon, V., et al., *SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(1): p. 104-12.
15. Christensen, E.I. and H. Birn, *Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **280**(4): p. F562-73.
16. Reilly, R.F. and D.H. Ellison, *Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(1): p. 277-313.
17. Biner, H.L., et al., *Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(4): p. 836-47.
18. Wilson, J.L., C.A. Miranda, and M.A. Knepper, *Vasopressin and the regulation of aquaporin-2*. *Clin Exp Nephrol*, 2013. **17**(6): p. 751-64.
19. Kwon, T.H., et al., *Aquaporins in the kidney*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(190): p. 95-132.
20. Ecelbarger, C.A., et al., *Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(5 Pt 2): p. F663-72.
21. Terris, J., et al., *Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(6 Pt 2): p. F775-85.
22. Garty, H. and L.G. Palmer, *Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation*. *Physiol Rev*, 1997. **77**(2): p. 359-96.
23. Loffing, J., et al., *Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **280**(4): p. F675-82.
24. Royaux, I.E., et al., *Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(7): p. 4221-6.

25. McDonough, A.A., *Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(4): p. R851-61.
26. Mehta, P.K. and K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2007. **292**(1): p. C82-C97.
27. Hackenthal, E., et al., *Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion*. Physiol Rev, 1990. **70**(4): p. 1067-1116.
28. Kurtz, A. and C. Wagner, *Cellular control of renin secretion*. J Exp Biol, 1999. **202**(Pt 3): p. 219-25.
29. Schweda, F. and A. Kurtz, *Regulation of renin release by local and systemic factors*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2011. **161**: p. 1-44.
30. Abel, K.J. and K.W. Gross, *Physical characterization of genetic rearrangements at the mouse renin loci*. Genetics, 1990. **124**(4): p. 937-47.
31. Dickinson, D.P., et al., *Evolution and variation of renin genes in mice*. Genetics, 1984. **108**(3): p. 651-67.
32. Sigmund, C.D. and K.W. Gross, *Structure, expression, and regulation of the murine renin genes*. Hypertension, 1991. **18**(4): p. 446-57.
33. Morris, B.J., *Molecular biology of renin. I: Gene and protein structure, synthesis and processing*. J Hypertens, 1992. **10**(3): p. 209-14.
34. Faust, P.L., J.M. Chirgwin, and S. Kornfeld, *Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues*. J Cell Biol, 1987. **105**(5): p. 1947-55.
35. Taugner, R., et al., *The fate of prorenin during granulopoiesis in epithelioid cells. Immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment*. Histochemistry, 1987. **86**(3): p. 249-53.
36. Schweda, F., et al., *Renin release*. Physiology (Bethesda), 2007. **22**: p. 310-9.
37. Pratt, R.E., et al., *Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(22): p. 7837-40.
38. Laframboise, M., et al., *Prorenin activation and prohormone convertases in the mouse As4.1 cell line*. Kidney Int, 1997. **51**(1): p. 104-9.
39. Jutras, I. and T.L. Reudelhuber, *Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells*. FEBS Lett, 1999. **443**(1): p. 48-52.
40. Castrop, H., et al., *Physiology of kidney renin*. Physiol Rev, 2010. **90**(2): p. 607-73.
41. Wagner, C. and A. Kurtz, *Regulation of renal renin release*. Current opinion in nephrology and hypertension, 1998. **7**(4): p. 437-441.
42. Scholz, H. and A. Kurtz, *Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfused kidney*. The Journal of clinical investigation, 1993. **91**(3): p. 1088-1094.
43. Carey, R.M., et al., *Biomechanical coupling in renin-releasing cells*. The Journal of clinical investigation, 1997. **100**(6): p. 1566-1574.
44. Ryan, M.J., K.W. Gross, and G. Hajduczuk, *Calcium-dependent activation of phospholipase C by mechanical distension in renin-expressing As4. 1 cells*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2000. **279**(4): p. E823-E829.
45. Wagner, C. and A. Kurtz, *Regulation of renal renin release*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1998. **7**(4): p. 437-41.
46. Schlatter, E., et al., *Macula densa cells sense luminal NaCl concentration via furosemide sensitive Na+2Cl-K+ cotransport*. Pflugers Arch, 1989. **414**(3): p. 286-90.
47. Lorenz, J.N., et al., *Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport*. Am J Physiol, 1991. **260**(4 Pt 2): p. F486-93.
48. Bell, P.D., et al., *Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4322-7.

49. Komlosi, P., et al., *Macula densa basolateral ATP release is regulated by luminal [NaCl] and dietary salt intake*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **286**(6): p. F1054-8.
50. Peti-Peterdi, J., et al., *Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(1): p. 76-82.
51. Singh, I., et al., *Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(6 Pt 2): p. F1027-37.
52. Friis, U.G., et al., *Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **289**(5): p. F989-97.
53. Kurtz, A. and C. Wagner, *Role of nitric oxide in the control of renin secretion*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1998. **275**(6): p. F849-F862.
54. Schnermann, J.B. and D.Z. Levine, *Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide*. *Annu Rev Physiol*, 2003. **65**: p. 501-29.
55. Churchill, P.C. and M.C. Churchill, *A1 and A2 adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1985. **232**(3): p. 589-594.
56. Amenta, F., et al., *Beta-adrenoceptors in the rat kidney*. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1983. **324**(2): p. 94-98.
57. Meister, B., et al., *Patterns of messenger RNA expression for adrenergic receptor subtypes in the rat kidney*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994. **268**(3): p. 1605-1611.
58. Boivin, V., et al., *Immunofluorescent imaging of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors in rat kidney*. *Kidney international*, 2001. **59**(2): p. 515-531.
59. Kurtz, A., J. Pfeilschifter, and C. Bauer, *Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane?* *Biochemical and biophysical research communications*, 1984. **124**(2): p. 359-366.
60. Vandongen, R., W.S. Peart, and G.W. Boyd, *Adrenergic stimulation of renin secretion in the isolated perfused rat kidney*. *Circulation Research*, 1973. **32**(2): p. 290-296.
61. Weinberger, M.H., W. Aoi, and D.P. Henry, *Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro*. *Circulation research*, 1975. **37**(3): p. 318-324.
62. Golin, R., et al., *Role of the renal nerves in the control of renin synthesis during different sodium intakes in the rat*. *J Hypertens*, 2001. **19**(7): p. 1271-7.
63. Holmer, S., et al., *Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(5 Pt 2): p. F738-45.
64. Castrop, H., et al., *General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(3): p. F518-24.
65. Hoherl, K., et al., *Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked*. *Pflugers Arch*, 2001. **442**(6): p. 821-7.
66. Schunkert, H., et al., *Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expressions by angiotensin II*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(5 Pt 1): p. E863-9.
67. Oliverio, M.I., et al., *Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1 Pt 2): p. F43-50.
68. Castrop, H., et al., *Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **286**(5): p. F848-57.
69. Friis, U., et al., *Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2005. **289**(5): p. F989-F997.
70. Schweda, F., et al., *Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2004. **287**(3): p. F427-F433.

71. Klar, J., H. Vitzthum, and A. Kurtz, *Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2004. **286**(2): p. F349-F355.
72. Vargas, S.L., et al., *Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release*. Journal of the American Society of Nephrology, 2009. **20**(5): p. 1002-1011.
73. Toma, I., et al., *Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney*. The Journal of clinical investigation, 2008. **118**(7): p. 2526-2534.
74. Vargas, S.L., et al., *Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release*. Journal of the American Society of Nephrology, 2009. **20**(5): p. 1002-1011.
75. Peti-Peterdi, J., et al., *Metabolic control of renin secretion*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2013. **465**(1): p. 53-58.
76. Todorov, V., et al., *Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits renin gene expression*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2002. **283**(5): p. R1046-R1051.
77. Jensen, B.L., et al., *Interleukin-1 inhibits renin gene expression in As4. 1 cells but not in native juxtaglomerular cells*. Pflügers Archiv, 1998. **436**(5): p. 673-678.
78. Petrovic, N., et al., *Downregulation of renin gene expression by interleukin-1*. Hypertension, 1997. **30**(2): p. 230-235.
79. Pan, L., et al., *Enhancer-dependent inhibition of mouse renin transcription by inflammatory cytokines*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2005. **288**(1): p. F117-F124.
80. Brown, R., et al., *Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2001. **281**(5): p. R1362-R1367.
81. Schweda, F., et al., *Blood Pressure-Dependent Inhibition of Renin Secretion Requires A1 Adenosine Receptors*. Hypertension, 2005. **46**(4): p. 780-786.
82. Sun, D., et al., *Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(17): p. 9983-9988.
83. Kurtz, A., et al., *Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986. **83**(13): p. 4769-4773.
84. Shi, S., et al., *Genetic disruption of atrial natriuretic peptide receptor-A alters renin and angiotensin II levels*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2001. **281**(4): p. F665-F673.
85. Schweda, F., et al., *Role of endothelins for the regulation of renal renin gene expression*. Journal of cardiovascular pharmacology, 2000. **36**(5 Suppl 1): p. S187-90.
86. Ryan, M., et al., *Endothelin-1 increases calcium and attenuates renin gene expression in As4. 1 cells*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2002. **283**(6): p. H2458-H2465.
87. Schliebe, N., et al., *V2 vasopressin receptor deficiency causes changes in expression and function of renal and hypothalamic components involved in electrolyte and water homeostasis*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2008. **295**(4): p. F1177-F1190.
88. Kurtz, A., *Renin release: sites, mechanisms, and control*. Annual review of physiology, 2011. **73**.
89. Grünberger, C., et al., *The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6*. Circulation research, 2006. **99**(11): p. 1197-1206.
90. Ortiz-Capisano, M., et al., *Adenylyl cyclase isoform v mediates renin release from juxtaglomerular cells*. Hypertension, 2007. **49**(3): p. 618-624.

91. Yukimura, T., et al., *Renal vascular effects of dilazep antagonized by 3-isobutyl-1-methyl-xanthine*. Journal of cardiovascular pharmacology, 1986. **8**(3): p. 649-655.
92. Friis, U., et al., *Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases*. Circulation research, 2002. **90**(9): p. 996-1003.
93. Cohen, Y., et al., *Where is the "inverting factor" in hormone secretion from parathyroid cells?* American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1997. **273**(3): p. E630.
94. Kurtz, A., et al., *Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors*. Am J Physiol, 1986. **250**(4 Pt 1): p. C563-71.
95. Ichihara, A., et al., *Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells*. European Journal of Endocrinology, 1995. **133**(5): p. 569-577.
96. Takagi, M., et al., *Endothelin: a new inhibitor of renin release*. Biochemical and biophysical research communications, 1988. **157**(3): p. 1164-1168.
97. Dongen, R. and W.S. Peart, *Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat*. British journal of pharmacology, 1974. **50**(1): p. 125-129.
98. Ortiz-Capisano, M.C., et al., *Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase*. Hypertension, 2007. **49**(1): p. 162-9.
99. Henrich, W.L., et al., *Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate as a mediator of inhibition of renin release*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1988. **255**(3): p. F474-F478.
100. Noble, A., et al., *Cyclic GMP-linked pathway for renin secretion*. Kidney international, 1994. **46**(6): p. 1588-1590.
101. Omori, K. and J. Kotera, *Overview of PDEs and their regulation*. Circulation research, 2007. **100**(3): p. 309-327.
102. Azevedo, M.F., et al., *Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs)*. Endocrine reviews, 2013. **35**(2): p. 195-233.
103. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. Physiol Rev, 2006. **86**(3): p. 747-803.
104. Kobori, H., et al., *The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease*. Pharmacol Rev, 2007. **59**(3): p. 251-87.
105. Urushihara, M. and S. Kagami, *Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the progression of renal disease*. Pediatr Nephrol, 2016.
106. Pohl, M., et al., *Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron*. J Biol Chem, 2010. **285**(53): p. 41935-46.
107. Matsusaka, T., et al., *Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(7): p. 1181-9.
108. Gociman, B., et al., *Expression of angiotensinogen in proximal tubule as a function of glomerular filtration rate*. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2153-60.
109. Nishiyama, A., et al., *Urinary angiotensinogen reflects the activity of intrarenal renin-angiotensin system in patients with IgA nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(1): p. 170-7.
110. Kobori, H. and M. Urushihara, *Augmented intrarenal and urinary angiotensinogen in hypertension and chronic kidney disease*. Pflugers Arch, 2013. **465**(1): p. 3-12.
111. Chen, M., et al., *Renin and renin mRNA in proximal tubules of the rat kidney*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 237-43.
112. Moe, O.W., et al., *Renin expression in renal proximal tubule*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 774-9.
113. Prieto-Carrasquero, M.C., et al., *Collecting duct renin is upregulated in both kidneys of 2-kidney, 1-clip goldblatt hypertensive rats*. Hypertension, 2008. **51**(6): p. 1590-6.
114. Prieto-Carrasquero, M.C., et al., *Enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats*. Hypertension, 2004. **44**(2): p. 223-9.

115. Prieto-Carrasquero, M.C., et al., *AT1 receptor-mediated enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **289**(3): p. F632-7.
116. Rohrwasser, A., et al., *Renin and kallikrein in connecting tubule of mouse*. *Kidney Int*, 2003. **64**(6): p. 2155-62.
117. Tank, J.E., W.L. Henrich, and O.W. Moe, *Regulation of glomerular and proximal tubule renin mRNA by chronic changes in dietary NaCl*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(6 Pt 2): p. F892-8.
118. Taugner, R., et al., *Vascular and tubular renin in the kidneys of mice*. *Histochemistry*, 1982. **75**(4): p. 473-84.
119. Rohrwasser, A., et al., *Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron*. *Hypertension*, 1999. **34**(6): p. 1265-74.
120. Gonzalez, A.A., et al., *Angiotensin II stimulates renin in inner medullary collecting duct cells via protein kinase C and independent of epithelial sodium channel and mineralocorticoid receptor activity*. *Hypertension*, 2011. **57**(3): p. 594-9.
121. Howard, C.G. and K.D. Mitchell, *Renal functional responses to selective intrarenal renin inhibition in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats with ANG II-dependent malignant hypertension*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. **302**(1): p. F52-9.
122. Liu, L., et al., *Increased renin excretion is associated with augmented urinary angiotensin II levels in chronic angiotensin II-infused hypertensive rats*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **301**(6): p. F1195-201.
123. Prieto, M.C., et al., *Reciprocal changes in renal ACE/ANG II and ACE2/ANG 1-7 are associated with enhanced collecting duct renin in Goldblatt hypertensive rats*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **300**(3): p. F749-55.
124. Kang, J.J., et al., *The collecting duct is the major source of prorenin in diabetes*. *Hypertension*, 2008. **51**(6): p. 1597-604.
125. Casarini, D.E., et al., *Angiotensin I-converting enzyme activity in tubular fluid along the rat nephron*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(3 Pt 2): p. F405-9.
126. Braam, B., et al., *Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(5 Pt 2): p. F891-8.
127. Seikaly, M.G., B.S. Arant, Jr., and F.D. Seney, Jr., *Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(4): p. 1352-7.
128. Navar, L.G. and A. Nishiyama, *Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? Current opinion in nephrology and hypertension*, 2004. **13**(1): p. 107-115.
129. van Kats, J.P., et al., *Intrarenal angiotensin II: interstitial and cellular levels and site of production*. *Kidney Int*, 2001. **60**(6): p. 2311-7.
130. Von Thun, A.M., et al., *Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic angiotensin II infusion*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(1 Pt 2): p. F120-8.
131. Zhuo, J.L. and X.C. Li, *New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II*. *Peptides*, 2011. **32**(7): p. 1551-65.
132. Shao, W., et al., *Activation of the renin-angiotensin system by a low-salt diet does not augment intratubular angiotensinogen and angiotensin II in rats*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **304**(5): p. F505-14.
133. Ingert, C., et al., *Effects of dietary salt changes on renal renin-angiotensin system in rats*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **283**(5): p. F995-1002.
134. Navar, L.G., *Intrarenal renin-angiotensin system in regulation of glomerular function*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2014. **23**(1): p. 38-45.
135. Price, D.A., et al., *The paradox of the low-renin state in diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(11): p. 2382-91.
136. Nguyen, G., et al., *Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(11): p. 1417-27.
137. Burckle, C. and M. Bader, *Prorenin and its ancient receptor*. *Hypertension*, 2006. **48**(4): p. 549-51.

138. Prieto-Carrasquero M.C., M.V.L., Botros F., Navar G.L. , *ProRenin/Renin Receptor is Expressed in the Collecting Duct of Normal Rat Kidney*. The FASEB Journal, 2008. **22**(1).
139. Yosypiv, I.V., *Prorenin receptor in kidney development*. *Pediatr Nephrol*, 2017. **32**(3): p. 383-392.
140. Batenburg, W.W., et al., *Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor*. *J Hypertens*, 2007. **25**(12): p. 2441-53.
141. Nabi, A.H., et al., *Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system*. *Int J Mol Med*, 2006. **18**(3): p. 483-8.
142. Derkx, F.H., et al., *Nonproteolytic "activation" of prorenin by active site-directed renin inhibitors as demonstrated by renin-specific monoclonal antibody*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(32): p. 22837-42.
143. Ichihara, A., et al., *Renin, prorenin and the kidney: a new chapter in an old saga*. *J Nephrol*, 2009. **22**(3): p. 306-11.
144. Advani, A., et al., *The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the kidney*. *Hypertension*, 2009. **54**(2): p. 261-9.
145. Breton, S. and D. Brown, *Regulation of luminal acidification by the V-ATPase*. *Physiology (Bethesda)*, 2013. **28**(5): p. 318-29.
146. Cruciat, C.M., et al., *Requirement of prorenin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling*. *Science*, 2010. **327**(5964): p. 459-63.
147. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(12): p. 767-79.
148. Oshima, Y., S. Morimoto, and A. Ichihara, *Roles of the (pro)renin receptor in the kidney*. *World J Nephrol*, 2014. **3**(4): p. 302-7.
149. Gribouval, O., et al., *Spectrum of mutations in the renin-angiotensin system genes in autosomal recessive renal tubular dysgenesis*. *Hum Mutat*, 2012. **33**(2): p. 316-26.
150. Lacoste, M., et al., *Renal tubular dysgenesis, a not uncommon autosomal recessive disorder leading to oligohydramnios: Role of the Renin-Angiotensin system*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2006. **17**(8): p. 2253-2263.
151. Ortmann, M., Querfeld, U., Stollorz, M. , *Renale tubuläre Dysgenese mit fetaler Nierenvenenthrombose*. *Der Pathologe*, 1995. **16**(2): p. 143-147.
152. Nagata, M., et al., *Nephrogenesis and renovascular development in angiotensinogen-deficient mice*. *Lab Invest*, 1996. **75**(5): p. 745-53.
153. Kihara, M., et al., *Genetic deficiency of angiotensinogen produces an impaired urine concentrating ability in mice*. *Kidney Int*, 1998. **53**(3): p. 548-55.
154. Esther Jr, C.R., et al., *Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1996. **74**(5): p. 953-965.
155. Niimura, F., et al., *Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(6): p. 2947-54.
156. Takahashi, N., et al., *Ren1c homozygous null mice are hypotensive and polyuric, but heterozygotes are indistinguishable from wild-type*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(1): p. 125-32.
157. Moreno, C., et al., *Creation and characterization of a renin knockout rat*. *Hypertension*, 2011. **57**(3): p. 614-9.
158. Tsuchida, S., et al., *Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(4): p. 755-60.
159. Gomez, R.A., V.F. Norwood, and A. Tufro-McReddie, *Development of the kidney vasculature*. *Microsc Res Tech*, 1997. **39**(3): p. 254-60.

160. Gomez, R.A. and V.F. Norwood, *Developmental consequences of the renin-angiotensin system*. Am J Kidney Dis, 1995. **26**(3): p. 409-31.
161. Hilgers, K.F., V.F. Norwood, and R.A. Gomez, *Angiotensin's role in renal development*. Semin Nephrol, 1997. **17**(5): p. 492-501.
162. Norwood, V.F., et al., *Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis*. Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 2): p. R662-8.
163. Iosipiv, I.V. and M. Schroeder, *A role for angiotensin II AT1 receptors in ureteric bud cell branching*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(2): p. F199-207.
164. Jones, C.A., et al., *Expression of murine renin genes during fetal development*. Mol Endocrinol, 1990. **4**(3): p. 375-83.
165. Sequeira Lopez, M.L., et al., *Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(2): p. F345-56.
166. Song, R., G. Preston, and I.V. Yosypiv, *Angiotensin II stimulates in vitro branching morphogenesis of the isolated ureteric bud*. Mech Dev, 2011. **128**(7-10): p. 359-67.
167. Yosypiv, I.V., *Renin-angiotensin system in ureteric bud branching morphogenesis: insights into the mechanisms*. Pediatr Nephrol, 2011. **26**(9): p. 1499-512.
168. Minuth, M., et al., *Renin immunocytochemistry of the differentiating juxtaglomerular apparatus*. Anat Embryol (Berl), 1981. **162**(2): p. 173-81.
169. Drukker, A., et al., *Intrarenal distribution of renin in the developing rabbit*. Pediatr Res, 1983. **17**(9): p. 762-5.
170. Carbone, G.M., et al., *Developmental changes in renin gene expression in ovine kidney cortex*. Am J Physiol, 1993. **264**(3 Pt 2): p. R591-6.
171. Gomez, R.A., et al., *Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney*. Am J Physiol, 1989. **257**(5 Pt 2): p. F850-8.
172. Taugner, C., et al., *Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney*. Histochemistry, 1979. **62**(1): p. 19-27.
173. Barajas, L. and E. Salido, *Juxtaglomerular apparatus and the renin-angiotensin system*. Lab Invest, 1986. **54**(4): p. 361-4.
174. Castrop, H., et al., *Reporter gene recombination in juxtaglomerular granular and collecting duct cells by human renin promoter-Cre recombinase transgene*. Physiol Genomics, 2006. **25**(2): p. 277-85.
175. Sequeira Lopez, M.L., et al., *Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened*. Dev Cell, 2004. **6**(5): p. 719-28.
176. Chen, L., et al., *Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein G $\alpha$  in juxtaglomerular cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(1): p. F27-37.
177. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
178. WorldHealthOrganization, *Global report on diabetes*. 2016: <http://www.who.int>, ISBN 978 92 4 156525 7 (NLM classification: WK 810).
179. Federation, I.D., *IDF Diabetes Atlas*. 2017: [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org), ISBN: 978-2-930229-87-4.
180. Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), d.D.D.-H., *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2017 - Die Bestandsaufnahme*. 2017.
181. Gale, E.A., *Type 1 diabetes in the young: the harvest of sorrow goes on*. Diabetologia, 2005. **48**(8): p. 1435-8.
182. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
183. Smith, M.J., K.M. Simmons, and J.C. Cambier, *B cells in type 1 diabetes mellitus and diabetic kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(11): p. 712-720.
184. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, *Type 1 diabetes*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 69-82.



185. Ahmed, N., *Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. **67**(1): p. 3-21.
186. Gross, J.L., et al., *Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment*. Diabetes Care, 2005. **28**(1): p. 164-76.
187. Hasslacher, C., et al., *Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus*. Nephrol Dial Transplant, 1989. **4**(10): p. 859-63.
188. Kramer, A., et al., *Renal replacement therapy in Europe: a summary of the 2013 ERA-EDTA Registry Annual Report with a focus on diabetes mellitus*. Clin Kidney J, 2016. **9**(3): p. 457-69.
189. Eckardt, K.U., et al., *Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden*. Lancet, 2013. **382**(9887): p. 158-69.
190. Saran R, R.B., Abbott KC, et al., *US Renal Data System 2017 Annual Data Report: epidemiology of kidney disease in the United States*. Am J Kidney Dis, 2017. **69**(3 (Suppl 1)): p. 1-633.
191. Najafian, B., C.E. Alpers, and A.B. Fogo, *Pathology of human diabetic nephropathy*. Contrib Nephrol, 2011. **170**: p. 36-47.
192. Mogensen, C.E., *Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy*. Kidney Int, 1987. **31**(2): p. 673-89.
193. Deferrari, G., et al., *Diabetic nephropathy: from micro- to macroalbuminuria*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13 Suppl 8**: p. 11-5.
194. Marshall, C.B., *Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic?* Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(5): p. F831-F843.
195. Osterby, R. and H.J. Gundersen, *Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities*. Diabetologia, 1975. **11**(3): p. 225-9.
196. Najafian, B. and M. Mauer, *Morphologic features of declining renal function in type 1 diabetes*. Semin Nephrol, 2012. **32**(5): p. 415-22.
197. Drummond, K., M. Mauer, and G. International Diabetic Nephropathy Study, *The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1580-7.
198. Steffes, M.W., et al., *Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients*. Kidney Int, 2001. **59**(6): p. 2104-13.
199. Pagtalunan, M.E., et al., *Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes*. J Clin Invest, 1997. **99**(2): p. 342-8.
200. Wolf, G., S. Chen, and F.N. Ziyadeh, *From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1626-34.
201. Fogo, A.B., *The targeted podocyte*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2142-5.
202. Choi, Y.J., et al., *Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor*. Hum Pathol, 2000. **31**(12): p. 1491-7.
203. Eardley, K.S., et al., *The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease*. Kidney Int, 2008. **74**(4): p. 495-504.
204. Babickova, J., et al., *Regardless of etiology, progressive renal disease causes ultrastructural and functional alterations of peritubular capillaries*. Kidney Int, 2017. **91**(1): p. 70-85.
205. Auinger, M., et al., *Diabetische Nephropathie – Update 2012*. Wiener klinische Wochenschrift, 2012. **124**(2): p. 42-49.
206. Yacoub, R. and K.N. Campbell, *Inhibition of RAS in diabetic nephropathy*. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2015. **8**: p. 29-40.
207. Hsueh, W.A. and K. Wyne, *Renin-Angiotensin-aldosterone system in diabetes and hypertension*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2011. **13**(4): p. 224-37.
208. Group, S.R., et al., *A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control*. N Engl J Med, 2015. **373**(22): p. 2103-16.

209. Ruggenenti, P., et al., *Preventing Microalbuminuria in Type 2 Diabetes*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(19): p. 1941-1951.
210. Wanner, C., et al., *Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes*. New England Journal of Medicine, 2016. **375**(4): p. 323-334.
211. Cao, Z. and M.E. Cooper, *Pathogenesis of diabetic nephropathy*. J Diabetes Investig, 2011. **2**(4): p. 243-7.
212. Kashiwara, N., et al., *Oxidative stress in diabetic nephropathy*. Curr Med Chem, 2010. **17**(34): p. 4256-69.
213. Kowaltowski, A.J., et al., *Mitochondria and reactive oxygen species*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(4): p. 333-43.
214. Addabbo, F., M. Montagnani, and M.S. Goligorsky, *Mitochondria and reactive oxygen species*. Hypertension, 2009. **53**(6): p. 885-892.
215. Kiritoshi, S., et al., *Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy*. Diabetes, 2003. **52**(10): p. 2570-7.
216. Gill, P.S. and C.S. Wilcox, *NADPH oxidases in the kidney*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1597-607.
217. Asaba, K., et al., *Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2005. **67**(5): p. 1890-8.
218. Forbes, J.M., et al., *Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S254-8.
219. Greene, D.A., S.A. Lattimer, and A.A. Sima, *Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications*. N Engl J Med, 1987. **316**(10): p. 599-606.
220. Sharma, K., et al., *Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth factor-beta1 correlates with long-term renoprotection in insulin-dependent diabetic patients*. Am J Kidney Dis, 1999. **34**(5): p. 818-23.
221. Yamamoto, T., et al., *Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1814-8.
222. Hostetter, T.H., J.L. Troy, and B.M. Brenner, *Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus*. Kidney Int, 1981. **19**(3): p. 410-5.
223. Zatz, R., et al., *Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(17): p. 5963-7.
224. Anderson, S., et al., *Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass*. J Clin Invest, 1985. **76**(2): p. 612-9.
225. Zatz, R., et al., *Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension*. J Clin Invest, 1986. **77**(6): p. 1925-30.
226. Brenner, B.M., et al., *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 861-9.
227. Lewis, E.J., et al., *Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 851-60.
228. Parving, H.H., et al., *The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 870-8.
229. Anderson, S., F.F. Jung, and J.R. Ingelfinger, *Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations*. Am J Physiol, 1993. **265**(4 Pt 2): p. F477-86.
230. Correa-Rotter, R., T.H. Hostetter, and M.E. Rosenberg, *Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus*. Kidney international, 1992. **41**(4): p. 796-804.
231. Jaffa, A., et al., *Effects of diabetes and insulin on expression of kallikrein and renin genes in the kidney*. Kidney international, 1992. **41**(4): p. 789-795.
232. Carey, R.M. and H.M. Siragy, *The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2003. **14**(6): p. 274-281.

233. Burden, A.C. and H. Thurston, *Plasma renin activity in diabetes mellitus*. Clinical Science, 1979. **56**(3): p. 255-259.
234. Remuzzi, G., et al., *The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease*. Kidney Int Suppl, 2005(99): p. S57-65.
235. Tylicki, L., S. Lizakowski, and B. Rutkowski, *Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for nephroprotection: current evidence and future directions*. J Nephrol, 2012. **25**(6): p. 900-10.
236. Yoshioka, T., et al., *Role of abnormally high transmural pressure in the permselectivity defect of glomerular capillary wall: a study in early passive Heymann nephritis*. Circ Res, 1987. **61**(4): p. 531-8.
237. Ruiz-Ortega, M., et al., *Proinflammatory actions of angiotensins*. Current opinion in nephrology and hypertension, 2001. **10**(3): p. 321-329.
238. Mezzano, S., M. Ruiz-Ortega, and J. Egido, *Angiotensin II and renal fibrosis*. Hypertension, 2001. **38**(3): p. 635-638.
239. Siragy, H.M., et al., *The Angiotensin II Type 1 Receptor Mediates Renal Interstitial Content of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Diabetic Rats*. Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2229-2233.
240. Nakamura, A., E. Johns, and T. Kohsaka, *Effect of  $\beta$ 2-adrenoceptor activation and angiotensin II on tumour necrosis factor and interleukin 6 gene transcription in the rat renal resident macrophage cells*. Cytokine, 1999. **11**(10): p. 759-765.
241. Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II activates nuclear transcription factor  $\kappa$ B through AT1 and AT2 in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms*. Circulation research, 2000. **86**(12): p. 1266-1272.
242. Border, W.A. and N.A. Noble, *Interactions of transforming growth factor- $\beta$  and angiotensin II in renal fibrosis*. Hypertension, 1998. **31**(1): p. 181-188.
243. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
244. Deinum, J., et al., *Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetologia, 1999. **42**(8): p. 1006-10.
245. Wilson, D.M. and J.A. Luetscher, *Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1990. **323**(16): p. 1101-6.
246. Luetscher, J.A., et al., *Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications*. N Engl J Med, 1985. **312**(22): p. 1412-7.
247. Danser, A.H. and J. Deinum, *Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor*. Hypertension, 2005. **46**(5): p. 1069-76.
248. Ichihara, A., et al., *Involvement of receptor-bound prorenin in development of nephropathy in diabetic db/db mice*. J Am Soc Hypertens, 2008. **2**(5): p. 332-40.
249. Matavelli, L.C., J. Huang, and H.M. Siragy, *(Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(3): p. 277-82.
250. Kaneshiro, Y., et al., *Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro) renin receptor-transgenic rats*. Journal of the American Society of Nephrology, 2007. **18**(6): p. 1789-1795.
251. Ichihara, A., et al., *Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin*. J Clin Invest, 2004. **114**(8): p. 1128-35.
252. Ichihara, A., et al., *Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(7): p. 1950-61.
253. Reudelhuber, T.L., *The interaction between prorenin, renin and the (pro) renin receptor: time to rethink the role in hypertension*. Current opinion in nephrology and hypertension, 2012. **21**(2): p. 137-141.

254. Trepiccione, F., et al., *Renal Atp6ap2/(pro) renin receptor is required for normal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase function but not for the renin-angiotensin system*. Journal of the American Society of Nephrology, 2016: p. ASN. 2015080915.
255. Muzumdar, M.D., et al., *A global double-fluorescent Cre reporter mouse*. Genesis, 2007. **45**(9): p. 593-605.
256. Traykova-Brauch, M., et al., *An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice*. Nat Med, 2008. **14**(9): p. 979-84.
257. Glenn, S.T., et al., *In vivo analysis of key elements within the renin regulatory region*. Physiol Genomics, 2008. **35**(3): p. 243-53.
258. Hudkins, K.L., et al., *BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(9): p. 1533-42.
259. Kranz, A., et al., *An improved Flp deleter mouse in C57Bl/6 based on Flpo recombinase*. Genesis, 2010. **48**(8): p. 512-20.
260. Sauer, B., *Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(6): p. 2087-96.
261. Nagy, A., *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 99-109.
262. Walther, C., et al., *Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes*. Genomics, 1991. **11**(2): p. 424-34.
263. Plachov, D., et al., *Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland*. Development, 1990. **110**(2): p. 643-51.
264. Poleev, A., et al., *PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors*. Development, 1992. **116**(3): p. 611-623.
265. Foster, T.J., T.G. Howe, and K.M. Richmond, *Translocation of the tetracycline resistance determinant from R100-1 to the Escherichia coli K-12 chromosome*. J Bacteriol, 1975. **124**(3): p. 1153-8.
266. Engelhardt, J. and W. Knebel, *Konfokale Laserscanning-Mikroskopie*. Physik in unserer Zeit, 1993. **24**(2): p. 70-78.
267. Takacs-Jarrett, M., et al., *Morphological and functional characterization of a conditionally immortalized collecting tubule cell line*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 2): p. F802-11.
268. Ranheim T1, D.C., Schueler KL, Cartee GD, Attie AD., *Interaction between BTBR and C57BL/6J genomes produces an insulin resistance syndrome in (BTBR x C57BL/6J) F1 mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 1997. **17**(11): p. 3286-3293.
269. Clee, S.M., S.T. Nadler, and A.D. Attie, *Genetic and genomic studies of the BTBR ob/ob mouse model of type 2 diabetes*. Am J Ther, 2005. **12**(6): p. 491-8.
270. Duncan, G.S., et al., *Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 3022-30.
271. Ramkumar, N., et al., *Overexpression of Renin in the collecting duct causes elevated blood pressure*. Am J Hypertens, 2013. **26**(8): p. 965-72.
272. Ramkumar, N., et al., *Collecting duct-specific knockout of renin attenuates angiotensin II-induced hypertension*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **307**(8): p. F931-8.
273. Katsarou, A., et al., *Type 1 diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17016.
274. Wright, E.M., *Glucose transport families SLC5 and SLC50*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 183-96.
275. Durvasula, R.V. and S.J. Shankland, *Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(4): p. F830-9.
276. He, W., et al., *Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors*. Nature, 2004. **429**(6988): p. 188-93.
277. Toma, I., et al., *Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2526-34.

278. Peti-Peterdi, J., et al., *Metabolic control of renin secretion*. Pflugers Arch, 2013. **465**(1): p. 53-8.
279. Xing, L., et al., *Ontogeny of the mammalian kidney: expression of aquaporins 1, 2, 3, and 4*. World Journal of Pediatrics, 2014. **10**(4): p. 306-312.
280. Martinovic, J., et al., *Fetal toxic effects and angiotensin-II-receptor antagonists*. The Lancet, 2001. **358**(9277): p. 241-242.
281. Pryde, P., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy*. Journal of the American Society of Nephrology, 1993. **3**(9): p. 1575-1582.
282. Gribouval, O., et al., *Spectrum of mutations in the renin-angiotensin system genes in autosomal recessive renal tubular dysgenesis*. Human mutation, 2012. **33**(2): p. 316-326.
283. Mahieu-Caputo, D., et al., *Twin-to-twin transfusion syndrome: role of the fetal renin-angiotensin system*. The American journal of pathology, 2000. **156**(2): p. 629-636.
284. Ramkumar, N. and D.E. Kohan, *Role of the Collecting Duct Renin Angiotensin System in Regulation of Blood Pressure and Renal Function*. Curr Hypertens Rep, 2016. **18**(4): p. 29.
285. Vallon, V., L.M. Wead, and R.C. Blantz, *Renal hemodynamics and plasma and kidney angiotensin II in established diabetes mellitus in rats: effect of sodium and salt restriction*. J Am Soc Nephrol, 1995. **5**(10): p. 1761-7.
286. Tojo, A., et al., *A local renal renin-angiotensin system activation via renal uptake of prorenin and angiotensinogen in diabetic rats*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2016. **9**: p. 1-10.
287. Yokosawa, H., et al., *Human renal renin. Complete purification and characterization*. Journal of Biological Chemistry, 1980. **255**(8): p. 3498-3502.
288. Taugner, R., et al., *Vascular and tubular renin in the kidneys of mice*. Histochemistry, 1982. **75**(4): p. 473-484.
289. Taugner, R., et al., *Immunocytochemistry of the renin-angiotensin system: renin, angiotensinogen, angiotensin I, angiotensin II, and converting enzyme in the kidneys of mice, rats, and tree shrews*. Kidney International Supplement, 1982(12).
290. Nguyen, G. and A.H. Danser, *Prorenin and (pro) renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents*. Experimental physiology, 2008. **93**(5): p. 557-563.
291. Kurtz, A., *Endocrine functions of the renal interstitium*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2017. **469**(7-8): p. 869-876.
292. Kurt, B., et al., *Control of renin secretion from kidneys with renin cell hyperplasia*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2013. **306**(3): p. F327-F332.
293. Kurtz, A., *Control of renin synthesis and secretion*. American journal of hypertension, 2012. **25**(8): p. 839-847.
294. Berg, A.C., et al., *Pericytes synthesize renin*. World journal of nephrology, 2013. **2**(1): p. 11.
295. Wenger, R. and A. Kurtz, *Erythropoietin*. Comprehensive Physiology, 2011.
296. Haraldsson, B., J. Nyström, and W. Deen, *Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria*. Physiological reviews, 2008. **88**(2): p. 451-487.
297. Peti-Peterdi, J., D. Warnock, and P.D. Bell, *Angiotensin II directly stimulates ENaC activity in the cortical collecting duct via AT1 receptors*. Journal of the American Society of Nephrology, 2002. **13**(5): p. 1131-1135.
298. Wang, T. and G. Giebisch, *Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1996. **271**(1): p. F143-F149.
299. Mogensen, C.E., C.K. Christensen, and E. Vittinghus, *The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy*. Diabetes, 1983. **32 Suppl 2**: p. 64-78.
300. Gonzalez, A.A., et al., *PKC- $\alpha$ -dependent augmentation of cAMP and CREB phosphorylation mediates the angiotensin II stimulation of renin in the collecting duct*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2015. **309**(10): p. F880-F888.

301. van den Heuvel, M., et al., *Urinary renin, but not angiotensinogen or aldosterone, reflects the renal renin–angiotensin–aldosterone system activity and the efficacy of renin–angiotensin–aldosterone system blockade in the kidney*. *Journal of hypertension*, 2011. **29**(11): p. 2147-2155.
302. Mazanti, I., et al., *Ultrafiltration of renin in the mouse kidney studied by inhibition of tubular protein reabsorption with lysine*. *Clinical science (London, England: 1979)*, 1988. **75**(3): p. 331-336.
303. Roksnoer, L., et al., *Urinary markers of intrarenal renin-angiotensin system activity in vivo*. *Current hypertension reports*, 2013. **15**(2): p. 81-88.
304. Roksnoer, L.C., et al., *On the Origin of Urinary Renin: A Translational Approach*. *Hypertension*, 2016. **67**(5): p. 927-33.
305. Kobori, H., et al., *Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension*. *Hypertension*, 2003. **41**(1): p. 42-9.
306. Muller, D., et al., *Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage*. *The American journal of pathology*, 2002. **161**(5): p. 1679-1693.
307. Egido, J., *Vasoactive hormones and renal sclerosis*. *Kidney international*, 1996. **49**(2): p. 578-597.
308. Johnson, R.J., et al., *Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension*. *Hypertension*, 1992. **19**(5): p. 464-474.
309. Desmoulière, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. *The Journal of cell biology*, 1993. **122**(1): p. 103-111.
310. Wolf, G., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta*. *The Journal of clinical investigation*, 1993. **92**(3): p. 1366-1372.
311. Ivanova, L., M. Butt, and D. Matsell, *Mesenchymal transition in kidney collecting duct epithelial cells*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2008. **294**(5): p. F1238-F1248.
312. Zhou, L., H. Xue, and L.M. Lu, *Angiotensin AT1 receptor activation mediates high glucose-induced epithelial–mesenchymal transition in renal proximal tubular cells*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2010. **37**(9).
313. Lee, H., *Pathogenic role of TGF- $\beta$  in the progression of podocyte diseases*. *Histol Histopathol*, 2011. **26**(1): p. 107S116.
314. Ichihara, A., et al., *Involvement of receptor-bound prorenin in development of nephropathy in diabetic db/db mice*. *Journal of the American Society of Hypertension*, 2008. **2**(5): p. 332-340.
315. Takahashi, K., et al., *Expression of (pro) renin receptor in human kidneys with end-stage kidney disease due to diabetic nephropathy*. *Peptides*, 2010. **31**(7): p. 1405-1408.
316. Sakoda, M., et al., *(Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells*. *Hypertens Res*, 2007. **30**(11): p. 1139-46.
317. Huang, Y., et al., *Renin increases mesangial cell transforming growth factor- $\beta$ 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms*. *Kidney international*, 2006. **69**(1): p. 105-113.
318. Ichihara, A., et al., *Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor–deficient mice*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2006. **17**(7): p. 1950-1961.
319. Ichihara, A., et al., *Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the “handle” region for nonproteolytic activation of prorenin*. *The Journal of clinical investigation*, 2004. **114**(8): p. 1128-1135.
320. Takahashi, H., et al., *Regression of nephropathy developed in diabetes by (Pro) renin receptor blockade*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007. **18**(7): p. 2054-2061.
321. Campbell, D.J. and J. Duncan, *Critical review of prorenin and (pro) renin receptor research*. *Hypertension*, 2008. **51**(5): p. 1259-1264.

322. Batenburg, W.W., et al., *The (pro) renin receptor blocker handle region peptide upregulates endothelium-derived contractile factors in aliskiren-treated diabetic transgenic (mREN2) 27 rats*. Journal of hypertension, 2013. **31**(2): p. 292-302.
323. te Riet, L., et al., *Deterioration of kidney function by the (pro) renin receptor blocker handle region peptide in aliskiren-treated diabetic transgenic (mRen2) 27 rats*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2014. **306**(10): p. F1179-F1189.
324. Campbell, D.J., et al., *Prorenin contributes to angiotensin peptide formation in transgenic rats with rat prorenin expression targeted to the liver*. Hypertension, 2009. **54**(6): p. 1248-1253.
325. Mercure, C., G. Prescott, and T.L. Reudelhuber, *Chronic increases in circulating prorenin are not associated with renal or cardiac pathologies*. Hypertension, 2009. **53**(6): p. 1062-1069.
326. Batenburg, W.W., et al., *Renin-and prorenin-induced effects in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro) renin receptor: does (pro) renin-(pro) renin receptor interaction actually occur?* Hypertension, 2011. **58**(6): p. 1111-1119.
327. Danser, A.H., et al., *Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro) renin levels in humans*. Journal of hypertension, 1998. **16**(6): p. 853-862.
328. Ichihara, A., et al., *Involvement of (pro) renin receptor in the glomerular filtration barrier*. Journal of Molecular Medicine, 2008. **86**(6): p. 629-635.
329. Kang, D.H., et al., *Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(7): p. 1434-47.
330. Baelde, H.J., et al., *Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss*. Kidney Int, 2007. **71**(7): p. 637-45.
331. Wolf, G. and F.N. Ziyadeh, *Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy*. Nephron Physiology, 2007. **106**(2): p. p26-p31.
332. GRUDEN, G., S. THOMAS, and G. VIBERTI, *Interaction of angiotensin II and mechanical stretch on vascular endothelial growth factor production by human mesangial cells*. Journal of the American Society of Nephrology, 1999. **10**(4): p. 730-737.
333. Kang, D.H., et al., *Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1*. Journal of the American Society of Nephrology, 2001. **12**(7): p. 1434-1447.
334. Peti-Peterdi, J., *High glucose and renin release: the role of succinate and GPR91*. Kidney international, 2010. **78**(12): p. 1214-1217.

## 8 Anhang

### 8.1 Materialien und Geräte

#### Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Deckgläser	Hartenstein
Einbettkassetten	Hartenstein
Reaktionsgefäß/Cups (0,2 - 2,0 ml)	Sarstedt, Nerbe
Fettstift PAP (ISH)	Vector Laboratories
Fettstift Immedge	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Falcon-Röhrchen (15 - 50 ml)	Sarstedt, Nerbe
Glaswaren	Roth
Insulinspritzen micro fine 0,5 ml	BD, Medishop
Kanülen, versch. Größen	BD, Medishop
Kapillaren, diverse	Hirschmann Laborgeräte
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche
Mikrotomklingen	Leica
Objektträger „Super Frost Plus“	Hartenstein
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen, mit und ohne Filter	Sarstedt, Nerbe
Skalpellklingen	Heinz Herenz
Serologische Pipetten (5 - 25 ml)	Sarstedt
Zellkulturplatte 6-Well	Sarstedt
Zellkulturflaschen T-75	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt

#### Reagenzien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Accu-Chek Sensor Teststreifen	Roche
AESBF	Sigma-Aldrich
Agarose	BioSell
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich
BSA	PAN-Biotech
Chloroform	Merck
Collagenase Typ II (Worthington)	Cellsystems GmbH
Critoseal	Leica
Dako Mounting Medium	Dako
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka
DePeX Mounting Medium	Serva Elektrophoresis
Dexamethason	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (anhydrous)	Sigma-Aldrich
DMEM low glucose GlutaMAX™ Supplement	Thermo Fisher
DNA Maker 100 bp	Nippon



DNA Marker 50 bp	Nippon
Doxycyclin	AppliChem
DPBS (no calcium, no magnesium)	Thermo Fisher
Eisessig	Merck
Empagliflozin	Biomol
Eosin	Merck
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
First Strand Buffer (5 x)	Invitrogen
FBS	PAN-Biotech
Formalin (37-40 %)	Sigma-Aldrich
Gill's Hämatoxylin	Merck
Glukose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Merck
Glykogen	Sigma-Aldrich
Go Taq G2 DNA Polymerase	Promega
GoTaq Reaction Buffer Green (5 x)	Promega
Mayer's Hämalaun	Merck
Hämatoxylin-Lösung Gill Nr. 1	Sigma-Aldrich
Horse Serum	Invitrogen
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS -G)	Thermo Fisher
Isofluran	Baxter
Isopronanol	Merck
Ketamin	CP-Pharma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Magermilchpulver	Roth
Maleinsäure	Merck
Mannitol	Sigma-Aldrich
MEM (mit Earle's Salzen, ohne NaHCO <sub>3</sub> )	Biochrom GmbH
Methybutan	Merck
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (monobasic)	Sigma-Aldrich
Nukleasefreies Wasser	Promega
Nukleotide Mix (10 mM)	Promega
Oligo(dT)-Primer 500 µg / ml	Promega
Paraffin	Leica
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (10,000 U / mL)	Thermo Fisher
PeqGREEN	Peqlab
Perjodsäure	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid „PMSF“	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Peqlab
Reverse Transkriptase M-MLV	Invitrogen
Reverse Transkriptase System	Promega
RNAscope Probe – MmRen1	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope® Reagent Kit-Brown	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope® H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> & Protease Plus	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope® Wash Buffer Reagents	Advanced Cell Diagnostics

RNAsoce® Target Retrieval Reagents	Advanced Cell Diagnostics
RNase-freies Wasser	Promega
Saccharose	Sigma-Aldrich
Schiff's-Reagenz	Merck
Streptozotizin	Sigma-Aldrich
Succinat	Sigma-Aldrich
SYBR Green Mastermix	Roche
Tissue Tek	Hartenstein
TRIS	Sigma-Aldrich
TRISure	Bioline
Trypsin 0.05 % / EDTA 0.02 %	PAN-Biotech
Trypsin ≥10,000 BAEE units/mg Protein	Sigma-Aldrich
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich
Trijodthyronin (T3)	Sigma-Aldrich
Triton X 100	Böhringer
Wasserstoffperoxid-Lösung	Sigma-Aldrich
Xylol	Merck / AppliChem
Zitronensäure	Sigma-Aldrich

### Assay Kits

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller / Lieferant</u>
Angiotensin I EIA	IBL international
Kreatinin Assay	BioassaySystems
Mouse Albumin ELISA	Dunn Labortechnik GmbH, ICL (Immunology Consultants Laboratory)

### Primer

Die Primer für die Genotypisierung und die qPCR wurden von der Firma biomers.net GmbH in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100 pmol / µl eingestellt.

### Genotypisierung

<u>Gen</u>	<u>Sequenz</u>
Cre	5'-GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG-3' 5'-GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC-3'
<b>PCR Produkt</b>	<b>400 bp, wenn Cre positiv</b>
Renin1 <sup>flox/flox</sup> sense	5'-CAGCCTCCTTGGCAGCTTCTAGCC-3'
Renin1 <sup>flox/flox</sup> antisense	5'-ACTGTCAACACCTCTATGCTTGGG-3'
<b>PCR-Produkt</b>	<b>519 bp bei Renin1<sup>WT/WT</sup> 667 bp bei Renin1<sup>flox/flox</sup></b>
Pax8 rtTA sense	5'-CCATGTCTAGACTGGACAAGA-3'
Pax8 rtTA antisense	5'-CTCCAGGCCACATATGATTAG-3'
<b>PCR-Produkt</b>	<b>640 bp, wenn Pax8 positiv</b>

TetO-Cre common	5'-ACTTGCAGTTCTTGCAGGC-3'
TetO-Cre mutant	5'-CATTTTCGTGATGAATGCCAC-3'
TetO-Cre WT	5'-CCGTAGCTCCAGCTTCACC-3'
<b>PCR-Produkt</b>	<b>588 bp, wenn WT positiv</b> <b>668 bp, wenn TeO-Cre KO</b>
BACRenGFP sense	5'-GGTGGACAGGTAATGGTTGTCTGGG-3'
BACRenGFP antisense	5'-AGCAAGGGCGAGGAACTGTTCACTG-3'
<b>PCR Produkt</b>	<b>600 bp, wenn GFP positiv</b>
mT/mG sense	5'-CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT-3'
mT/mG antisense 1	5'-CGAGGCGGATCACAAGCAATA-3'
mT/mG antisense 2	5'-TCAATGGGCGGGGGTTCGTT-3'
<b>PCR Produkt</b>	<b>330 bp, wenn WT positiv</b> <b>250 bp, wenn mTmG</b>

qRT-PCR

<b>Gen</b>	<b>Sequenz</b>
Actin sense	5'-CCGCCCTAGGCACCAGGGTG-3'
Actin antisense	5'-GGCTGGGGTGTGTAAGGTCTCAA-3'
<b>PCR Produkt</b>	<b>286 bp</b>
Renin	5'-AGGGGGTGCTAAAGGAGGAA-3'
	5'-GATAATGCTGCGGGTCGCTA-3'
<b>PCR Produkt</b>	<b>102 bp</b>
RPL32 sense	5'-TGGAGGTGCTGCTGATGTG-3'
RPL32 antisense	5'-CGTTGGGATTGGTGA CTCTGA-3'
<b>PCR Produkt</b>	<b>126 bp</b>
18s sense	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'
18s antisense	5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'
<b>PCR Produkt</b>	<b>155 bp</b>

**Antikörper**Primär

<b>Name</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verd.</b>	<b>Art.-Nr.</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Albumin	goat	1:600	ab19194	Abcam
AQP2 (C17)	goat	1:200	sc-9882	Santa Cruz
VATPase (PRR)	goat	1:50	sc-2011	Santa Cruz
Calbindin D-28k	mouse	1:300	300	Swant
CD 31	goat	1:100	AF3628	R&D Systems
GFP	chicken	1:600	ab13970	Abcam
Glattmuskelaktin ( $\alpha$ -SMA)	mouse	1:600	ab7817	Abcam
Renin (I)	rabbit	1:600	OACA02177	Hölzel Diagnostica
Renin (II)	goat	1:200	AF4722	R&D Systems
Renin (III)	chicken	1:400	*	Davids

\* speziell für das Institut für Physiologie der Universität Regensburg hergestellt

Sekundär

<b>Name</b>	<b>Verd.</b>	<b>Art.-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor488 (Donkey-Anti-Rabbit)	1:400	711-545-152	Jackson Immuno Research / Dianova
Cy2 (Donkey-Anti-Chicken)	1:400	703-225-155	Jackson Immuno Research / Dianova
DyLight 488 (Donkey-Anti-Goat)	1:400	705-485-147	Jackson Immuno Research / Dianova
Rhodamin (Donkey-Anti-Goat)	1:400	705-025-147	Jackson Immuno Research / Dianova
Rhodamin (Donkey-Anti-Mouse)	1:400	715-025-150	Jackson Immuno Research / Dianova
DAPI	1:400	sc-3598	Santa Cruz

**Puffer und Lösungen**Agarosegel:

- TBE 1 x
- Agarose 2 %

Blockierlösung (Immunfluoreszenzfärbung), filtriert:

- PBS Puffer „Otto“ 1 x
- BSA 1 %
- Horse Serum 10 %

Waschlösung (Immunfluoreszenzfärbung), filtriert:

- PBS Puffer „Otto“ 1 x
- BSA 1 %

Blockier- und Waschlösung (Immunfluoreszenzfärbung Albumin):

- PBS Puffer „Otto“ 1 x
- Magermilchpulver 5 %

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

0,1 % DEPC in H<sub>2</sub>O (MilliQ), schütteln, über Nacht geöffnet unter dem Abzug stehen lassen, dann autoklavieren.

Eosin Färbelösung für 200 ml (eine Küvette):

- Eosin 0,4 g Eosin
- Isopropanol (96 %) 3 ml
- Eisessig (100 %) 2 Tropfen frisch dazu

Fixierlösung Perfusion (pH 7,4) filtriert:

- PBS 1 x
- Paraformaldehyd 4 %

Fixierlösung Perfusion (Transmissionselektronenmikroskopie)

- PBS 1 x
- Glutaraldehyd 2 %

Homogenisierungslösung (Nierengewebe):

- Glycerin 5%
- EDTA 0,5 M, pH 8,0 10 mM
- PMSF 0,1 mM
- AEBSF 0,1 mM

Maleatpuffer (pH 6,0), für 1 Liter:

- Tris 4,06 g
- Maleinsäure 5,8 g
- EDTA 2,96 g

PBS (Phosphate Buffered Saline) Puffer „Otto“, pH 7,4

- $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$  10 mM
- NaCl 140 mM
- $KH_2PO_4$  10 mM

TNES Puffer:

- Tris pH 7,5 10 mM
- NaCl 400 mM
- EDTA pH 8,0 100 mM
- SDS 0,6 %

TBE 10 x, für 1 Liter:

- Tris 108 g
- Borsäure 55 g
- EDTA 0,5 M, pH 8,0 40 ml

Tris - EDTA, pH 8,0:

- Tris 10 mM
- EDTA 1 mM

Verdaulösung Mikrodissektion:

- MEM	25 ml
- Trypsin Inhibitor	1,2 mg
- Glycin	9,4 mg
- Collagenase Typ II	10 mg

BSA-Lösung Mikrodissektion:

- MEM	1 x
- BSA	1 %

10% NSB (Neutral Buffered Formalin, pH 7,0), für 1 Liter:

- Formalin (37-40 % Stammlösung)	100 ml
- H <sub>2</sub> O dd	900 ml
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5 g

Zitratpuffer für die STZ-Induktion (pH-Wert 4,5):

- Zitronensäure	1,4 g
- Aqua bidest.	50 ml

**Geräte**

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller / Lieferant</u>
Accu-Chek Sensor	Roche
Blockcycler „Labcycler“	Sensoquest GmbH
Elektronischer Stößel „Tissue Grinder“	Nippon
Elektrophorese-System „EV231“	Consort
Flammenphotometer BWB-XP	BWB Technologies
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories
Hämatokrit-Zentrifuge "210"	Hettich
Homogenisator "Ultra-Turrax T25"	Janker & Kunkel
HybEZ Ofen	Advanced Cell Diagnostics
Inkubator	Binder
Isofluran-Verdampfer	Harvard Apparatus GmbH
Light Cyclor "LC480"	Roche
Metabolische Käfige "MMC 100"	Hatteras Systems Inc.
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss Axiovert 200M, Zeiss LSM 710, Zeiss Observer Z1, Zeiss
Mikrotome	Rotationsmikrotom RM2265, Leica
Narkosegas-Absorber	Harvard Apparatus GmbH
Operationsbesteck	FST
Osmometer „Osmomat 030“	Gonotec

PhysioTel® Data Exchange Matrix	Data Science International
PhysioTel® Receiver „RPC“	Data Science International
PhysioTel® Telemetrie Implantate „PA-C10“	Data Science International
Ultraschallbad	
UV / VIS-Spektrometer Nanodrop ND-1000"	ThermoScientific
Stereomikroskop "Discovery V8"	Zeiss
Stereomikroskop "Stemi 2000"	Zeiss
Zentrifuge "541702"	Eppendorf
Zellkulturzentrifuge „Allegra X30R“	Beckmann

## Verwendete Software

- Microsoft Office 2010
- ImageJ 1.7.0 (2016)
- GraphPad Prism 6
- CorelDRAW X8
- Inkscape 0.92.3
- Axiovision Zen lite 2012 „blue edition“, Zeiss
- LightCycler 480 SW 1.5
- EndNote X7
- Telemetrie Software:
  - Dataquest ART Data Aquisition, Version 4.10
  - Dataquest ART Data Analysis, Version 4.10
- PubMed von NCBI (The National Center for Biotechnology; Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b> Schematische Darstellung der Anatomie einer Niere im Querschnitt und der Aufbau eines Nephrons.....	1
<b>Abb. 1.2:</b> Schematische Darstellung der Transportprozesse im proximalen Tubulus.....	4
<b>Abb. 1.3:</b> Schematische Darstellung eines Glomerulus & Immunhistochemische Aufnahme eines Glomerulus.....	6
<b>Abb. 1.4:</b> Schematische Darstellung der Sammelrohrzellen.....	7
<b>Abb. 1.5:</b> Schematische Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Systems.....	9
<b>Abb. 1.6:</b> Immunfluoreszenzfärbung für den Prorenin-Rezeptor (PRR) in den Sammelrohr-Schaltzellen einer Wildtypmaus.....	16
<b>Abb.3.1:</b> Schematische Darstellung des Pax8/TetO-Cre/Ren <sup>fllox/fllox</sup> Knockout-Systems.....	28
<b>Abb. 3.2:</b> A. Skizzenhafte Darstellung der drei Nierenzonen. B. Mikrodissiziertes Nephronsegment.....	41
<b>Abb. 4.1:</b> Gesamtnierengewichte von Aqp2-Cre Ren WT und KO Mäusen.....	53

<b>Abb. 4.2:</b> Hämatoxylin & Eosin gefärbte Nierenschnitte von Aqp2-Cre/Ren WT und KO Mäusen..	54
<b>Abb. 4.3:</b> Analyse der Aquaporin2-Immunfluoreszenzfärbung von Aqp2-Cre/Ren WT und KO Mäusen.....	55
<b>Abb. 4.4:</b> Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines Nierengefrierschnitts einer Aqp2-Cre/mTmG Maus.....	56
<b>Abb. 4.5:</b> Übersichtsaufnahmen der Niere einer Pax8/TetO-Cre/Ren <sup>flx/flx</sup> mTmG Maus.....	57
<b>Abb. 4.6:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Pax8/TetO-Cre/Ren <sup>flx/flx</sup> mTmG Mausnieren mit Co-Färbung von Renin.....	58
<b>Abb. 4.7:</b> Renin mRNA Expression isolierter Sammelrohre von Tubulus-Renin WT und KO Mäusen.....	58
<b>Abb. 4.8:</b> Immunfluoreszenzfärbung von unbehandelten, und STZ-induzierten Wildtyp-Mäusen...61	
<b>Abb. 4.9:</b> Immunfluoreszenzfärbung von BTBR ob/ob Mäusen.....	62
<b>Abb. 4.10:</b> Immunfluoreszenzfärbung von humanen Diabetikernieren.....	63
<b>Abb. 4.11:</b> Immunfluoreszenzfärbung von transgenen BAC Ren-GFP Mäusen.....	64
<b>Abb. 4.12:</b> Nachweis von Renin mittels RNAscope Technologie.....	65
<b>Abb. 4.13:</b> Nachweis von Renin mittels RNAscope Technologie im Interstitium.....	66
<b>Abb. 4.14:</b> Auswertung der physiologische Parameter der Tubulus-Renin KO und WT Mäuse basal und nach Induktion des Diabetes.....	67
<b>Abb. 4.15:</b> Immunfluoreszenzfärbung von diabetischen Tubulus-Renin WT und KO Mäusen & Statistische Auswertung.....	68
<b>Abb. 4.16:</b> Renin mRNA Abundanz verschiedener Nierenkompartimente von Tubulus-Renin WT und KO Mäusen.....	69
<b>Abb. 4.17:</b> Prorenin und aktives Renin im Nierengewebe der tubuluspezifischen Renin WT und KO Mäuse, basal und nach acht Wochen Diabetes.....	71
<b>Abb. 4.18:</b> Renin-Exkretion in Spontanurinproben von unbehandelten und STZ-induzierten Tubulus-Renin WT und KO Mäusen.....	72
<b>Abb. 4.19:</b> Prorenin und aktives Renin im Plasma von Tubulus-Renin WT und KO Tieren, basal und acht Wochen nach der STZ-Induktion.....	73
<b>Abb. 4.20:</b> Albuminausscheidung und Albumin-Immunfluoreszenzfärbung in Tubulus-Renin WT und KO Mäusen, basal und acht Wochen nach Diabetesinduktion.....	74
<b>Abb. 4.21:</b> Glomeruläre Hypertrophie und mesangiale Expansion.....	75
<b>Abb. 4.22:</b> Auswertung der peritubulären Kapillardichte.....	76
<b>Abb. 4.23:</b> Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Glomeruli in STZ-diabetischen Tubulus-Renin Wildtyp und Knockout-Mäusen.....	77
<b>Abb. 4.24:</b> Telemetrische Bestimmung des arteriellen Blutdrucks in diabetischen Tubulus-Renin Wildtyp- und Knockout-Mäusen.....	78



<b>Abb. 4.25:</b> 24h-Urinvolumen, Prorenin und aktives Renin im Plasma von Kontrolltieren und unter erhöhter Trinkmenge.....	79
<b>Abb. 4.26:</b> Immunfluoreszenzfärbungen von Wildtypmäusen unter erhöhter Trinkmenge (5%iger Glukoselösung).....	80
<b>Abb. 4.27:</b> Glukoseausscheidung, Prorenin und aktives Renin im Plasma von Kontrolltieren und Empagliflozin-behandelten Mäusen .....	82
<b>Abb. 4.28:</b> Immunfluoreszenzfärbungen von Empagliflozin-behandelten Wildtypmäusen.....	83
<b>Abb. 4.29:</b> Stimulation der Renin mRNA Experssion in mCT1 Zellen.....	84
<b>Abb. 5.1:</b> Mögliche Wirkmechanismen von Prorenin, Renin und Angiotensin II (ANG II) im Sammelrohr beim Diabetes.....	99

### 8.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 3.1:</b> Konjugate für die Fluoreszenzfärbung mit den jeweiligen Anregungs- und Emissionswellenlängen.....	40
<b>Tabelle 4.1:</b> Physiologische Parameter von unbehandelten Tubulus-Renin WT und KO Mäusen.....	60
<b>Tabelle 4.2</b> Prorenin- und Reninkonzentration im Nierengewebe von Kontrollen und unter erhöhter Trinkmenge.....	79
<b>Tabelle 4.3:</b> Quantitative Realtime-PCR Analyse der Renin mRNA Expression im Nierengewebe von Kontrolltieren und unter erhöhter Trinkmenge.....	80
<b>Tabelle 4.4:</b> Quantitative Realtime-PCR Analyse der Renin mRNA Expression im Nierengewebe von Kontrollen und Empagliflozin-behandelten Mäusen.....	88

### 8.4 Abkürzungsverzeichnis

<b><u>Abkürzung</u></b>	<b><u>Bedeutung</u></b>
°C	Grad Celcius
AA	Afferente Arteriole
Abb	Abbildung
AC	Adenylatzyklasen
ACE	Angiotensin Converting Enzym
ADH	Antidiuretisches Hormon Vasopressin
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AMDCC	Animal Models of Diabetic Complications Consortium
ANG	Angiotensin

---

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Aqp	Aquaporin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AT1	Angiotensin II Typ 1 - Rezeptor
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
BSA	bovines (Rinder-) Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonphosphat
cDNA	komplentäre Deoxyribonucleinsäure
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CREB	cAMP-responsive element binding protein
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
dl	Deziliter
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukeotidtriphosphat
DT	Distaler Tubulus
EA	Efferente Arteriole
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced-Green-Fluorescent-Protein-Dimer
EM	Extraglomeruläres Mesangium
EMPA	Empagliflozin
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FCS	Fetales Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Assoc.
g	Gramm
g	Einheit der Normalerdschwerebeschleunigung
G	Glomerulus

---

GFP	Green fluorescent protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT2	Glukosetransporter 2
GPR91	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor 91
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H	Henle Schleife
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IL	Interleukin
IM	Intraglomeruläres Mesangium
JG	Juxtaglomerullär
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
kDa	Kilo Dalton
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KO	Knockout
l	Liter
LoxP	Locus of X-over of P1
m	milli
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MD	Macula densa
mg	Milligramm
mG	membranständiges green fluorescent protein = (Enhanced-Green-Fluorescent-Protein-Dimer)
min	Minute
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter an der Quecksilbersäule, Einheit des Druckes
mmol	Millimol
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure

---

mT	membranständiges tandem dimer tomato
MW	Mittelwert
n	Stichprobenmenge, Anzahl
NBF	Neutral gepuffertes Formalin
NCC	Natrium-Chlorid-Symporter
NFκB	Nuklear-Factor kappa B
NHE3	Natrium-Protonen-Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nm	Nanometer
n.s.	Nicht signifikant
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat-Oxidase
NIH	National Institute of Health
NKCC2	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PKA	Proteinkinase A
PRC	Plasamreninkonzentration
PRR	Prorenin-Rezeptor
RAS	Renin-Angiotensin-System
RFP	Red fluorescent protein
RNA	Ribonucleinsäure
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium (K <sup>+</sup> ) Kanal
ROS	reactive oxygen species = Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

---

RT	Real Time
rtTA	reverser Tetrazylin-abhängiger Transaktivator
RTD	renale tubuläre Dysgenese
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Sek	Sekunde
SGLT	Sodium-Glukose-Cotransporter
SMA	Smooth Muscle Actin
SR	Sammelrohr
STZ	Streptozotozin
TGF	Tubuloglomerulärer Feedback
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRE	Tetracycline-responsive-promotor element
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
US	United States
v-	vakulär-
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organisation
Wo	Wochen
WT	Wildtyp
$\mu$	Mikro

## 8.5 Veröffentlichungen

Staffel, J, Valletta, D, **Federlein, A**, Ehm, K, Volkmann, R, Fuchsl, AM, Witzgall, R, Kuhn, M, Schweda, F: Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A in Podocytes is Renoprotective but Dispensable for Physiologic Renal Function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2016.

## 8.6 Kongressbeiträge

**Anna Federlein**, Daniela Valletta, Janina Staffel, Frank Schweda

“Prorenin derived from renal tubules contributes to high circulating prorenin levels in diabetes mellitus”

94nd Annual Meeting of the German Physiological Society, 05.03.2015 - 08.03.2015 Magdeburg (Poster)

**Anna Federlein**, Daniela Valletta, Janina Staffel, Andrea Werner, Frank Schweda

“The tubular renin system contributes to high circulating prorenin levels and the development of albuminuria in diabetes mellitus”

95nd Annual Meeting of the German Physiological Society, 03.03.2016 - 05.03.2016, Lübeck (Präsentation)

## 8.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

Regensburg, den 09.05.2018

---

(Anna Federlein)

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der letzten Jahre bei der Durchführung und Erstellung meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Allen voran danke ich meinem Betreuer Prof. Frank Schweda, für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung dieser Arbeit. Erst durch seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und seine Denkanstöße konnte das Projekt in dieser Weise bearbeitet werden. Ich danke ihm für seine stets offene Tür und seine freundschaftliche und offene Art. Seine Begeisterung für die Forschung war mir immer eine große Motivation und trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Als nächstes möchte ich mich bei meinen lieben Kolleginnen und Kollegen, der AG Schweda für die gegenseitige Unterstützung, den Zusammenhalt und die gute Atmosphäre im Labor bedanken. Kathi, Regine und Friedl, ihr habt mir mit eurem umfangreichen Labor- und Mäusewissen die Arbeit sehr erleichtert und mich in allen Lebenslagen mit euren hilfreichen Tipps und Tricks unterstützt. Ein großer Dank auch an Nina, Daniela und Andrea für eure Hilfsbereitschaft beim Erlernen neuer Methoden, beim Auswertungen von Daten und die schöne gemeinsame Zeit während der Kongresse. Danke auch an Robert für die Hilfe bei der Mausperfusion und das ständige Versorgen mit Kaffee und Milchschaum.

Allen weiteren Mitarbeitern der Institute für Physiologie und Molekulare Zellbiologie danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre, den freundlichen Umgang miteinander und ihre Hilfsbereitschaft.

Von Herzen danke ich meiner Familie, die mich mein ganzes Leben unterstützt hat und immer für mich da war. Ebenso ein großes Dankeschön an meine wunderbaren und einzigartigen Freunde.

Zu guter Letzt, danke ich meinem Freund Max für seine Liebe und Unterstützung. Deine aufheiternden Worte und deine bedingungslose Zuneigung haben mir nicht nur beim Erstellen dieser Arbeit, sondern auch in allen anderen Lebenslagen Halt und Sicherheit gegeben. Danke, dass du mir stets den Rücken freigehalten hast und immer die richtigen Worte der Motivation hattest.