

Bedeutung von Angiotensin II Typ 1-Rezeptoren in mesenchymalen Zellen für die Entwicklung und Funktion der Niere



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

vorgelegt von

Julia Schrankl

aus

Traunstein

im Jahr

2020

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:
13.11.2020

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

Unterschrift: _____
(Julia Schrankl)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	7
1.2 Regulation der Reninsynthese und Reninsekretion.....	9
1.3 AT ₁ -Rezeptoren	11
1.4 Relevanz der AT ₁ -Rezeptoren für die Nierenentwicklung	14
1.5 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits	20
2.1.4 Puffer und Lösungen	22
2.1.5 Primer.....	24
2.1.6 Antikörper	26
2.1.7 Sonden für in-situ Hybridisierung.....	26
2.1.8 Software und Internetdienste	27
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Versuchstiere	28
2.2.1.1 Verwendete Mauslinien	28
2.2.1.2 Genotypisierungen	29
2.2.1.3 Stimulations- und Suppressionsversuche.....	30
2.2.1.4 Osmotische Minipumpen.....	30
2.2.1.5 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate	31
2.2.1.6 Messung des systolischen Blutdrucks	31
2.2.1.7 Bestimmung von Osmolarität und Natrium/Kalium-Konzentration im Urin	31
2.2.2 Humanes Nierengewebe und Nierengewebe von Ratten.....	31
2.2.3 Fixierung des Nierengewebes	32

2.2.3.1 Retrograde arterielle Perfusion	32
2.2.3.2 Einbettung in Paraffin.....	32
2.2.3.3 Anfertigen von Paraffinschnitten	33
2.2.4 In-situ Hybridisierung	33
2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung	33
2.2.6 Mikroskopische Aufnahmen.....	34
2.2.7 Isoliert perfundierte Mausniere	34
2.2.8 Glomerulus-Präparation.....	35
2.2.9 Isolierung der RNA	35
2.2.10 Reverse Transkription.....	35
2.2.11 Quantitative Realtime PCR	36
2.2.12 Bestimmung von Plasma-EPO Konzentration und Reninaktivität.....	36
2.2.12.1 EPO ELISA	36
2.2.12.2 Renin ELISA	37
2.2.13 Statistische Auswertung	38
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Lokalisation renaler AT ₁ -Rezeptoren.....	39
3.1.1 Expression der AT ₁ -Rezeptoren in Mausnieren	39
3.1.2 Expression der AT ₁ -Rezeptoren in Rattennieren	44
3.1.3 Expression der AT ₁ -Rezeptoren in humanen Nieren.....	46
3.2 Relevanz der AT ₁ -Rezeptoren im renalen FoxD1-Kompartiment für die Funktion und Entwicklung der Niere	48
3.2.1 Verifikation der Deletion von AT ₁ -Rezeptoren im FoxD1-Kompartiment.....	48
3.2.2 Auswirkungen der Deletion von AT ₁ -Rezeptoren im Stromakompartiment auf die Nierenentwicklung.....	51
3.2.3 Auswirkungen der Deletion von AT ₁ -Rezeptoren im Stromakompartiment auf die Nierenfunktion.....	54
3.2.4 Auswirkungen der Deletion von AT ₁ -Rezeptoren im Stromakompartiment auf die Reninsekretion.....	56

3.3 Relevanz der AT ₁ -Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen für die Aktivität des RAAS	59
3.3.1 Verifikation der Deletion von AT ₁ -Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen.....	59
3.3.2 Relevanz der AT ₁ -Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen für die basale Regulation des RAAS	62
3.3.3 Relevanz der AT ₁ -Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen bei Suppression und Stimulation der RAAS-Aktivität	64
4 Diskussion	67
4.1 Lokalisation der AT ₁ -Rezeptoren in der Niere	68
4.2 Normale Nierenentwicklung in Mäusen mit einer Deletion der AT ₁ -Rezeptoren im FoxD1 exprimierenden Stromakompartiment	70
4.3 Unbeeinträchtigte Regulation der Reninsekretion in Mäusen mit einer Deletion der AT ₁ -Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen	73
5 Zusammenfassung	75
6 Literaturverzeichnis	77
7 Anhang	89
7.1 Abbildungsverzeichnis	89
7.2. Abkürzungsverzeichnis	90
7.3 Kongressbeiträge.....	92
7.4 Publikationen	93
8 Danksagung	94

1 Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) nimmt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des extrazellulären Volumens und des Salzhaushalts ein und ist damit essentiell an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Die enzymatische Kaskade des RAAS beginnt mit der Synthese von Angiotensinogen in der Leber, welches durch die Aspartatprotease Renin gespalten wird. Renin fungiert als Initiator dieser Kaskade und bildet zugleich den limitierenden Faktor, da alle anderen Komponenten unter normalen Bedingungen im Überschuss vorliegen. Es wird von den juxtaglomerulären granulierten Zellen in den afferenten Arteriolen der Nieren produziert. Die Synthese und Freisetzung von Renin kann dabei über den Perfusionsdruck in der afferenten Arteriole, die ionale Zusammensetzung in der tubulären Flüssigkeit und das sympathische Nervensystem reguliert werden.^{1,2} Durch die Spaltung von Angiotensinogen mithilfe von Renin entsteht Angiotensin I (ANG I). Dabei handelt es sich um ein inaktives Dekapeptid, welches durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) zum aktiven Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) umgewandelt wird. ANG II vermittelt seine Wirkung über Rezeptoren, von denen sich zwei Subtypen unterscheiden lassen: Angiotensin II Typ 1 (AT₁) Rezeptoren und Angiotensin II Typ 2 (AT₂) Rezeptoren. Die meisten der klassischen Funktionen von ANG II werden über die AT₁-Rezeptoren vermittelt. Dazu zählen die Freisetzung von Aldosteron aus der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde, die Stimulation der renalen tubulären Natrium-Reabsorption, die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen und die Stimulation des Durstgefühls im Hypothalamus (Abbildung 1).³⁻⁷ Die AT₂ Rezeptoren vermitteln eher gegenteilige Effekte, wie beispielsweise Vasodilatation und Natriurese, und spielen vermutlich eine Rolle für die Regeneration und Wundheilung.⁸⁻¹⁰

Die lokale Bildung und die Effekte von ANG II beruhen allerdings nicht vollständig auf der klassischen RAAS-Kaskade. Mittlerweile wurden einige weitere Proteine beschrieben, die auf das RAAS einwirken können. Dazu zählt die Entdeckung eines Enzyms, welches eine Homologie zu ACE aufweist, und daher als ACE2 bezeichnet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass ACE2 durch die Spaltung von ANG II zur Bildung von ANG (1-7) beiträgt.¹¹ Dieses Peptid ist ein Ligand des G-Protein gekoppelten Mas-Rezeptors, welcher hauptsächlich im Gehirn und den Hoden exprimiert wird, aber auch in den Nieren vorkommt.¹²⁻¹⁴ Über den Mas-Rezeptor kann ANG (1-7) antagonistische Effekte zu ANG II vermitteln, wie Vasodilatation oder die Generierung von Stickstoffmonoxid (NO). Zudem werden der ACE2/ANG (1-7)/Mas-Achse antihypertone und antifibrotische Wirkungen zugeschrieben, weshalb sie auch als Gegenspieler des klassischen RAAS angesehen wird.¹⁵⁻¹⁸ ANG II kann zudem auch direkt aus Angiotensinogen oder ANG I generiert werden, ohne Mitwirkung von

Renin oder ACE. Zu solchen ANG II-produzierenden Peptidasen zählen beispielsweise Chymasen, Kathepsin oder Tonin.^{15,19–21} Insgesamt wird angenommen, dass etwa 40% des in der Niere vorhandenen ANG II über ACE-unabhängige Wege generiert wird.^{7,22}

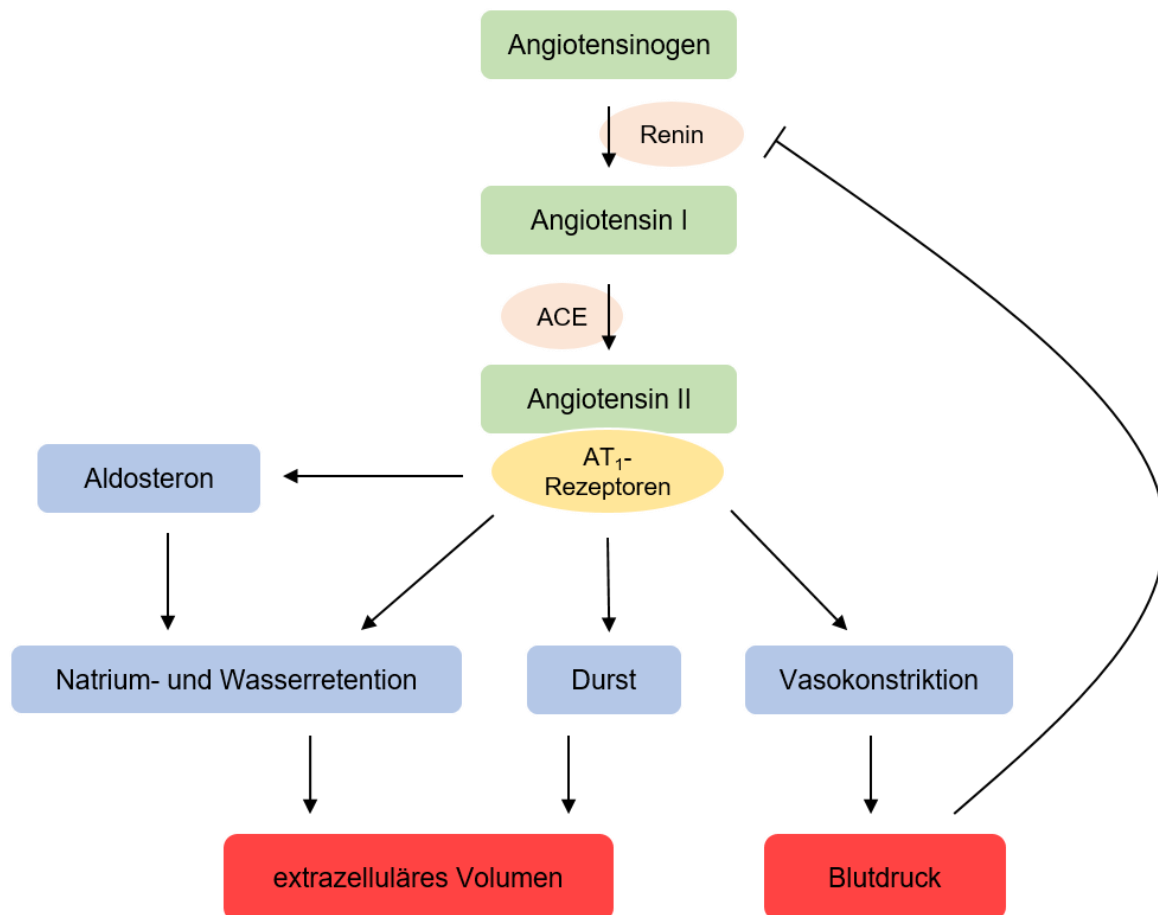


Abbildung 1. Schematische Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Angiotensinogen wird mithilfe von Renin zu ANG I gespalten und durch ACE zu ANG II umgewandelt. ANG II gilt als Schlüsselhormon des RAAS und vermittelt Vasokonstriktion, die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere, die Natrium- und Wasserretention in der Niere und das Empfinden von Durst. Auf diese Weise können das extrazelluläre Volumen und der Blutdruck reguliert werden. Der Blutdruck wiederum hat einen negativen Rückkopplungseffekt auf die Synthese und Sekretion von Renin.

Mittlerweile ist bekannt, dass ANG II in vielen Geweben, einschließlich Niere, Herz und Gehirn, lokal gebildet werden kann und somit gewebspezifische lokale RAAS existieren.^{21,23} Diese lokalen RAAS bilden funktionell autonome Systeme, die autokrine, parakrine und intrakrine Effekte vermitteln können. Das RAAS im Gehirn ist beispielsweise an der Regulation des Blutdrucks und der Homöostase des Wasser- und Salzhaushalts beteiligt, indem es auf das autonome Nervensystem, die Freisetzung von Vasopressin aus der Hypophyse und die Stimulation von Durst und Salzappetit einwirkt.^{24–26} Eine Aktivierung des lokalen RAAS im Gehirn führt daher vor allem zu einer Erhöhung des Blutvolumens und des Blutdrucks.^{15,26} Im

Herzen werden durch das lokale RAAS vor allem inotrope und chronotrope Effekte vermittelt.^{21,23,27}

Neben physiologischen Funktionen können die lokalen RAAS auch einen signifikanten Einfluss auf pathophysiologische Vorgänge haben. Dazu zählen unter anderem die Regulation des Zellwachstums, Proliferation sowie inflammatorische und fibrotische Prozesse.²⁸ Es wird beispielsweise angenommen, dass das RAAS im Gehirn einen Einfluss auf die Entwicklung von kognitiven Dysfunktionen haben könnte und bei der Entstehung von Demenzen und insbesondere der Alzheimer-Krankheit eine Rolle spielt.^{29,30} Das RAAS im Herzen ist vermutlich in die Entwicklung von kardialer Hypertrophie und Fibrose involviert.^{10,15,21,31} Auch das systemische RAAS ist mit der Entstehung von kardiovaskulären und renalen Erkrankungen assoziiert. Eine pathologische Aktivierung des systemischen RAAS kann häufig zu arterieller Hypertonie, Herz- oder Niereninsuffizienz führen.^{10,32} Daher ist das RAAS ein Angriffspunkt vieler therapeutischer Ansätze in der kardiovaskulären Medizin. Pharmakologische Eingriffe in das RAAS beruhen dabei meist auf der Abschwächung der Effekte von ANG II und dem Verhindern einer überschüssigen Aktivierung der AT₁-Rezeptoren. Dies wird entweder durch eine verminderte Synthese von ANG II mithilfe von ACE-Hemmern oder durch die direkte Blockade der AT₁-Rezeptoren mittels AT₁-Rezeptor-Antagonisten erreicht.^{33,34}

1.2 Regulation der Reninsynthese und Reninsekretion

Die Protease Renin ist entscheidend für die Regulation des RAAS. Die Expression von Renin konnte in mehreren Organen nachgewiesen werden, wobei die Abundanz in der Niere am größten ist.³⁵ Daher wird angenommen, dass die Aktivität des systemischen RAAS durch Renin aus der Niere reguliert wird.^{36,37} Innerhalb der Niere wird Renin hauptsächlich von den juxtaglomerulären Zellen produziert und sezerniert, die in der Media der präglomerulären Arteriolen lokalisiert sind.^{38,39} Um gewährleisten zu können, dass der Körper auf Veränderungen des Blutdrucks und Störungen des Salz- und Wasserhaushalts adäquat reagieren kann, unterliegt die Synthese und Sekretion von Renin einer präzisen Steuerung. In der adulten Niere weist die Anzahl der Renin-produzierenden Zellen daher eine hohe Plastizität auf.⁴⁰ Je nach Aktivität des RAAS kann die Anzahl der Renin-produzierenden Zellen variieren. Bei einer Nidrigsalzdiät oder Hypotonie nimmt die Anzahl an Renin-produzierenden Zellen vor allem entlang der afferenten Arteriolen zu.^{41,42} Bei hoher Salzzufuhr oder Hypertonie hingegen verringert sich die Anzahl der Renin-produzierenden Zellen.^{1,43} Die Regulation von

Renin erfolgt dabei über ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von lokalen intrarenalen und systemischen Faktoren sowie Rückkopplungsmechanismen.^{44,45}

Die Aktivität des RAAS wird maßgeblich über den Blutdruck reguliert. Die Synthese und Sekretion von Renin wird mittels einer negativen Rückkopplung durch einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks inhibiert. Ein Abfall des Blutdrucks hingegen führt zu einer Stimulation der Reninsekretion. So wird über die Aktivierung der RAAS-Kaskade dem Blutdruckabfall entgegengewirkt.^{1,46} Da die Effekte des Blutdrucks auf die Reninsekretion auch experimentell an isolierten Nieren gezeigt werden konnten, wird angenommen, dass ein renaler Barorezeptor-Mechanismus für die druckabhängige Regulation von Renin verantwortlich ist.⁴⁷ Es wird vermutet, dass ein Dehnungsreiz, der durch den erhöhten renalen Perfusionsdruck vermittelt wird, eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in den Gefäßmuskelzellen und den juxtaglomerulären Zellen zur Folge hat. Der Anstieg der Kalziumkonzentration wiederum inhibiert die Freisetzung von Renin und führt zu einer Vasokonstriktion der afferenten Arteriole. An isolierten juxtaglomerulären Zellen konnte bestätigt werden, dass die verminderte Reninexpression und Reninsekretion eine Reaktion auf die mechanische Dehnung ist.^{1,44,48}

Zudem hat die Salzaufnahme einen Einfluss auf die Regulation von Renin. Eine vermehrte Aufnahme von Salz inhibiert die Freisetzung von Renin, während eine niedrige Salzaufnahme die Reninsekretion stimuliert. Akute Veränderungen der Salzkonzentration werden im Tubulus von spezialisierten Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife registriert. Diese Macula densa Zellen stehen in Kontakt mit den extraglomerulären Mesangialzellen und der afferenten Arteriole des dazugehörigen Glomerulus. Die Salzkonzentration kann über die Aktivität des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Transporters (NKCC2) in der apikalen Zellmembran detektiert werden. Ist die Konzentration an Kochsalz hoch, kann über die Kontraktion der afferenten Arteriole eine Anpassung der glomerulären Filtration erfolgen. Die Signalweiterleitung kann über verschiedene Mediatoren geschehen, wie beispielsweise NO oder Prostaglandin E2, das durch Cox-2 generiert wird.⁴³

Das sympathische Nervensystem spielt zusätzlich eine große Rolle für die Kontrolle der Reninsekretion. Über die Aktivierung der β_1 -adrenergen Rezeptoren auf den Renin-produzierenden Zellen kann die Synthese und Freisetzung von Renin stimuliert werden.^{2,43,46}

Die Freisetzung von Renin führt dazu, dass vermehrt ANG II gebildet wird. Zirkulierendes ANG II kann über eine negative Rückkopplung die Sekretion und Synthese von Renin inhibieren. Einige Studien ließen bereits eine Expression von AT_1 -Rezeptoren auf den Renin-produzierenden Zellen vermuten.^{50,51} Es konnte gezeigt werden, dass ANG II in isolierten Renin-produzierenden Zellen von Ratten, sowie in isoliert perfundierten juxtaglomerulären Apparaten von Kaninchen die Reninfreisetzung vermindert.^{52,53} Auch *in vivo* Studien konnten

nachweisen, dass durch eine Inhibierung der Effekte von ANG II die Synthese und Freisetzung von Renin signifikant ansteigt. Die Gabe eines AT₁-Rezeptor-Antagonisten führte in Ratten beispielsweise zu einem 5-fachen Anstieg der Genexpression von Renin und es konnte eine bis zu 10-fache Erhöhung des Reningehalts gemessen werden.^{54,55} Auch eine Verabreichung des ACE-Hemmers Enalapril hatte einen Anstieg der Renin mRNA zur Folge. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass eine exogene Infusion von ANG II zu einem Rückgang der Synthese und Freisetzung von Renin führt.⁵⁶ Dies führte zu dem Schluss, dass die Expression und Sekretion von Renin möglicherweise im Sinne einer negativen Rückkopplung direkt durch die Effekte von ANG II auf die AT₁-Rezeptoren der Renin-produzierenden Zellen kontrolliert wird.^{46,56–58}

Die *in vivo* Experimente, die auf einer pharmakologischen Manipulation der ANG II-Produktion oder der Wirkung von AT₁-Rezeptor-Antagonisten beruhen, bringen jedoch immer zusätzliche systemische Auswirkungen auf das RAAS mit sich, wie beispielsweise Änderungen des Blutdrucks. Daher war es bisher schwierig, das Konzept des direkten Rückkopplungsmechanismus von ANG II auf die Reninsekretion *in vivo* nachzuweisen. Zusätzlich haben *in vivo* Studien, die die Rolle von AT₁-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen untersuchten, die Relevanz des direkten negativen Feedbackmechanismus von ANG II auf die Reninsekretion in Frage gestellt.^{59,60}

1.3 AT₁-Rezeptoren

Die meisten Effekte von ANG II werden über AT₁-Rezeptoren vermittelt. Bei Nagern können zwei Isoformen des Rezeptors unterschieden werden: AT_{1A} und AT_{1B}. Diese sind auf unterschiedlichen Genen kodiert (AT_{1A} auf Chromosom 13 und AT_{1B} auf Chromosom 3 in Mäusen), weisen aber eine hohe Homologie von 95% in der Sequenz auf.⁶¹ Die AT_{1A}-Rezeptoren sind in den meisten Organen stärker exprimiert als AT_{1B}-Rezeptoren. Der murine AT_{1A}-Rezeptor wird daher als die homologe Variante zum AT₁-Rezeptor des Menschen angesehen.^{62,63} Die AT_{1B}-Rezeptoren kommen vermehrt in der Nebenniere und in bestimmten Regionen des zentralen Nervensystems vor.⁵¹

Der AT₁-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Er besteht aus 359 Aminosäuren, besitzt sieben α -helikale Transmembrandomänen und weist einen extrazellulären N-Terminus und einen C-Terminus im Zytosol auf.⁶⁴ Durch die Bindung von ANG II an die AT₁-Rezeptoren kann die Signaltransduktion über verschiedene Mechanismen vermittelt werden. Der klassische Signalweg ist die Aktivierung der Phospholipase C (PLC)

über das $G_{q/11}$ -Protein. Dadurch wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP_3 bindet daraufhin am entsprechenden Rezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums. Dies führt zur Freisetzung von Kalzium in das Zytoplasma und somit zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Kalzium wiederum aktiviert die Myosin-leichte-Ketten-Kinase, was in einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur resultiert. DAG kann außerdem die Phosphokinase C (PKC) stimulieren. Dies kann über den Ras/Raf/MEK-Signalweg zur Aktivierung von ERK (*extracellular signal regulated kinase*) führen und damit sowohl für die Gefäßkontraktion als auch für das Zellwachstum eine Rolle spielen.^{8,65} Zudem kann über die Bindung von ANG II an die AT_1 -Rezeptoren die Aktivierung der Phospholipase D (PLD) erfolgen. Dadurch entsteht Phosphatidsäure, welche wiederum zu DAG konvertiert wird und damit die Stimulation von PKC und die anhaltende Muskelkontraktion unterstützt. Dieser beschriebene PLD/PKC Signalweg könnte auch eine Rolle in der Pathogenese der Hypertonie spielen.^{65,66} Desweiteren kann ANG II die Phospholipase A_2 (PLA_2) aktivieren. Dies führt zur Produktion von Arachidonsäure (AA) und ihren Metaboliten, die sowohl vasodilatatorische als auch vasokonstriktorische Effekte vermitteln können (Abbildung 2).⁶⁷

Auch der JAK/STAT-Signalweg kann über ANG II und die AT_1 -Rezeptoren aktiviert werden. Durch die Aktivierung der Januskinase (JAK) werden die Transkriptionsfaktoren STAT (*signal transducer and activator of transcription*) phosphoryliert und translozieren in den Zellkern. Dort können sie die Gentranskription von *early growth response* Genen, wie c-fos oder c-jun, vermitteln. Dieser Signalweg wurde mit verschiedenen Effekten von ANG II, wie zellulärem Wachstum, Migration, kardialer Hypertrophie und renaler tubulointerstitieller Fibrose in Verbindung gebracht.^{68–70} Zudem konnte gezeigt werden, dass ANG II über die AT_1 -Rezeptoren eine Vielzahl von intrazellulären Proteinkinasen aktivieren kann, einschließlich der Familie der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), wie ERK, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38MAPK. Diese sind vermutlich in Zellwachstum, Proliferation, Hypertrophie, Migration und Fibrose involviert.^{65,71–74} Zusätzlich kann ANG II die NADPH-Oxidase stimulieren und damit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beitragen. Diese sind in inflammatorische Prozesse involviert und können zu Hypertrophie und endothelialer Dysfunktion führen (Abbildung 2).^{8,75–77}

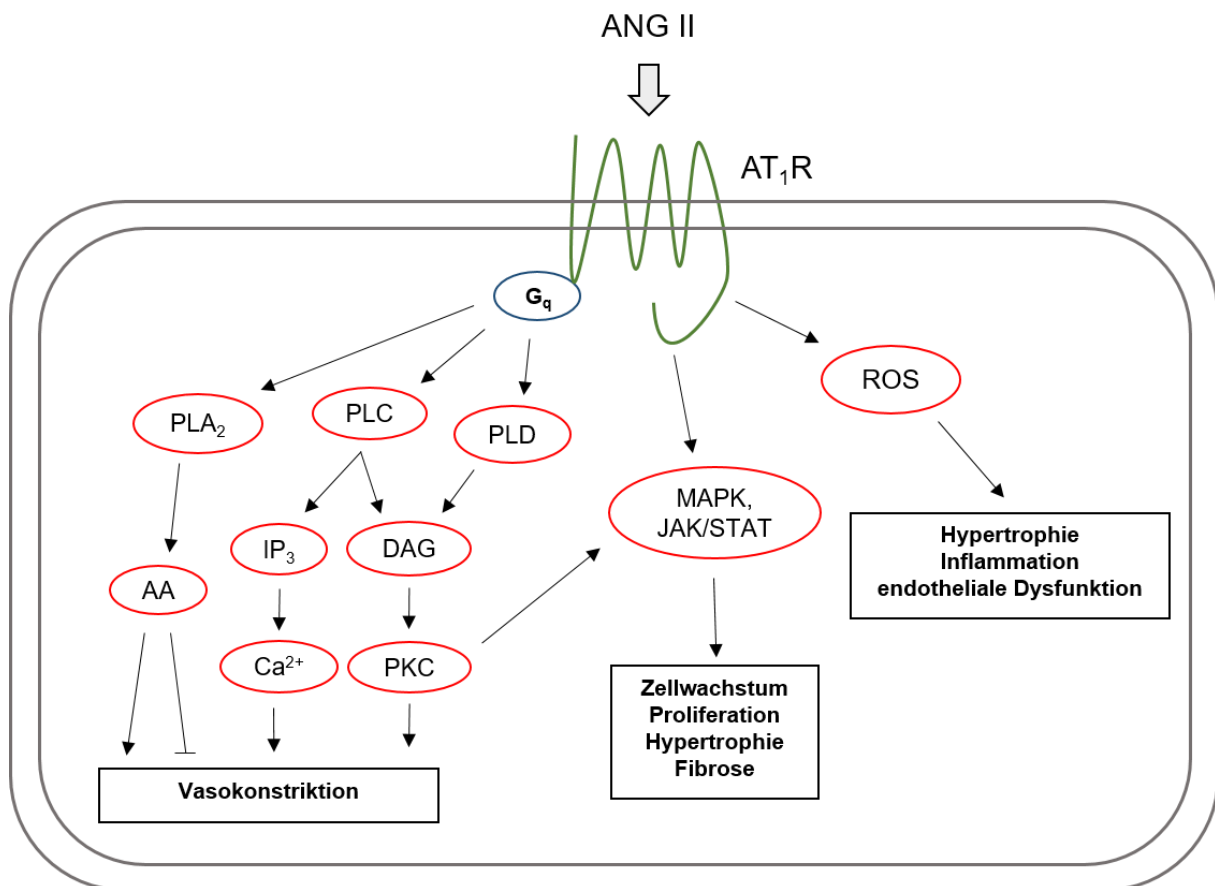


Abbildung 2. Schematische Darstellung ausgewählter Signalwege der AT₁-Rezeptoren und ihrer jeweiligen Effekte. AT₁R, AT₁-Rezeptor; PLA₂, Phospholipase A₂; PLC, Phospholipase C; PLD, Phospholipase D; AA, Arachidonsäure; IP₃, Inositol-1,4,5-Triphosphat; DAG, 1,2-Diacylglycerol; PKC, Phosphokinase C; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; JAK/STAT; Januskinase/signal transducer and activator of transcription; ROS, reaktive Sauerstoffspezies. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

AT₁-Rezeptoren sind in allen Organen nachgewiesen worden, die eine Rolle für die Regulation des Blutdrucks spielen, sprich Herz, Gefäßsystem, Gehirn, Nebennieren und Nieren.^{63,71,78} Vor allem die renalen AT₁-Rezeptoren scheinen eine essentielle Rolle für die Regulation des Blutdrucks zu spielen. In Mäusen führt eine organspezifische Deletion der AT_{1A}-Rezeptoren in der Niere dazu, dass der Blutdruck um knapp 20 mmHg absinkt.⁶⁰ Zudem konnte gezeigt werden, dass AT_{1A}-Rezeptoren in proximalen Tubuluszellen einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung eines konstanten Blutdrucks leisten und auch in der Pathogenese der ANG II abhängigen Hypertonie eine Rolle spielen.³ Eine gesteigerte Aktivierung der AT₁-Rezeptoren kann zudem zu kardialer oder renaler Fibrose führen.⁷⁹ AT₁-Rezeptor-Antagonisten, auch Sartane genannt, sind daher weit verbreitete Medikamente, die zur Behandlung von Hypertonie, Herzinsuffizienz und diabetischer Nephropathie eingesetzt werden.^{32,34}

Zur Lokalisation der AT₁-Rezeptoren in der Niere findet man eine Vielzahl von verschiedenen Befunden, die ein heterogenes Bild des Expressionsmusters zeigen. Einige Studien fanden die AT₁-Rezeptoren in allen renalen Tubulus- und Gefäßabschnitten.^{80,81} Andere Studien wiederum zeigten eine hohe Expression in den medullären Vasa recta oder dem juxtaglomerulären Apparat.^{50,82} Prinzipiell wurde für jeden Zelltyp in der Niere eine Expression der AT₁-Rezeptoren berichtet. Übereinstimmend wurde lediglich eine hohe AT₁-Rezeptorexpression in den Glomeruli beschrieben.^{50,51,80,83–88} Die Befunde kamen durch unterschiedliche Detektionsmethoden zustande. Dazu zählen klassische in-situ Hybridisierungen, Quantifizierung der AT₁ mRNA in mikrodissezierten Gewebsstrukturen oder immunhistochemische Detektion mit Antikörpern gegen AT₁-Rezeptoren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass technische Limitationen der verwendeten Methoden zu dem heterogenen Bild der intrarenalen AT₁-Rezeptorverteilung geführt haben. Bisher ist es noch nicht gelungen, einen zuverlässigen spezifischen Antikörper gegen die AT₁-Rezeptoren zu generieren, was die immunhistochemische Färbung zu einer unzuverlässigen Methode macht.^{89,90} Bei einer Mikrodissektion der renalen tubulären Strukturen kann eine mögliche Kontamination mit tubulointerstitiellen Zellen, die an den Tubuluszellen haften bleiben, nicht ausgeschlossen werden.⁹¹ Zusätzlich haben die traditionellen Methoden der radioaktiven in-situ Hybridisierung eine limitierte Sensitivität.^{92–94} Für die Studien wurden außerdem verschiedene Spezies verwendet, unter anderem Menschen, Mäuse, Ratten, Schafe oder Affen.^{85,86,95–97} Die untersuchten Spezies unterscheiden sich möglicherweise in ihrer renalen Expression der AT₁-Rezeptoren und könnten daher eine weitere Erklärung für die heterogenen Befunde in Bezug auf die Lokalisation der AT₁-Rezeptoren in der Niere liefern.

1.4 Relevanz der AT₁-Rezeptoren für die Nierenentwicklung

Die Gene aller Komponenten des RAAS werden sehr früh während der Nephrogenese in der humanen Embryonalentwicklung exprimiert.⁹⁸ Die Produktion der RAAS-Komponenten ist dabei zeitlich präzise geregelt.⁹⁹ Beim Menschen beginnt die Nephrogenese in der 5. Schwangerschaftswoche und ist vor der 36. Schwangerschaftswoche abgeschlossen. Die Abundanz von ANG II und des zirkulierenden Renins ist im Fetus höher als im postnatalen Leben.¹⁰⁰ Im Gegensatz dazu beginnt bei Mäusen und Ratten die Nephrogenese an Tag 11 und 12 der Embryonalentwicklung und ist erst an Tag 7 bis 10 nach der Geburt abgeschlossen.¹⁰¹ Die Plasmakonzentrationen der RAAS-Komponenten erreichen ihr Maximum erst 2-6 Wochen nach der Geburt.⁹⁹ Vor allem ANG II ist entscheidend für die Nierenentwicklung des Fetus und nimmt besonders am Ende der Schwangerschaft eine

zentrale Rolle für das Nierenwachstum und die Nierenentwicklung ein.^{102,103} Eine intakte RAAS-Aktivität ist daher die Voraussetzung für eine normale Nephrogenese. Dementsprechend kann eine gestörte Funktion des RAAS während der Embryogenese zu gravierenden Schädigungen und Entwicklungsstörungen in der Niere führen.⁹⁹

Loss-of-Function-Mutationen in den RAAS kodierenden Genen im Menschen sind assoziiert mit der renalen tubulären Dysgenese (RTD). Diese ist durch dicht aneinander liegende Glomeruli als Resultat einer unzureichenden Ausdifferenzierung oder des kompletten Fehlens von proximalen Tubuli charakterisiert. Zudem können weitere Schädigungen auftreten, wie verminderte fetale Diurese, die zum Oligohydramnios führen kann, pulmonale Hypoplasie und teilweise defekte Schädelverknöcherung. Die Neugeborenen haben meist einen stark verringerten Blutdruck und versterben oft in der Perinatalperiode.^{99,104,105}

Die Einnahme von ACE-Hemmern oder AT₁-Rezeptor-Antagonisten während des zweiten oder dritten Trimesters der Schwangerschaft kann ähnliche gravierende Auswirkungen wie die Loss-of-Function-Mutationen der RAAS-Komponenten auf den Fetus haben und zu schweren renalen Schädigungen, wie Oligohydramnion, Anurie und Nierenversagen führen. Vor allem durch die mangelhafte Produktion von Fruchtwasser können eine Reihe von Schädigungen auftreten, die als Potter-Sequenz bezeichnet werden. Dazu zählen Gesichtsfehlbildungen, überschüssige Haut, Fehlbildungen der Extremitäten und Hypoplasie der Lungen.^{102,106} Zudem entstehen bereits in der frühen fetalen Phase renale Schädigungen, wie RTD, Verdickung der Wände von Arteriolen oder interlobularen Arterien, glomeruläre Zysten und interstitielle Fibrose. Oft können auch Vergrößerungen der Bowman-Kapsel und der distalen Tubuli, sowie eine vermehrte Expression von Renin am juxtaglomerulären Apparat festgestellt werden.^{106,107} Neonatale Komplikationen treten dabei häufiger nach der Einnahme von AT₁-Rezeptor-Antagonisten auf als nach Einnahme von ACE-Hemmern. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in einigen Geweben die Produktion von ANG II über andere Enzyme als ACE katalysiert werden kann und dieser Effekt durch die Gabe von ACE-Hemmern nicht unterbunden wird.^{102,108}

Bei Versuchstieren können nach einer genetischen Deletion oder pharmakologischen Blockade von Komponenten des RAAS ähnliche Nierenschäden beobachtet werden wie beim Menschen.^{101,109,110} Der Phänotyp von Mäusen nach der pharmakologischen Blockade der AT₁-Rezeptoren ist jedoch weniger stark ausgeprägt als beim Mensch. Ein Grund dafür könnten die Unterschiede im zeitlichen Ablauf der Nierenentwicklung zwischen den Spezies sein. Bei Mäusen geht die Nephrogenese über die Geburt hinaus und die maximale Aktivität des RAAS ist erst 2-6 Wochen nach Geburt erreicht. Da beim Menschen die RAAS-Aktivität ihr Maximum während der aktiven Nephrogenese erreicht und die Nierenentwicklung mit der Geburt abgeschlossen ist, scheint das RAAS für die humane Nierenentwicklung eine noch

entscheidendere Rolle zu spielen.^{99,104,111} Eine gleichzeitige Deletion oder pharmakologische Blockade von beiden Isoformen der AT₁-Rezeptoren (AT_{1A} und AT_{1B}) in Mäusen während der Nephrogenese wirkt sich auf die Überlebensrate der Tiere aus. Die Sterberate während der Perinatalperiode beträgt um die 40%. Das Wachstum der Tiere ist beeinträchtigt und sie weisen eine signifikante Reduktion des Blutdrucks auf.¹¹² Zudem entstehen spezifische renale Anomalien, die charakterisiert sind durch tubuläre und papilläre Atrophie, Wandverdickung der intrarenalen Arteriolen und interstitieller Fibrose. Im Gegensatz zum Menschen sind sie polyurisch und zeigen eine Beeinträchtigung bei der Konzentrierung des Harns. Mit fortschreitendem Alter entwickeln die Tiere oft ein Nierenversagen.^{99,101,112,113}

1.5 Zielsetzung

ANG II gilt als das Schlüsselhormon des RAAS. Unter anderem wird ANG II eine essentielle Bedeutung für die Entwicklung und Differenzierung der Nieren zugeschrieben. Die Effekte von ANG II werden hauptsächlich über die AT₁-Rezeptoren vermittelt. Mäuse mit einer globalen Deletion der AT₁-Rezeptoren weisen einen ausgeprägten renalen Phänotyp auf, was darauf hindeutet, dass AT₁-Rezeptoren in der Niere eine wichtige Rolle für eine normale Nierenentwicklung spielen. Ein Teil dieser Arbeit sollte daher die Untersuchung der Relevanz von AT₁-Rezeptoren in einzelnen Zellkompartimenten der Niere für die Nephrogenese sein. Da die Daten zur Lokalisation der AT₁-Rezeptoren in der Niere ein heterogenes Bild lieferten, sollte zunächst die intrarenale Lokalisation der Rezeptoren analysiert werden. Mittels der hochspezifischen RNAscope® in-situ Hybridisierung sollte das Expressionsmuster der AT₁-Rezeptoren in Maus-, Ratten- und humanen Nieren untersucht und miteinander verglichen werden. Dadurch sollte ein umfassender Überblick über die Lokalisation der AT₁-Rezeptoren und mögliche Unterschiede im AT₁ Expressionsmuster zwischen den einzelnen Spezies erstellt werden. Basierend auf den Ergebnissen der Lokalisationsstudie sollte dementsprechend ein geeignetes Mausmodell generiert werden, um die Rolle der AT₁-Rezeptoren für die Entwicklung der Niere untersuchen zu können.

Eine Hauptfunktion des RAAS ist zudem die Regulation des Blutdrucks. ANG II kann dabei hemmende Effekte auf die Reninsekretion ausüben. Es wird davon ausgegangen, dass ANG II auch einen direkten Rückkopplungseffekt auf Ebene der Renin-produzierenden Zellen ausübt. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Existenz eines direkten negativen Rückkopplungsmechanismus von ANG II auf die AT₁-Rezeptoren der Renin-produzierenden Zellen zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Anthos 2010 Microplate Reader	Anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe
Blutdruckmessgerät	Non-Invasive Blood Pressure Monitoring System, TSE Systems, Bad Homburg
Chemidoc™ Touch Imaging System	Biorad, München
Computer	Dell, Intel Core i7, NVIDIA GeForce GTX1080 8 GB
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets Cy2-Filter TRITC-Filter Cy5-Filter DAPI-Filter	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena Filter set 43, Zeiss, Jena Filter set 50, Zeiss, Jena Filter set 49, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	Colibri 7, Zeiss Jena
Gelelektrophorese-System	Compact M, Biometra, Göttingen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Invitrogen™ Qubit™ 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, UK
Kamera	AxioCam 305 color, Zeiss, Jena AxioCam 506 mono, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach MR 3001 K, Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Axio Observer.Z1, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar Rotationsmikrotom RM2265, Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Sharp, Osaka
Narkosegerät UniVet	Groppler, Deggendorf
Osmomat 030	Gonotec, Berlin
PCR-Geräte	Labcycler, Sensoquest, Göttingen Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow, Wilmington, England
pH-Meter	Hanna Instruments, Vöhringen
Photometer	NanoDrop 1000, Peqlab, Erlangen
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Reinwasseranlage	MilliQ Plus PF, Millipore, Schwalbach

RNAscope® Wärmeofen	HybEZ Oven, Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Schüttler	GFL, Burgwedel Rotamax, Heidolph, Schwabach
Ultraschallbad	Branson 220, Gemini B.V., Apeldoorn, NLD
Vortexgeräte	REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Feinwaage ABT 120-5DM, Kern, Balingen-Frommern EMS, Kern, Balingen-Frommern
Wärmeblöcke	Thermomixer, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbäder	Aqualine AL12, Lauda, Lauda-Königshofen 1083, GFL, Burgwedel
XP Flammenphotometer	BWB Technologies, UK
Zentrifugen	Haematokrit 210, Hettich, Tuttlingen Z300, Hermle, Wehingen Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg Tischzentrifuge, neoLab, Heidelberg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Diamantklingen	Diatome, Biel, CH
Dynabeads M-450 Epoxy	Invitrogen, Carlsbad, USA
Einmal-Kapillarpipetten, Na-hep., 5 µl, 0,5 µl	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Fettstift, Super PAP-Pen Fettstift, ImmEdge Pen	Science Services, München Vector Laboratories, Burlingame, USA
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Hämatokrit-Kapillaren	Sanguis Counting, Nümbrecht
Hämatokrit-Versiegelungskitt	Brand, Wertheim
Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Kanülen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Magnet IMag™	BD Biosciences, Heidelberg

Mehrzweckbehälter 30 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Multiwellplatten 96er	Sarstedt, Nümbrecht
Nahtmaterial Vicryl	Ethicon, Norderstedt
Niedrigsalzfutter (0,03 % NaCl)	Ssniff, Soest
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Paraffin	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Nerbe, Winsen Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand, Wertheim
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Spritzen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zellsiebe	Falcon®, Corning Incorporated, Corning, USA

2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase A	Roche, Mannheim
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, München
DNA Längenstandard 100bp plus DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich, München
Eindeckmedium ProLong Gold	Thermo Scientific, Waltham, USA
Eindeckmedium VectaMount	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Elisa-Kit ANG I	IBL International, Hamburg
Elisa-Kit Erythropoietin	R&D Systems, Minneapolis, USA
Enalapril maleat	Sigma-Aldrich, München

Essigsäure 100%	Sigma-Aldrich, München
Ethanol p.a.	Honeywell, Morris Plains, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First-Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Carlsbad, USA
FITC-Sinistrin	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Formaldehyd-Lösung (mind. 37%)	Merck, Darmstadt
Furosemid	Dimazon, Intervet, Unterschleißheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycergel mounting medium (IF)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Glycerin 87 %	AppliChem, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5 u/μl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x	Promega, Mannheim
Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, München
HCl 1N	Merck, Darmstadt
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	Sigma-Aldrich, München
Horse serum	Gibco, Life technologies, Grand Island, USA
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol, p.a.	AnalaR Normapur, VWR, Radnor, USA
KCl	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Ketamin 10%	bela-pharm, Vechta
Lightcycler 480® SYBR Green Master PCR Kit	Roche, Mannheim
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transkriptase, 200 U/μl	Promega, Mannheim
NaCl	Merck, Darmstadt
NaCl 0,9% Lösung (steril)	B. Braun, Melsungen
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, München
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, München
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt

NaOH 1N	Merck, Darmstadt
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0,5 µg/µl	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Paraplast-Plus Paraffin	Roth, Karlsruhe
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Mannheim
RNAscope® H ₂ O ₂ & Protease Plus Reagenzien	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Multiplex Fluorescent v2 Assay	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Target Retrieval Reagenzien	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Waschpuffer	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Roti®-Safe GelStain	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Affymetrix, Cleveland, USA
TRIstore®-Reagenz	Bioline, Luckenwalde
Opal Fluorophore Reagent Packs (Opal 520, Opal 570, Opal 690)	Akoya Biosciences, Marlborough, USA
Xylazin 2%	Serumwerk, Bernburg
Xylol	Merck, Darmstadt
Xylol (für RNAscope®)	AppliChem, Darmstadt

2.1.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Chemikalien für Puffer und Lösungen in Reinstwasser (MilliQ-Wasser) gelöst.

Fixierlösung für Perfusion, pH 7,4 (für Immunfluoreszenz)

Dulbecco's PBS	
Paraformaldehyd	3%

Fixierlösung für Perfusion, pH 7,0
(für in-situ Hybridisierung)

Formalin (37-40 % stock solution)	10%
NaH ₂ PO ₄	33,3 mM
Na ₂ HPO ₄	45,8 mM

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

K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
NaCl	140 mM

KH ₂ PO ₄	2,5 mM
---------------------------------	--------

Stammlösung für Immunfluoreszenz

PBS-Otto

BSA (bovines Serumalbumin)	1%
----------------------------	----

Blockierlösung für Immunfluoreszenz

PBS-Otto	
BSA (bovines Serum-Albumin)	1%
Pferde-Serum	10%

TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer, pH 8,5

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

Agarosegel

TAE	
Agarose	2%
Roti®-GelStain	0,02‰

HEPES Puffer für GFR, pH 7,4

HEPES	0,5 M
-------	-------

FITC Injektionslösung für GFR

NaCl Lösung 0,9%, steril	
FITC-Sinistrin	1%

NaOH (für gDNA-Extraktion)

NaOH	25 mM
------	-------

Tris-HCl, pH 8,0 (für gDNA-Extraktion)

Tris-HCl	1 M
----------	-----

Maleatpuffer, pH 6,0

Tris	33,5 mM
Maleinsäure	50 mM
EDTA	10,1 mM

PBS, pH 7,4 (für Glomerulus-Präparation)

NaCl	136,9 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

Puffer A1, pH 8 (für Glomerulus-Präparation)

NaH ₂ PO ₄	19 mM
Na ₂ HPO ₄	81 mM

Blockierlösung (für Glomerulus-Präparation)

Puffer A1	
BSA	0,5%

HBSS (Hank's buffered salt solution)
(für Glomerulus-Präparation)

NaCl	137 mM
KCl	5,4 mM
Na ₂ HPO ₄	0,25 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
Glucose	0,6 mM
CaCl ₂	1,3 mM
MgSO ₄	1,0 mM
NaHCO ₃	4,2 mM

Collagenase A-Lösung (für Glomerulus-Präparation)

HBSS	
Collagenase A	0,1%

2.1.5 Primer

Die Primer für die Genotypisierungs-PCR und die quantitative Realtime-PCR wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) in gewünschter Nukleotidsequenz synthetisiert und als lyophilisiertes Pulver geliefert. Durch Lösen in nukleasefreiem Wasser wurden die Primer auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Primer für Genotypisierungen

Konstrukt	Primer	Sequenz (5' → 3')	Produktgröße
AT _{1A} ^{flox}	s	ATCAGCACATCCAGGAATG	1500 bp = flox 1400 bp = wt
	as	GCTTTCTCTGTTATGCAGTCT	
AT _{1B} ^{-/-}	s 1	TCCAAGATGACTGCCCCAAG	952 bp = wt 700 bp = ko
	s 2	TGGCGGACCGCTATCAGGAC	
	as	GATAACCCTGCATGCGACCT	
FoxD1 ^{+/-Cre}	s 1	CTCCTCCGTGTCCTCGTC	450 bp = Cre 237 bp = wt
	s 2	TCTGGTCCAAGAATCCGAAG	
	as	GGGAGGATTGGGAAGACAAT	
Ren1d ^{+/-Cre}	s	GAA GGA GAG CAA AAG GTA AGA G	400 bp = Cre 600 bp = wt
	as 1	GTAGTAGAAGGGGGAGTTGTG	
	as 2	TTGGTGTACGGTCAGTAAATTGGAC	

Primer für quantitative Realtime-PCR

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')
AT _{1A}	s	TCACCAGATCAAGTGCATTTTGA
	as	AGAGTTAAGGGCCATTTTGCTTT
F4/80	s	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGT
	as	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
Fibronektin	s	TCCAGCCCCACCCTACAAGT
	as	CCAGACCAAACCATAAGAAC
GAPDH	s	CACCAGGGCTGCCATTTGCA
	as	GCTCCACCCTTCAAGTGG
Kollagen 1	s	CTGACGCATGGCCAAGAAGA
	as	ATACCTCGGGTTTCCACGTC
Renin	s	ATGAAGGGGGTGTCTGTGGGGTC
	as	ATGTCGGGGAGGGTGGGCACCTG
RPL32	s	TTAAGCGAAACTGGCGGAAAC
	as	TTGTTGCTCCCATAACCGATG

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Hersteller	Verdünnung
Mouse-anti-Glattmuskelaktin (α -SMA)	Abcam, Cambridge, UK	1:600
Chicken-anti-Renin	Davids Biotechnologie, Regensburg	1:400

Sekundäre Antikörper

Name	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
Donkey-anti-mouse	Cy5	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-chicken	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400

2.1.7 Sonden für in-situ Hybridisierung

Alle Sonden wurden von Advanced Cell Diagnostics (Hayward, USA) für die RNAscope® Anwendung bezogen.

Mus musculus	Rattus norvegicus
2.5 Duplex Positive Control Probe-Mm	Positive Control Probe-Rn-Ppib
Acta2 (α -SMA) C1 & C2	Acta2 (α -SMA)
Agtr1a-01 C1 & C2	Agtr1a-C2
Agtr1b C1 & C2	Agtr1b
Aqp-2 C3	
Calb1	
CD31 (Pecam1)	
Cox2 (Ptgs2)	
Cubn-C2	
	Homo sapiens
Nphs1-C2	Positive Control Probe Hs-PPIB
NKCC2 (Slc12a1)	AGTR1
Pdgfrb-C2	AGTR1-No-XMm-C2
Ren1 C2 & C3	SLC5A2 (SGLT2)
Scnn1A (ENaC)	PDGFRB-C2
Slc5a2 (SGLT2)	REN

2.1.8 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit *Microsoft Office 2016* geschrieben. Als Software für die Fluoreszenzmikroskopie diente *ZEN blue* von Zeiss. Für die Bearbeitung der Bilder wurden *ZEN blue* und *Adobe Photoshop CS5* verwendet. Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 8* erstellt. Für die Internetrecherche wurde PubMed von *NCBI* (The National Center for Biotechnology Information) verwendet. Als Zitierprogramm wurde die Zotero Software (Version 5.0.65) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Verwendete Mauslinien

Alle Tierexperimente wurden entsprechend den „Guidelines for the care and use of laboratory animals“ der National Institutes of Health durchgeführt und von den lokalen Tierschutzbehörden genehmigt. Es wurde auf optimale Haltungsbedingungen geachtet (Temperatur $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$, Hell-/Dunkelintervall 12 h, Futter und Wasser ad libitum).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet:

- $\text{AT}_{1\text{B}}^{-/-}$: Mauslinie mit systemischer $\text{AT}_{1\text{B}}$ -Rezeptordeletion.¹¹²
- $\text{Ren1d}^{+/Cre} \times \text{AT}_{1\text{A}}^{\text{fl/fl}}$ (Eigenzucht)
 - $\text{Ren1d}^{+/Cre}$: Insertion der Cre-Rekombinase in den Ren1d -Lokus (Knock-in), was zur Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen Reninpromotors führt.⁴⁰
 - $\text{AT}_{1\text{A}}^{\text{fl/fl}}$: Mauslinie mit geflochten $\text{AT}_{1\text{A}}$ -Rezeptor-Allelen.³
- $\text{Ren1d}^{+/Cre} \times \text{AT}_{1\text{A}}^{\text{fl/fl}} \times \text{AT}_{1\text{B}}^{-/-}$ (Eigenzucht)
- $\text{FoxD1}^{+/Cre} \times \text{AT}_{1\text{A}}^{\text{fl/fl}} \times \text{AT}_{1\text{B}}^{-/-}$ (Eigenzucht)
 - $\text{FoxD1}^{+/Cre}$: Knock-in Mauslinie, die unter Kontrolle des FoxD1 -Promotors ein Fusionsprotein aus eGFP und Cre-Rekombinase exprimiert ($\text{Foxd1}^{\text{tm1(GFP/cre)Amc}}$ von Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA).¹¹⁴

Die verwendeten Tiere werden in der Arbeit wie folgt bezeichnet:

- $\text{AT}_{1\text{B}}^{-/-}$: $\text{AT}_{1\text{B}}$ -KO
- $\text{Ren1d}^{+/Cre} \times \text{AT}_{1\text{A}}^{\text{fl/fl}}$: Ren- $\text{AT}_{1\text{A}}^{\text{fl/fl}}$
- $\text{Ren1d}^{+/Cre} \times \text{AT}_{1\text{A}}^{\text{fl/fl}} \times \text{AT}_{1\text{B}}^{-/-}$: Ren- $\text{AT}_{1\text{ko}}$
- $\text{FoxD1}^{+/Cre} \times \text{AT}_{1\text{A}}^{\text{fl/fl}} \times \text{AT}_{1\text{B}}^{-/-}$: FoxD1- $\text{AT}_{1\text{ko}}$

2.2.1.2 Genotypisierungen

Alle verwendeten Tiere wurden mittels PCR genotypisiert. Dafür wurde die DNA aus Gewebeproben von Ohrlochstanzungen nach folgendem Protokoll isoliert:

- Zugabe von 50 µl NaOH (25 mM)
- Inkubation bei 96°C für 1h im Thermocycler
- Zugabe von 10 µl Tris-HCl (1M, pH8)
- Zentrifugation für 6 min bei 10000 rpm

Für die PCR wurden jeweils 0,5 µl der extrahierten DNA und 25 µl des folgenden Mastermixes eingesetzt:

Reaktionsansatz	Volumen für 1 Probe
Puffer (GoTaq buffer green)	5 µl
Primer (je 10 pmol/µl)	je 0,75 µl
dNTPs (2,5 mM)	2 µl
GoTaq-Polymerase	0,2 µl
dd H ₂ O	ad 25 µl

Es wurden folgende Protokolle für die Amplifizierung verwendet:

	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Aktivierung	94°C	5 min	35-36 Zyklen
Denaturierung	94°C	30-60 s	
Annealing	x°C	30-60 s	
Elongation	72°C	45-120 s	
Elongation	72°C	10 min	
Lagerung	4°C	∞	

PCR	Annealing-Temperatur
AT _{1A} ^{flox}	52°C
AT _{1B}	61,5°C
Ren1d ^{+/Cre}	56°C
FoxD1 ^{+/Cre}	58°C

Nach der Amplifikation wurden die Proben auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Mittels Gelelektrophorese wurden die einzelnen DNA-Fragmente ihrer Größe nach bei 130 Volt aufgetrennt.

2.2.1.3 Stimulations- und Suppressionsversuche

Zur Stimulation der Reninsekretion wurde den Versuchstieren über einen Zeitraum von 14 Tagen eine Niedrigsalzdiät (0,03% NaCl) in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril (50 mg/kg im Trinkwasser) verabreicht. Einer anderen Versuchsgruppe wurde über eine Dauer von 7 Tagen das Schleifendiuretikum Furosemid (2,28 mmol/l im Trinkwasser) gegeben. Zur Suppression der Reninproduktion wurde ANG II ($2,5 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{KG}} \cdot \text{min}^{-1}$) über einen Zeitraum von 10 Tagen mittels osmotischer Minipumpen verabreicht.

2.2.1.4 Osmotische Minipumpen

Die Wirkungsweise der osmotischen Minipumpen basiert auf dem Prinzip einer osmotischen Druckdifferenz zwischen dem inneren Kompartiment der Pumpe und dem umliegenden Gewebe. Durch die hohe Osmolarität des inneren Kompartiments diffundiert das Wasser durch die semipermeable Membran auf der Oberfläche der Pumpen. Erreicht das Wasser das innere Kompartiment, wird der Wirkstoff über den sog. *Flow Moderator* aus der Pumpe abgegeben. Dadurch kann eine gleichmäßige und kontinuierliche Abgabe mit der zuvor festgesetzten Konzentration des Wirkstoffes gewährleistet werden (Abb. 3).

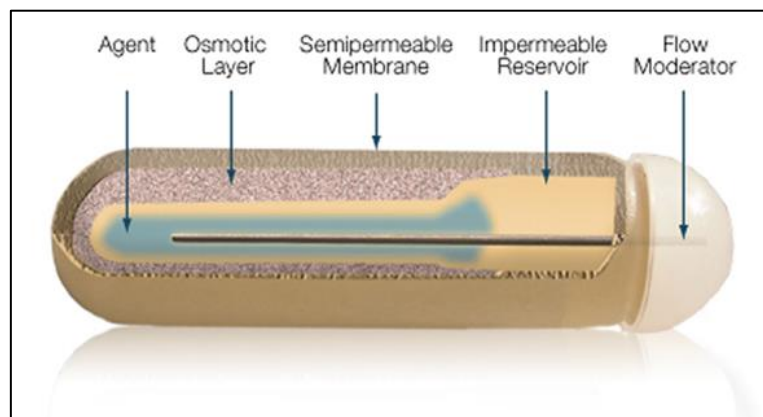


Abbildung 3. Schematische Darstellung und innerer Aufbau einer osmotischen Minipumpe.
Abbildung von Alzet®¹¹⁵

Vor der Implantation wurden die Minipumpen mit ANG II (gelöst in 0,5 M NaCl und 1 mM Essigsäure) befüllt und anschließend unter Isofluran-Narkose subkutan in den Rücken der Tiere implantiert. Nach der Implantation gaben die Minipumpen kontinuierlich eine ANG II-Konzentration von $2,5 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{KG}} \cdot \text{min}^{-1}$ über einen Zeitraum von 10 Tagen ab.

2.2.1.5 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate wurde die fluoreszierende Substanz Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Sinistrin in den retrobulbären Venenplexus injiziert und anschließend die Elimination verfolgt.¹¹⁶

Die Mäuse wurden vor der Injektion einer 1%-FITC-Sinistrin-Lösung (3,74 µl pro Gramm Körpergewicht) für 2 Minuten (min) narkotisiert. Zu den Zeitpunkten 3, 7, 10, 15, 35, 55 und 75 min nach Injektion wurde mittels Schwanzvenen-Punktion 5 µl Blut entnommen. Dieses wurde in Na⁺-heparinisierte Kapillaren überführt und bei 1200 g für 7 min zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde in HEPES Puffer verdünnt und die Fluoreszenz mit dem Qubit™ 3.0 Fluorometer gemessen. Die Berechnung der GFR erfolgte mittels Verwendung des Zwei-Kompartiment-Modells.

2.2.1.6 Messung des systolischen Blutdrucks

Die Messung des Blutdrucks erfolgte mittels Tail-cuff Methode. Nach einer Gewöhnungsphase in der Messkammer wurde den Mäusen eine Blutdruckmanschette und ein Pulsmesser am Schwanz angelegt. Anschließend wurden 5 Messungen vorgenommen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert aus diesen 5 Messungen pro Tier bestimmt. Nachdem die Mäuse nach einigen Tagen an die Kammern gewöhnt waren, wurden die Messungen an mindestens 6 aufeinander folgenden Tagen jeweils um die gleiche Uhrzeit durchgeführt.

2.2.1.7 Bestimmung von Osmolarität und Natrium/Kalium-Konzentration im Urin

Die Osmolarität des Urins wurde mittels Gefrierpunktniedrigung bestimmt. Der Urin wurde 1:10 in Millipore-H₂O verdünnt und mit dem Osmomat 030 vermessen. Die Konzentrationen von Natrium und Kalium wurden mittels Flammenphotometrie bestimmt. Dazu wurden die Urinproben 1:1000 mit Millipore-H₂O verdünnt und in Duplikaten vermessen.

2.2.2 Humanes Nierengewebe und Nierengewebe von Ratten

Das humane Nierengewebe wurde vom Institut für Nephropathologie (Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um archiviertes Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe. Die Proben zeigten keine Anzeichen für renale Erkrankungen und stammten von distalen Regionen in Nieren, die aufgrund eines lokalen Neoplasmas operativ entfernt wurden. Die Analyse der archivierten renalen Biopsien wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Referenznummer 4415). Die für die Lokalisationsstudie verwendeten Rattennieren stammten von adulten

männlichen Sprague-Dawley Ratten. Diese wurden analog zu den Mäusen perfundiert und die Nieren entsprechend für die in-situ Hybridisierung eingebettet.

2.2.3 Fixierung des Nierengewebes

2.2.3.1 Retrograde arterielle Perfusion

Die Fixierung der Maus- und Rattennieren erfolgte durch retrograde arterielle Perfusion mit 10% NBF-Lösung (bzw. 3% PFA für Immunfluoreszenz). Die Tiere wurden mit einer Mischung aus Ketamin (80 mg/kg) und Xylazin (16 mg/kg) narkotisiert. Nach Öffnung des Bauchraums wurde die Aorta freipräpariert und die Arteria renalis der linken Niere abgebunden, damit eine Niere für mRNA Analysen verwendet werden konnte. Die Aorta wurde unterhalb der Abzweigung der Arteria renalis abgeklemmt und distal der Klemme geöffnet. Der Perfusionskatheter wurde in der Bauchaorta fixiert und die Gefäßklammer entfernt. Dann wurde die Vena cava zum Druckausgleich geöffnet und es erfolgte die Perfusion mit konstantem Fluss von 13 ml/min zuerst mit 40 ml PBS und anschließend mit 40 ml der Perfusionslösung. Die abgebundene Niere wurde entnommen und für die weitere mRNA-Analyse in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren. Die perfundierte Niere wurde 24-36 h bei Raumtemperatur (RT) in der Perfusionslösung (für RNAscope®) oder in 70% Methanol (4°C für Immunfluoreszenz) gelagert.

2.2.3.2 Einbettung in Paraffin

Die in 10% NBF oder in 70% Methanol gelagerten Nieren wurden in Einbettkassetten überführt und mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Einbettung mittels aufsteigender Alkoholreihe.

Immunfluoreszenz	In-situ Hybridisierung (RNAscope®)	
70% Methanol	70% Ethanol	2 x 30 min, RT
80% Methanol	80% Ethanol	2 x 30 min, RT
90% Methanol	90% Ethanol	2 x 30 min, RT
100% Methanol	100% Ethanol	2 x 30 min, RT
100% Isopropanol		2 x 30 min, RT
100% Isopropanol		1 x 30 min, 45°C
1:1 Isopropanol/Paraffin		1 x 30 min, 60°C
Paraffin		2 x 24 h, 60°C

Die Nieren wurden anschließend in Paraffin gefüllte Silikon-Formen überführt und darin bei RT über Nacht ausgehärtet.

2.2.3.3 Anfertigen von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke mit den eingebetteten Nieren wurden mit einer Rasierklinge zugeschnitten. Mithilfe des Rotationsmikrotoms wurden jeweils 5 µm dünne Schnitte angefertigt. In einem Wasserbad (40°C) wurden die Schnitte auf Objektträger aufgetragen und über Nacht bei RT getrocknet.

2.2.4 In-situ Hybridisierung

Die in-situ Hybridisierung wurde mit dem RNAscope® Multiplex Fluorescent v2 Assay von ACDBio durchgeführt.¹¹⁷ Dafür wurden die Paraffinschnitte für 1 h im Brutschrank bei 60°C inkubiert. Anschließend folgte die Entparaffinierung für 2 x 5 min in Xylol und 2 x 2 min in 100% Ethanol. Die Schnitte wurden 5 min bei 60°C getrocknet und anschließend für 10 min bei RT mit Wasserstoffperoxid bedeckt. Nach einem Waschschrift mit H₂O wurden die Objektträger für 15 min in Target Retrieval-Lösung gekocht. Anschließend folgte ein Waschschrift in H₂O und 3 min in 100% Ethanol. Dann wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und über Nacht bei RT getrocknet. Die Schnitte wurden mit Protease Plus bedeckt und für 30 min im Hybridisierungssofen bei 40°C inkubiert. Nach einem Waschschrift in H₂O wurden sie mit der jeweiligen Hybridisierungssonde bedeckt und für 2 h bei 40°C inkubiert. Anschließend folgte die Amplifizierung nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Detektion wurden die Fluorophore von Akoya Biosciences nach den Angaben von ACDBio verwendet. Die Kerne wurden mithilfe einer im Kit enthaltenen DAPI-Lösung sichtbar gemacht.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Vor der Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dafür wurde folgende absteigende Alkoholreihe verwendet:

Lösung	Zeit
Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
100 % Isopropanol	5 min
96 % Isopropanol	5 min
80 % Isopropanol	5 min
70 % Isopropanol	5 min

Die Objektträger wurden anschließend dreimal in PBS-Otto für jeweils 10 min gewaschen. Das Blockieren der unspezifischen Bindungen mit 10% Horse serum in PBS-Otto und 1% BSA erfolgte für 20 min. Die primären Antikörper wurden in der Blockierlösung entsprechend verdünnt, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS-Otto (3 x 10 min) wurden die verdünnten sekundären Antikörper auf die Schnitte pipettiert und es folgte eine Inkubation von 90 min unter Lichtausschluss bei RT. Danach wurde wieder dreimal für 10 min in PBS-Otto gewaschen. Anschließend konnten die Präparate mit dem Einbettmedium eingedeckelt werden.

2.2.6 Mikroskopische Aufnahmen

Die Aufnahmen der Nierenschnitte erfolgten mithilfe des AxioObserver.Z1 Mikroskops mit motorisierter Objektauflage, einer Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam 506 mono) für Immunfluoreszenz gefärbte Schnitte und Fluoreszenz in-situ Hybridisierung sowie einer Farbkamera (AxioCam305 color) für immunhistochemisch gefärbte Schnitte zusammen mit der Software ZEN lite (2012) von Zeiss. Die Nierenübersichten wurden mithilfe von Kachelaufnahmen in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Farbstoffe der verwendeten sekundären Antikörper wurden unter Zuhilfenahme passender Fluoreszenzfilter angeregt und das entstandene Emissionslicht im jeweiligen Spektralbereich aufgenommen.

Konjugation	Anregung (nm)	Emission (nm)
Cy2	450 – 490	500 – 550
TRITC	533 – 558	570 – 640
Cy5	625 – 655	665 – 715
DAPI	335 – 383	420 – 470

2.2.7 Isoliert perfundierte Mausniere

Die Methode der isoliert perfundierten Niere wurde entsprechend dem Protokoll von Schweda et al. durchgeführt.¹¹⁸ Die Nieren wurden ex situ mit einer modifizierten Krebs-Henseleit Lösung mit 6 g/100 ml BSA und humanen roten Blutkörperchen (10% Hämatokrit) mit einem konstanten Druck von 90 mmHg perfundiert. Für die Bestimmung der Reninsekretion wurden alle 2 Minuten drei Proben des venösen Rückflusses während jeder experimentellen Periode genommen. Die Reninaktivität im venösen Rückfluss wurde bestimmt, indem das Perfusat mit Plasma von bilateral nephrektomierten männlichen Ratten als Reninsubstrat für 90 min bei

37°C inkubiert wurde. Das produzierte ANG I (ng/ml/h) wurde mittels ELISA (s. 2.2.12.2) bestimmt.

2.2.8 Glomerulus-Präparation

Die Isolierung der Glomeruli erfolgte mittels magnetischer Partikel (Dynabeads), einer Methode, die erstmals von Takemoto und Kollegen beschrieben wurde.¹¹⁹ Dafür wurden die Mäuse mit 2×10^9 blockierten Dynabeads M-450 Epoxy (verdünnt in PBS) über die Bauchorta perfundiert. Eine Hälfte der linken Niere wurde für die weitere mRNA Analyse in Stickstoff eingefroren. Die andere Hälfte der linken Niere und die rechte Niere wurden in etwa 1 mm^3 kleine Teile geschnitten und mit Kollagenase A (1 mg/ml in HBSS) bei 37°C für 30 min verdaut. Danach wurde das Gewebe vorsichtig durch ein $100 \text{ }\mu\text{m}$ Zellsieb gedrückt. Die gefilterten Zellen wurden in ein Falcon überführt und an einem Magneten platziert. Dadurch konnten die Glomeruli, die die Dynabeads enthielten, abgefangen werden. Nach 10 min wurde die Lösung vorsichtig abgenommen und das Falcon vom Magneten genommen. Die Glomeruli wurden mit 7 ml PBS gewaschen. Bei einigen weiteren Waschschritten wurde das Volumen immer weiter reduziert und die Glomeruli anschließend in 1 ml TRIsure® aufgenommen. Nach kurzer Inkubation von 5 min bei RT wurden das Cup mit den Glomeruli für 1 min in ein Ultraschallbad gehalten und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.2.9 Isolierung der RNA

Die Isolierung der RNA basierte auf der Guanidinthiocyanat-Phenol Chloroform-Methode.¹²⁰ Die Homogenisierung der Nierenhälften erfolgte in 1 ml TRIsure®. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden 200 μl Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert (13000 rpm für 30 min; 4°C) und vom entstandenen Mehrphasengemisch wurde die wässrige Phase abgenommen und zu 500 μl Isopropanol pipettiert. Nach Zentrifugation für 30 min (13000 rpm; 4°C) wurde der Überstand verworfen und die in einem Pellet vorliegende RNA mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Proben für 15 min getrocknet. Das Pellet wurde in Millipore-Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.10 Reverse Transkription

Der RNA-Gehalt der Proben wurde am Nanodrop Photometer gemessen. Dabei wurde das Verhältnis der optischen Dichte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt und nur Proben mit einem Wert über 1,8 für die reverse Transkription eingesetzt. Für die Synthese der

cDNA wurde ein Ansatz aus 1 µg RNA, 1 µl Oligo dT₁₅-Primer und MilliQ-H₂O (ad 10 µl) pipettiert und 5 min bei 65°C inkubiert. Es folgten 10 µl von folgendem Mastermix:

- 4 µl 5x First Strand Puffer
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Reverse Transkriptase
- 4 µl MilliQ-H₂O

Die Proben wurden für 1 h bei 37°C inkubiert, für 2 min auf 95°C geheizt und anschließend mit 35 µl MilliQ-H₂O verdünnt.

2.2.11 Quantitative Realtime PCR

Für die quantitative Realtime-PCR (qPCR) wurde der LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix Kit verwendet. Dabei wurde pro Probe 1 µl cDNA und 9 µl des folgenden Ansatzes eingesetzt:

- 5 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master
- 1 µl Primer-Mix (sense + antisense)
- 3 µl MilliQ-H₂O

Nach einer 10-minütigen Aktivierung bei 95°C folgten 45 Amplifikationszyklen. Diese bestanden jeweils aus der Denaturierungsphase bei 95°C (15 s), der Annealingphase bei 62°C (20 s) und der Elongationsphase bei 72°C (20 s). Am Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen und nach Ablauf aller Zyklen wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Als Haushaltsgene dienten GAPDH und RPL32.

2.2.12 Bestimmung von Plasma-EPO Konzentration und Reninaktivität

Um die Plasma-EPO Konzentration und Reninaktivität bestimmen zu können, wurde adulten Mäusen Blut mittels Punktion der *Vena facialis* entnommen und in EDTA-Kapillaren überführt. Um ein Auslaufen zu verhindern, wurden die Kapillaren an einer Seite mit Versiegelungskitt verschlossen und 4 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.12.1 EPO ELISA

Die EPO-Konzentration im Plasma wurde quantitativ mithilfe eines Sandwich-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt. Das zu bestimmende Protein wird von einem spezifischen Antikörper auf der Wellplatte gebunden. Anschließend bindet ein zweiter Enzym-

gekoppelter Antikörper an das Protein. Durch Zugabe einer Substratlösung kommt es zu einer enzymatischen Reaktion, bei der ein farbiges Produkt entsteht. Das Abstoppen der Reaktion führt zu einem Farbumschlag. Die Farbintensität ist proportional zur gebundenen Proteinmenge.

Protokoll (laut Herstellerangaben):

- Verdünnung der Standardreihe (8 Verdünnungen von 0 pg/ml - 3000 pg/ml) und Plasmaproben (Verdünnung 1:5 - 1:220)
- Vorlegen von 50 µl Assay-Verdünnungslösung RD1W (Kit) in jedes Well
- Zugabe von 50 µl Standard oder Probe
- Inkubation für 2 h bei RT auf Schüttler (200 rpm)
- 5-mal waschen mit Waschpuffer (Kit)
- Zugabe von 100 µl Maus-EPO-Konjugat (Kit) pro Well
- Inkubation für 2 h bei RT auf Schüttler (200 rpm)
- 5-mal waschen mit Waschpuffer
- Zugabe von 100 µl Substratlösung (1:1-Mischung von Farbreagenz A und B) pro Well
- Inkubation für 30 min bei RT unter Lichtausschluss (Bildung eines blauen Farbstoffs)
- Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung (Kit) pro Well (Farbumschlag nach gelb)
- Messung der Farbintensität bei 450 nm und 540 nm
- Auswertung: Wert = (Messwert 540 nm) - (Messwert 450 nm) - (Blank-Wert)
- Standardkurve mit Trendlinie (lineare Funktion) generieren
- Berechnung der Plasma-EPO Konzentration anhand der Linearfunktion

2.2.12.2 Renin ELISA

Die Bestimmung der Reninaktivität erfolgte anhand der Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin I mithilfe eines kompetitiven Angiotensin I ELISAs. Als Quelle für das benötigte Angiotensinogen diente Plasma von bilateral nephrektomierten Ratten (Reninsubstrat), mit dem die Plasmaproben inkubiert wurden. Die entstandene Menge an Angiotensin I war proportional zum Gehalt an Renin in der untersuchten Probe.

Protokoll:

- Verdünnung der Plasmaproben mit Maleatpuffer (1:50)
- Zugabe von 26 µl Reninsubstrat, 10 µl Generationpuffer und 1 µl PMSF pro Probe
- Aufteilung der Proben in Warm- und Kaltwert (je 50 µl)
- Inkubation für 90 min: Kaltwert auf Eis; Warmwert bei 37°C

- Zugabe von 45 µl der Standardreihe (8 Verdünnungen von 0 ng/ml – 60 ng/ml) und der Proben in jedes Well
- Zugabe von 100 µl Angiotensin I-Biotin Konjugat pro Well
- Inkubation von 60 min bei RT auf Schüttler (200 rpm)
- 5-mal waschen mit Waschpuffer
- Zugabe von 150 µl Streptavidin-HRP Konjugat pro Well
- Inkubation von 30 min bei RT auf Schüttler (200 rpm)
- 5-mal waschen mit Waschpuffer
- Zugabe von 150 µl TMB-Substrat pro Well
- Inkubation von 12 min bei RT auf Schüttler (200 rpm)
- Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung pro Well
- Messung der Farbintensität bei 450 nm

Die Absorptionswerte sind dabei indirekt proportional zur Konzentration von Angiotensin I in der Probe. Die Auswertung der Angiotensin I Konzentration bzw. des Reningehaltes erfolgt mit Hilfe einer Standardkurve aus den bekannten Konzentrationen. Nach Abzug des Nullwertes wurde der Kaltwert vom Warmwert subtrahiert und unter Berücksichtigung der Verdünnung die Reninaktivität berechnet.

2.2.13 Statistische Auswertung

Die ermittelten Messwerte wurden jeweils als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt, sofern es nicht anders angegeben wird. Unter Verwendung des Student's t-Test wurde auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen getestet. Wurden mehrere Gruppen miteinander verglichen, wurde die Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni Post-hoc-Test angewandt, um signifikante Unterschiede ermitteln zu können. Werte mit $p \leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisation renaler AT₁-Rezeptoren

Um einen Überblick über die genaue Lokalisation der AT₁-Rezeptoren zu erhalten, wurde mithilfe der RNAscope® in-situ Hybridisierungstechnologie die mRNA Expression der renalen AT₁-Rezeptoren untersucht. Diese Methode erlaubt eine spezifische und sensitive Detektion der mRNA Expression auf Einzelzellebene. Zusätzlich konnten auch mRNAs verschiedener Gene gleichzeitig auf einem Schnitt detektiert werden, was die Lokalisation der renalen AT₁-Rezeptoren in den einzelnen Zelltypen der Niere anhand spezifischer Marker mRNAs ermöglicht. Es wurden sowohl Mausnieren, als auch die Nieren von Ratten und Menschen untersucht, um die Expressionsmuster der AT₁-Rezeptoren miteinander vergleichen zu können.

3.1.1 Expression der AT₁-Rezeptoren in Mausnieren

In Nagern können zwei Isoformen des AT₁-Rezeptors (AT_{1A} und AT_{1B}) unterschieden werden.^{121,122} Der AT_{1A}-Rezeptor ist dabei die dominante Isoform in der Niere, die in erster Linie für die Vermittlung der Effekte von ANG II verantwortlich ist.^{51,121–123}

Auf einer Übersichtsaufnahme eines Nierenschnitts von einem Wildtypier waren die Expressionssignale der AT_{1A}-Rezeptoren deutlich zu erkennen. Die Intensität der AT_{1A} mRNA Expression war am stärksten im kortikalen Bereich, wo die höchste Dichte in den Glomeruli zu finden war. Außerdem war eine AT_{1A}-Rezeptorexpression in interstitiellen Zellen und in Tubuluszellen sowohl im Kortex als auch in der äußeren Medulla zu sehen. Die Intensität der Rezeptoren in diesen Zellen war dabei in beiden Nierenzonen vergleichbar. Von der äußeren Medulla zur inneren Medulla nahm die Dichte der AT_{1A} mRNA Expression stetig ab. In der Papille konnte keine AT_{1A}-Rezeptorexpression mehr detektiert werden (Abb. 4).

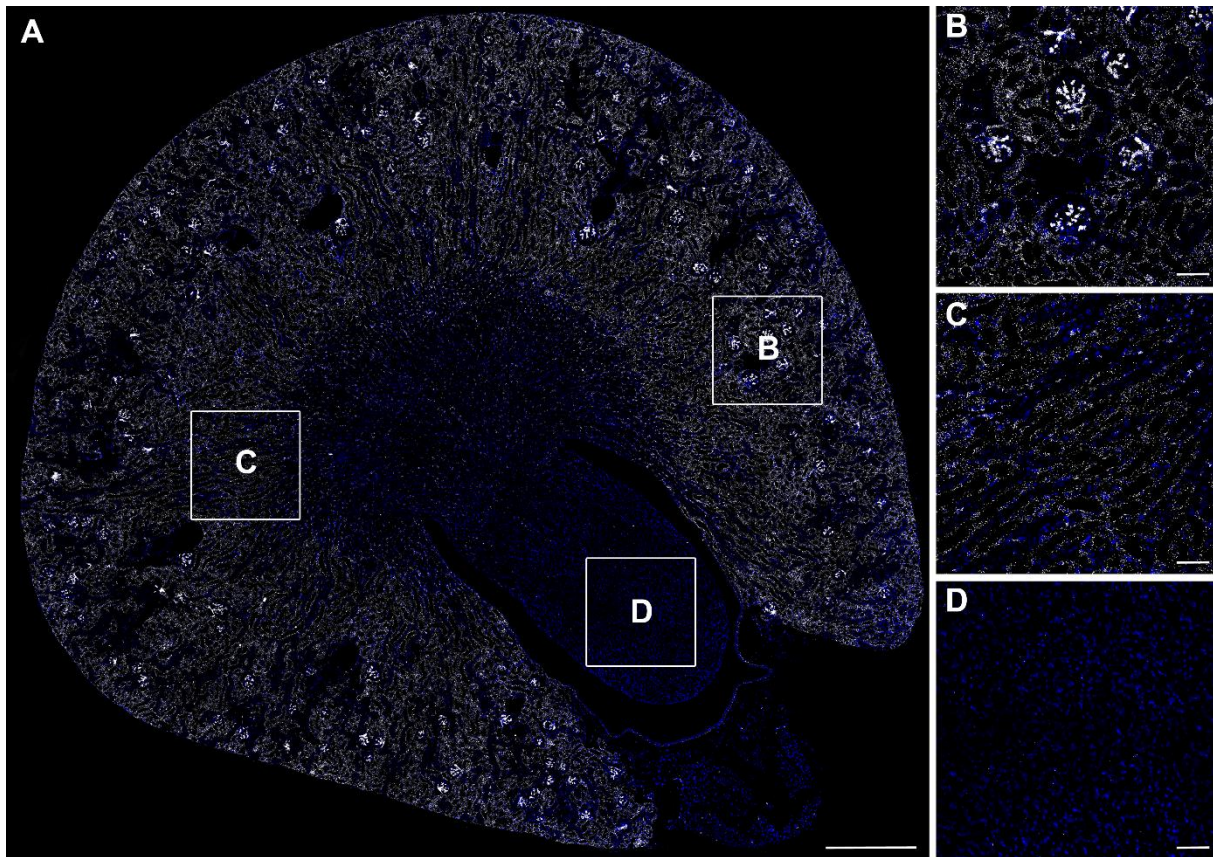


Abbildung 4. Übersicht der in-situ Hybridisierung zur Detektion der AT_{1A} mRNA (weiß) auf einem Nierenschnitt einer Wildtypmaus (A) und Ausschnitte aus verschiedenen Nierenzonen in höherer Vergrößerung (B-D). Die Dichte der AT_{1A} mRNA Expression nahm vom Kortex in Richtung innerer Medulla ab (A). Die Quadrate (B,C,D) markieren den jeweiligen Vergrößerungsausschnitt. Maßstabsbalken (A) 500 μ m.

Der kortikale Ausschnitt zeigte die stärkste Expression der AT_{1A} -Rezeptoren in den Glomeruli. Auch Tubuluszellen und interstitielle Zellen exprimierten AT_{1A} mRNA (B). In der äußeren Medulla wurden AT_{1A} -Rezeptoren in interstitiellen Zellen und Tubuluszellen detektiert (C). In der inneren Medulla war kein AT_{1A} mRNA Signal detektiert (D). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken (B-D) 50 μ m.

Um die Zellen, in denen eine AT_{1A} mRNA Expression detektiert werden konnte, eindeutig identifizieren zu können, wurden anschließend Kohybridisierungen mit verschiedenen Marker mRNAs durchgeführt.

Im Nierenkortex war die höchste Expressionsdichte der AT_{1A} -Rezeptoren in den Glomeruli zu finden. Um den Zelltyp der intraglomerulären Expression bestimmen zu können, wurde PDGFR- β als Marker für Mesangialzellen, Nephritin als Marker für Podozyten und CD31 als Marker für die Endothelzellen der Kapillarschlingen verwendet. Dabei konnte eine vollständige Koexpression von AT_{1A} mRNA und PDGFR- β mRNA festgestellt werden (Abb. 5A). Weder Nephritin (Abb. 5B) noch CD31 (Abb. 5C) zeigten eine überlappende Expression mit AT_{1A} -Rezeptoren. Somit konnte gezeigt werden, dass intraglomerulär nur die Mesangialzellen AT_{1A} -Rezeptoren exprimieren. Zusätzlich wurden starke Expressionssignale im juxtaglomerulären Bereich detektiert. Sowohl die PDGFR- β positiven extraglomerulären Mesangialzellen (Pfeile

in Abb. 5A) als auch die Renin-produzierenden Zellen (Abb. 6B) waren positiv für AT_{1A} -Rezeptorexpression.

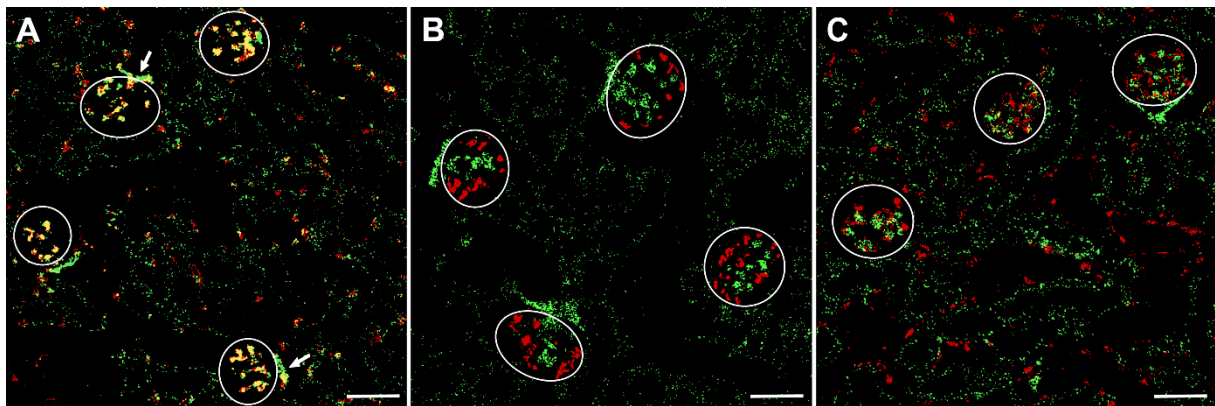


Abbildung 5. Kohybridisierung von AT_{1A} mRNA (grün) und Marker mRNAs (rot) für spezifische intraglomeruläre Zelltypen auf murinen Nierenschnitten. AT_{1A} mRNA kolokalisierte mit PDGFR- β mRNA (rot) als Marker für intra- und extraglomeruläre (Pfeile) Mesangialzellen und interstitielle Zellen (A). Es war keine Kolokalisation von AT_{1A} und Nephlin mRNA (rot) in den Glomeruli zu sehen (B). AT_{1A} und CD31 mRNA (rot), ein Marker für endotheliale Zellen, zeigten auch keine Kolokalisation (C). Die Kreise kennzeichnen Glomeruli. Maßstabsbalken 50 μ m.

Die Darstellung der Gefäße erfolgte durch Hybridisierung von *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) mRNA. Dabei konnte in der Kohybridisierung mit AT_{1A} mRNA in den späten afferenten und frühen efferenten Arteriolen eine Expression von AT_{1A} -Rezeptoren detektiert werden. Die AT_{1A} Expression nahm dabei zum glomerulären Gefäßpol hin an Intensität zu. Größere Gefäße zeigten jedoch keine Expression von AT_{1A} -Rezeptoren (Abb. 6A, 6C).

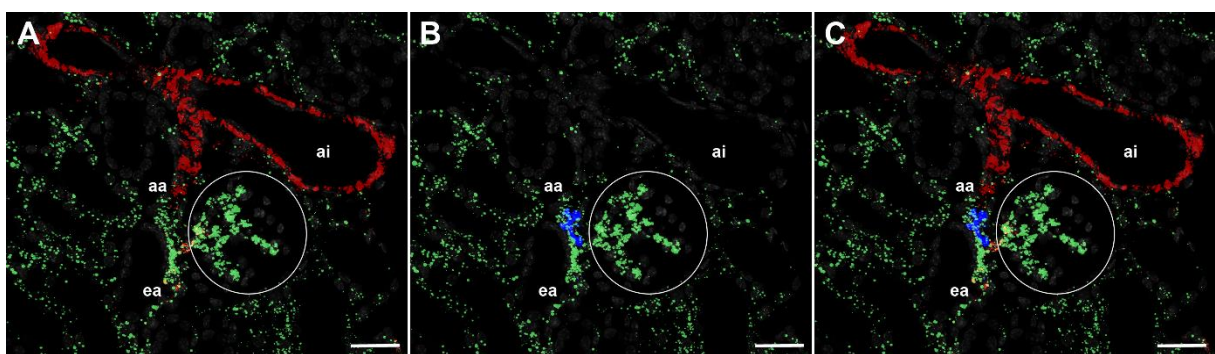


Abbildung 6. In-situ Hybridisierung der AT_{1A} (grün), α -SMA (rot) und Renin mRNA (blau) auf murinen Nierenschnitten. AT_{1A} -Rezeptorexpression konnte sowohl in afferenten als auch efferenten Arteriolen detektiert werden. In größeren Gefäßen war keine Expression der AT_{1A} -Rezeptoren detektierbar (A). Renin-produzierende Zellen (blau) zeigten eine deutliche AT_{1A} mRNA Expression (B). (C) zeigt die Überlagerung von AT_{1A} (grün), α -SMA (rot) und Renin mRNA (blau). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (grau). Die Kreise kennzeichnen Glomeruli. aa: afferente Arteriole; ea: efferente Arteriole; ai: Arteria interlobularis. Maßstabsbalken 20 μ m.

Die Differenzierung des Tubulussystems erfolgte anhand der Hybridisierung von spezifischen Markern für die einzelnen Tubulusabschnitte. Als Marker für den proximalen Tubulus wurde Cubilin verwendet. Dabei konnten die AT_{1A}-Rezeptoren in allen Segmenten des proximalen Tubulus lokalisiert werden (Abb. 7A).

Im Gegensatz dazu waren alle anderen Tubulusabschnitte, wie der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife, die Zellen der Macula densa, distale Tubuluszellen sowie Sammelrohre, negativ für die AT_{1A}-Rezeptorexpression (Abb. 7B-F). Da keine AT_{1A} mRNA in der inneren Medulla nachgewiesen werden konnte, ließ sich daraus indirekt auch eine Expression von AT_{1A}-Rezeptoren in den dünnen Teilen der Henle-Schleife ausschließen.

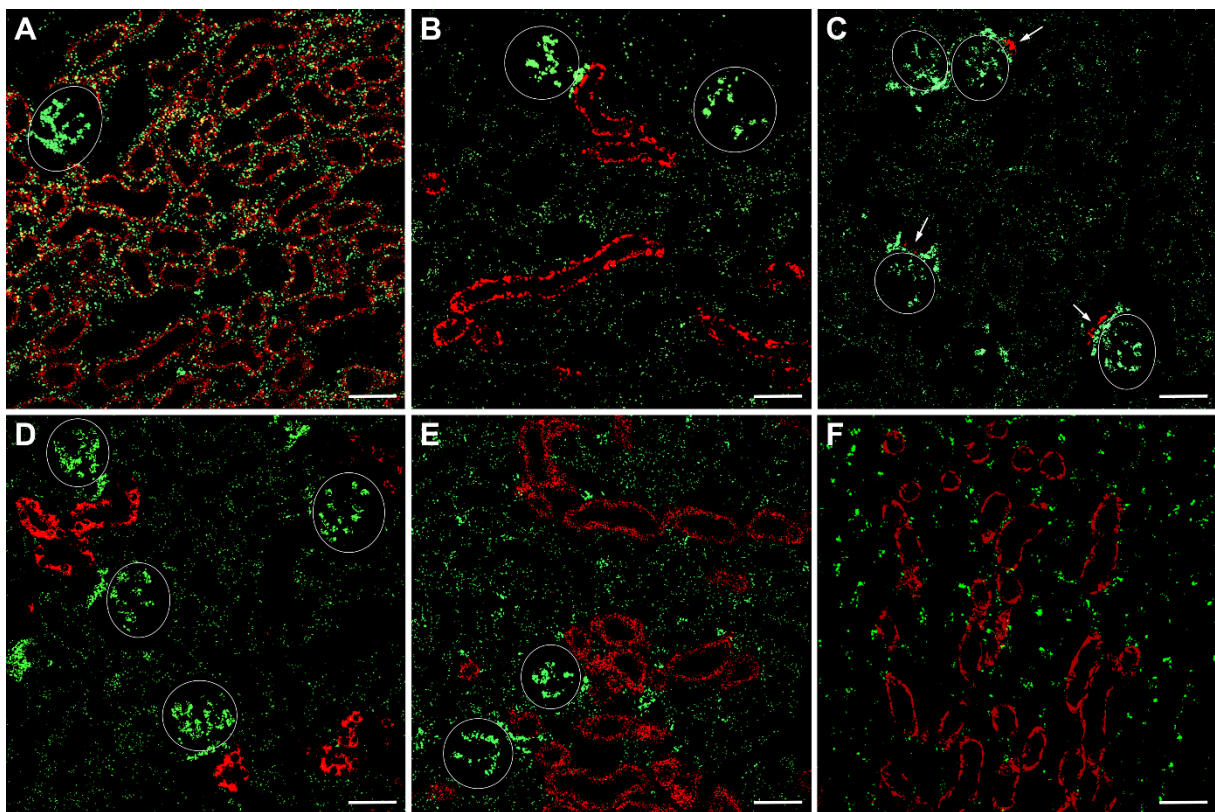


Abbildung 7. In-situ Hybridisierung der AT_{1A} mRNA (grün) mit verschiedenen Markern (rot) für spezifische Abschnitte des Tubulussystems auf murinen Nierenschnitten. Die in-situ Hybridisierung von AT_{1A} (grün) und Cubilin mRNA (rot) zeigte die Expression von AT_{1A}-Rezeptoren in proximalen Tubuluszellen (A). Die in-situ Hybridisierung von AT_{1A} (grün) und NKCC2 mRNA (rot) zeigte keine Lokalisation der AT_{1A}-Rezeptoren im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (B). AT_{1A} (grün) und Cox-2 mRNA (rot) zeigten keine überlappende Expression in den Macula densa Zellen (Pfeile) (C). AT_{1A} (grün) und Calbindin mRNA (rot) zeigten keine Lokalisation der AT_{1A}-Rezeptoren in Zellen des distalen Tubulus (D). Die in-situ Hybridisierung von AT_{1A} (grün) und ENaCa mRNA (rot; E) sowie AT_{1A} (grün) und AQP2 mRNA (rot; F) zeigte keine Expression der AT_{1A}-Rezeptoren in den Verbindungstubuli und Sammelrohren (E;F). Die Kreise kennzeichnen Glomeruli. Maßstabsbalken 50 µm.

Auf den Nierenschnitten von Mäusen konnten keine Signale für AT_{1B} -Rezeptoren detektiert werden. Als Positivkontrolle wurden daher Hybridisierungen auf Schnitten von murinen Nebennieren durchgeführt. Dort konnten sowohl Signale für den AT_{1A} -Rezeptor, als auch für den AT_{1B} -Rezeptor nachgewiesen werden (Abbildung 8).

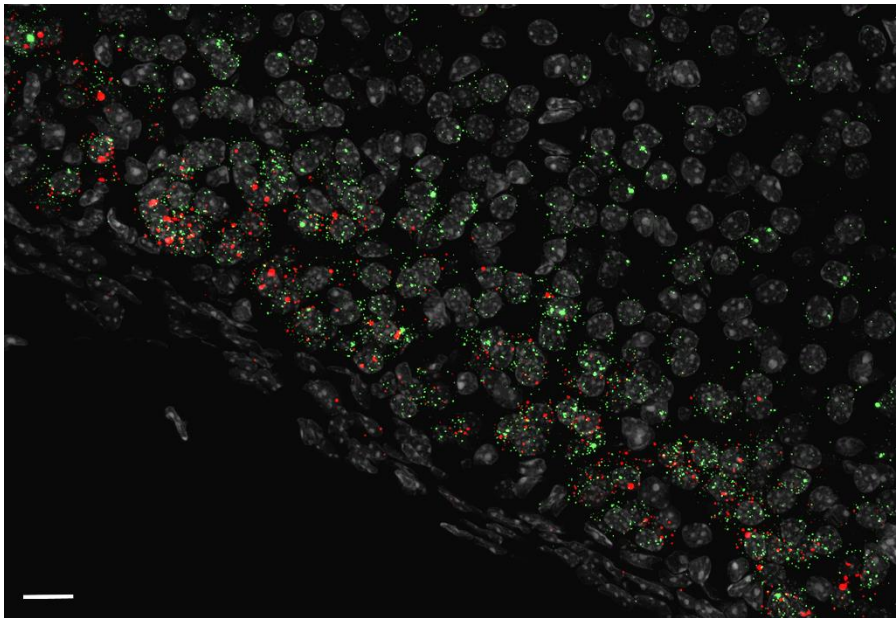


Abbildung 8. In-situ Hybridisierung der AT_{1A} mRNA (grün) und AT_{1B} mRNA (rot) auf einem Schnitt einer murinen Nebenniere. Es konnten beide Isoformen des AT_1 -Rezeptors in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde detektiert werden. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (grau). Maßstabsbalken 20 μ m.

3.1.2 Expression der AT₁-Rezeptoren in Rattennieren

Da das RAAS auch intensiv in Rattennieren untersucht wurde, wurde zusätzlich die Verteilung der AT₁-Rezeptoren in den Nieren von Ratten analysiert. Dabei konnten einige Parallelen im Expressionsmuster der AT_{1A}-Rezeptoren zwischen den Rattennieren und den Mausnieren festgestellt werden. In den Rattennieren war eine starke AT_{1A}-Rezeptorexpression in den Glomeruli zu sehen. Zudem konnte eine Expression in interstitiellen Zellen und Tubuluszellen detektiert werden. Im Gegensatz zu Mäusen war die Expression in den Tubuli jedoch deutlich schwächer (Abb. 9A). Zudem war die Intensität der AT_{1A} Expression nicht im Kortex, sondern in der äußeren Medulla am stärksten. Vor allem im äußeren Streifen der äußeren Medulla war die AT_{1A} Expression in den interstitiellen Zellen sehr dominant (Abb. 9B). In der inneren Medulla konnte keine AT_{1A} mRNA detektiert werden (Abb. 9C).

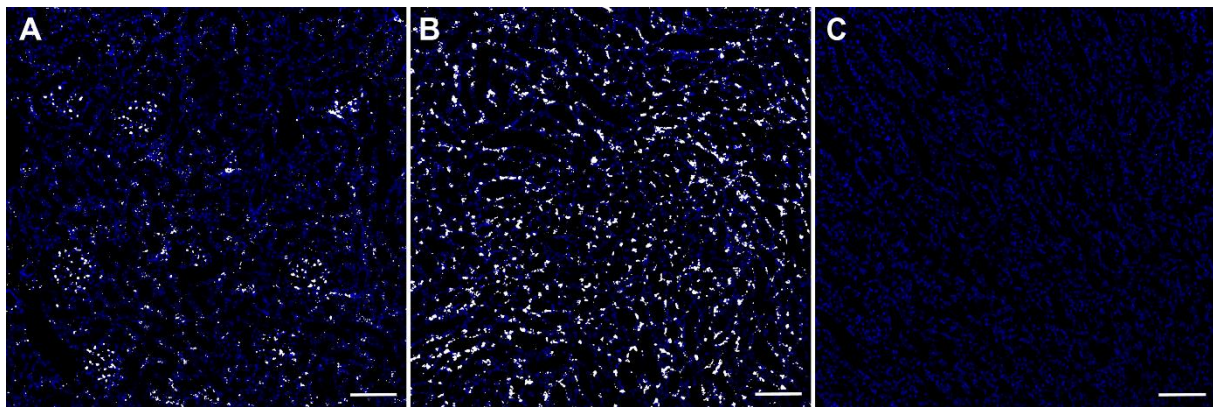


Abbildung 9. In-situ Hybridisierung der AT_{1A} mRNA (weiß) in verschiedenen Zonen einer Rattenniere. Im Kortex war eine starke AT_{1A} mRNA Expression in den Glomeruli zu finden. Die proximalen Tubuluszellen und interstitiellen Zellen zeigten eine schwache Expression der AT_{1A}-Rezeptoren (A). In der äußeren Medulla war die AT_{1A} Expression in interstitiellen Zellen am stärksten (B). Wie in Mäusen war keine AT_{1A} mRNA in der inneren Medulla detektierbar (C). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken 100 µm.

Auch in den intrarenalen Gefäßen der Ratten stimmte die Expression der AT_{1A}-Rezeptoren mit der von Mäusen überein. In den späten afferenten und frühen efferenten Arteriolen konnte die Expression des Rezeptors nachgewiesen werden (Abb. 10A). Die größeren Gefäße zeigten jedoch keine Expression von AT_{1A}-Rezeptoren. Ein Unterschied zu Mäusen war, dass in den Rattennieren eine ausgeprägte Expression der AT_{1A}-Rezeptoren in den Vasa recta zu sehen war (Abb. 10B).

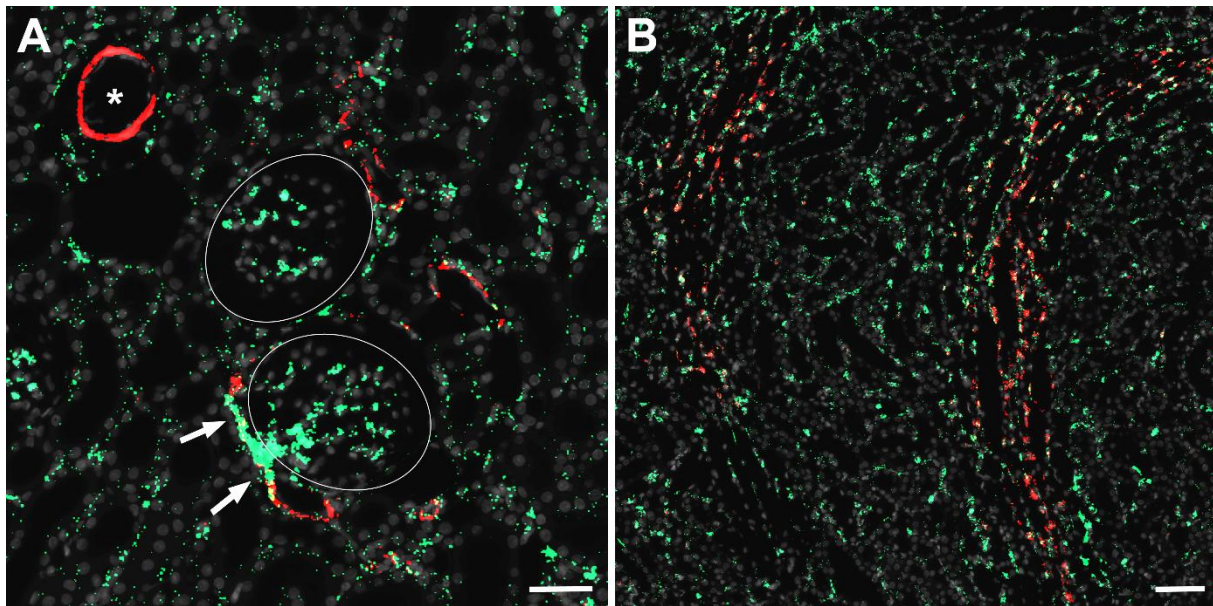


Abbildung 10. In-situ Hybridisierung der AT_{1A} (grün) und α-SMA mRNA (rot) auf einem kortikalen Ausschnitt (A) und einem Ausschnitt der äußeren Medulla (B) einer Rattenniere. Die AT_{1A}-Rezeptoren konnten sowohl in afferenten als auch efferenten Arteriolen detektiert werden (Pfeile). In größeren Gefäßen war keine Expression der AT_{1A}-Rezeptoren sichtbar (*) (A). Die Vasa recta in der äußeren Medulla zeigten eine Koexpression von α-SMA und AT_{1A} mRNA (B). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (grau). Die Kreise kennzeichnen Glomeruli. Maßstabsbalken 50 µm.

Im Gegensatz zu den Mausnieren konnten in Rattennieren beide Isoformen der AT₁-Rezeptoren nachgewiesen werden. Die AT_{1A}-Rezeptoren waren in intraglomerulären Mesangialzellen, interstitiellen Zellen und in Tubuluszellen zu finden (Abb. 11A). Für die AT_{1B}-Rezeptoren konnte ein deutliches Signal in den intraglomerulären Mesangialzellen detektiert werden (Abb. 11B). Dabei war die Intensität des Signals für die AT_{1B}-Rezeptoren in diesen Zellen sogar stärker als das der AT_{1A}-Rezeptoren (Abb. 11C).

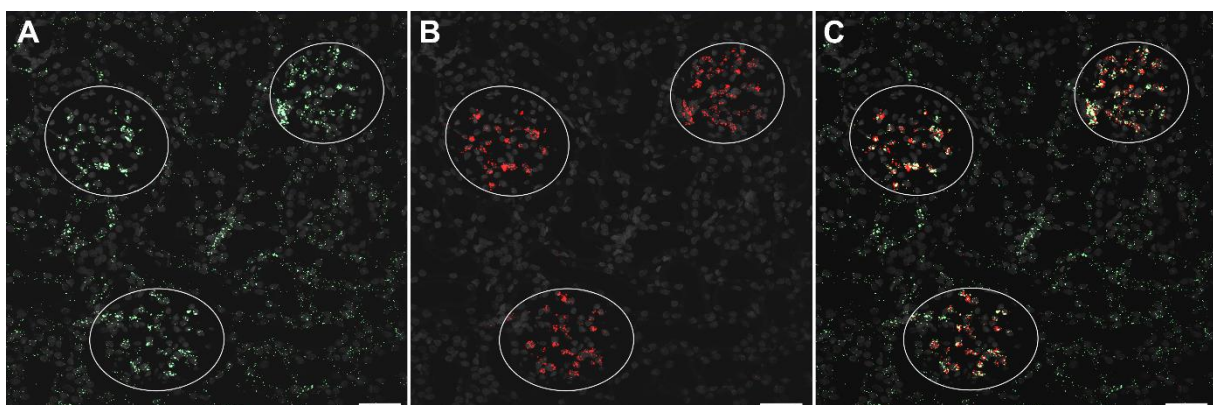


Abbildung 11. In-situ Hybridisierung der AT_{1A} mRNA (grün, A), AT_{1B} mRNA (rot, B) und die Kohybridisierung beider AT₁-Rezeptoren (C) auf einem Nierenschnitt einer Ratte. Die AT_{1A}-Rezeptoren (grün, A) und AT_{1B}-Rezeptoren (rot, B) konnten jeweils in den Mesangialzellen der Glomeruli detektiert werden. Die Kohybridisierung beider Rezeptoren zeigte, dass die Signalintensität für die AT_{1B}-Rezeptoren stärker war als für die AT_{1A}-Rezeptoren (C). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (grau). Die Kreise kennzeichnen Glomeruli. Maßstabsbalken 50 µm.

3.1.3 Expression der AT₁-Rezeptoren in humanen Nieren

Zusätzlich zu den Gewebeschnitten von Nagetieren wurden humane Nierenschnitte untersucht, um die Expressionsmuster miteinander vergleichen zu können. Anders als in Nagern gibt es beim Menschen nur eine Isoform des AT₁-Rezeptors. Die stärkste Intensität dieses Rezeptors war in den humanen Nieren in den Glomeruli zu finden. Die Kohybridisierung mit dem Marker PDGFR- β zeigte eine Lokalisation der AT₁-Rezeptoren in intraglomerulären Mesangialzellen, vergleichbar mit der Lokalisation in Mäusen und Ratten (Abb. 12A). Zusätzlich konnte eine schwache AT₁-Rezeptorexpression in PDGFR- β positiven Zellen außerhalb der Glomeruli festgestellt werden, wobei es sich vermutlich um interstitielle Fibroblasten handelte (Pfeile in Abb. 12A). Außerdem konnte AT₁-Rezeptor mRNA in Renin-produzierenden Zellen des humanen Gewebes detektiert werden (Abb. 12B). In größeren Gefäßen konnte keine Expression der AT₁-Rezeptoren nachgewiesen werden. Ob eine Expression der AT₁ mRNA in den afferenten oder efferenten Arteriolen vorhanden war, konnte anhand der vorliegenden humanen Nierenschnitten nicht ermittelt werden.

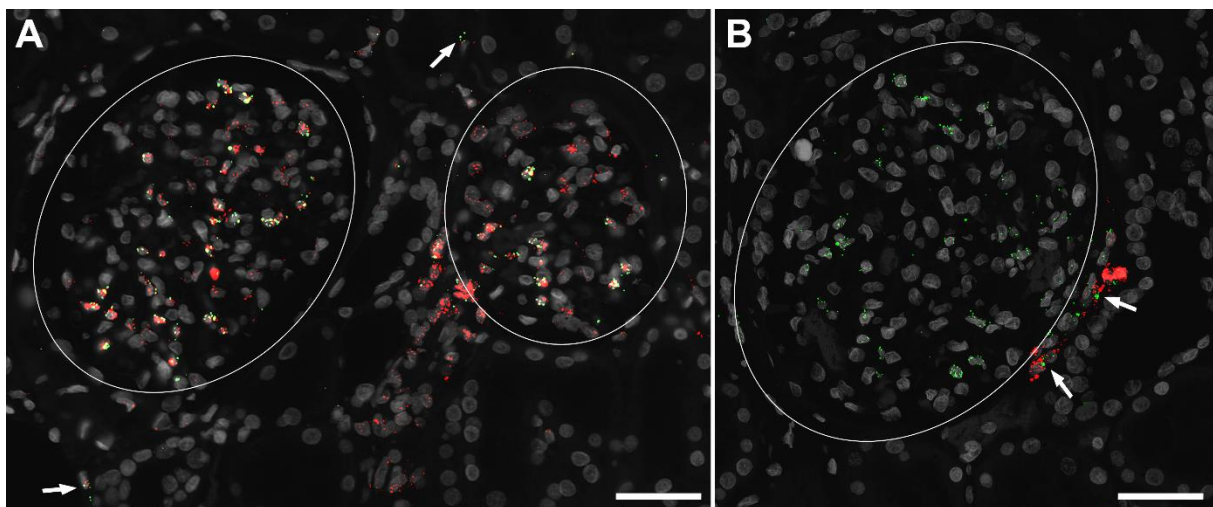


Abbildung 12. In-situ Hybridisierung der AT₁ (grün), PDGFR- β (rot, A) und Renin mRNA (rot, B) auf humanen Nierenschnitten. Kohybridisierung von AT₁ (grün) und PDGFR- β mRNA (rot) zeigte die Expression der AT₁-Rezeptoren in intraglomerulären Mesangialzellen und vereinzelt in interstitiellen Zellen (Pfeile) (A). Kohybridisierung von AT₁ (grün) und Renin mRNA (rot) zeigte die Lokalisation der AT₁-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen (Pfeile) (B). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (grau). Die Kreise kennzeichnen Glomeruli. Maßstabsbalken 50 μ m.

Ein deutlicher Unterschied in der Expression zwischen Nagern und humanen Nieren fand sich in der tubulären Expression von AT₁-Rezeptoren. Um die frühen Segmente des proximalen Tubulus identifizieren zu können, wurde der Natrium/Glukose-Kotransporter 2 (SGLT2) als Marker hybridisiert. Während in allen tubulären Zellen von Mausnieren, in denen SGLT2 mRNA nachgewiesen werden konnte, auch AT_{1A} mRNA vorhanden war, waren die proximalen

Tubuluszellen in humanen Nieren negativ für die Expression von AT_1 mRNA (Abb. 13). Zusätzlich konnte keine Expression der AT_1 -Rezeptoren in anderen Tubulusabschnitten der humanen Nierenschnitte detektiert werden.

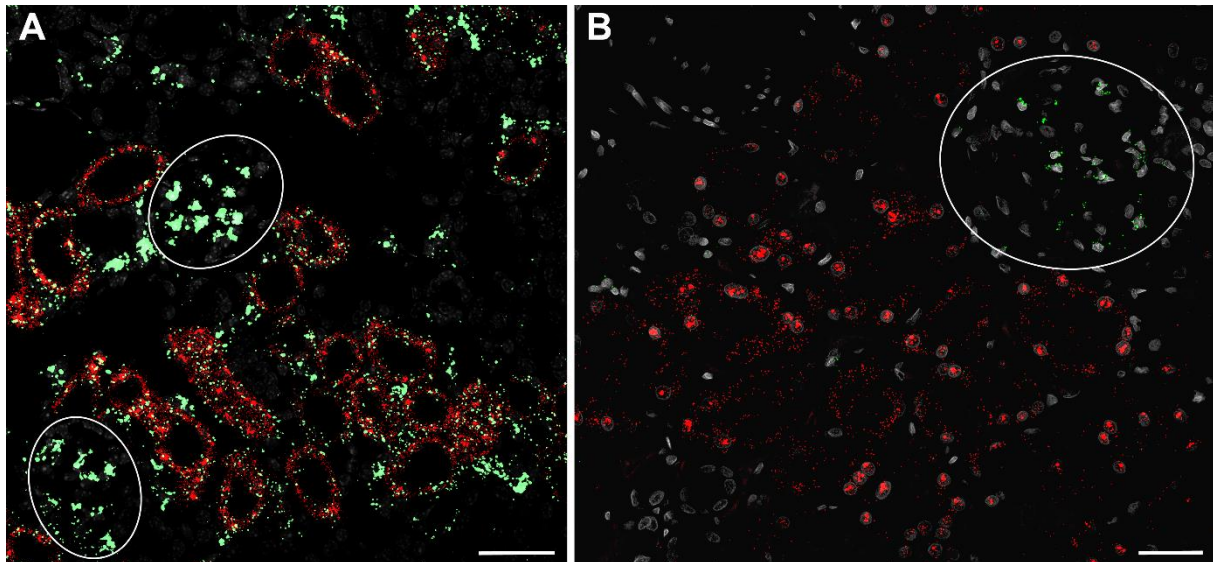


Abbildung 13. In-situ Hybridisierung der AT_{1A} (grün) und SGLT2 mRNA (rot) auf murinen (A) und humanen (B) Nierenschnitten. In den Mausnieren konnte AT_{1A} mRNA in den SGLT2 exprimierenden Abschnitten des proximalen Tubulus detektiert werden (A). Im humanen Gewebe war eine Expression der AT_1 -Rezeptoren in Glomeruli zu erkennen. Jedoch war keine AT_1 mRNA Expression in SGLT2 positiven proximalen Tubuluszellen detektierbar (B). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (grau). Die Kreise kennzeichnen Glomeruli. Maßstabsbalken 50 μ m.

3.2 Relevanz der AT₁-Rezeptoren im renalen FoxD1-Kompartiment für die Funktion und Entwicklung der Niere

Eine genetische Mutation oder systemische Deletion der AT₁-Rezeptoren hat bei Säugetieren gravierende Auswirkungen auf die Funktion und Entwicklung der Niere. Es hat zudem funktionelle Schädigungen zur Folge, wie Wachstumsstörungen oder Hypertonie. Bei Mäusen mit genetischer Mutation oder Deletion der AT₁-Rezeptoren entwickeln sich renale Schädigungen, die hauptsächlich Zellen betreffen, die sich aus den mesenchymalen Stromavorläuferzellen entwickeln. Dazu zählen Mesangialzellen, Gefäßmuskelzellen, Renin-produzierende Zellen und interstitielle Zellen.^{99,101,112,113} Bereits während der frühen Nephrogenese konnte in Mäusen in diesen Zellen eine Expression der AT₁-Rezeptoren festgestellt werden.⁹⁵ Anhand der Lokalisationsstudie konnte gezeigt werden, dass auch in adulten Tieren eine AT₁-Rezeptorexpression in diesen Zellen vorhanden ist. Daher scheint es naheliegend, dass die AT₁-Rezeptoren in oben genannten Zellen eine essentielle Bedeutung für die Entwicklung und die Funktion der Niere haben. Die mesenchymalen Stromavorläuferzellen und die sich daraus entwickelnden Zellen sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxD1 charakterisiert.^{124,125} Daher sollte mithilfe eines Mausmodells, in dem die AT₁-Rezeptoren spezifisch in Zellen des FoxD1-Kompartiments deletiert wurden, die Relevanz der AT₁-Rezeptoren in den Stromazellen für die Entwicklung und die Funktion der Nieren untersucht werden. Die Deletion der AT₁-Rezeptoren in diesen Tieren ist embryonal determiniert und greift daher bereits in der Nierenentwicklung.

3.2.1 Verifikation der Deletion von AT₁-Rezeptoren im FoxD1-Kompartiment

Die Genloci für FoxD1 und AT_{1A} liegen bei Mäusen beide auf Chromosom 13. Der Abstand zwischen FoxD1 und AT_{1A} beträgt dabei circa 39 centiMorgan.^{126,127} Der Erfolg für die Zucht einer Mauslinie mit FoxD1-Cre Rekombinase (FoxD1^{Cre/+}) und geflochten AT_{1A} Allelen (AT_{1A}^{fl/fl}) war daher abhängig vom Auftreten eines *Crossing over* Ereignisses zwischen den beiden Genloci. Zunächst wurden dafür FoxD1^{Cre/+} x AT_{1A}^{fl/+} Mäuse mit AT_{1A}^{fl/fl} Mäusen verpaart. Anhand der Genotypisierungsgele konnten 2 Tiere dieses Wurfes mit dem gewünschten Genotyp identifiziert werden (Abb. 14; Nr. 3 und 5). Diese hatten 2 geflochte AT_{1A} Allele (Abb. 14; Bande bei 1500 bp; oberes Gel) und waren positiv für die Expression der Cre Rekombinase (Abb. 14; Bande bei 450 bp; unteres Gel). Diese Tiere konnten anschließend für die weitere Züchtung verwendet werden. Um eine mögliche kompensatorische Regulation über die AT_{1B}-Rezeptoren ausschließen zu können, wurden diese zusätzlich global deletiert. Damit konnten letztendlich Mäuse mit einer spezifischen Deletion der AT_{1A}-Rezeptoren in der

Stromazellpopulation und einer systemischen Deletion der AT_{1B} -Rezeptoren untersucht werden ($FoxD1^{Cre/+} \times AT_{1A}^{fl/fl} \times AT_{1B}^{-/-}$; bezeichnet als: $FoxD1-AT_1ko$).

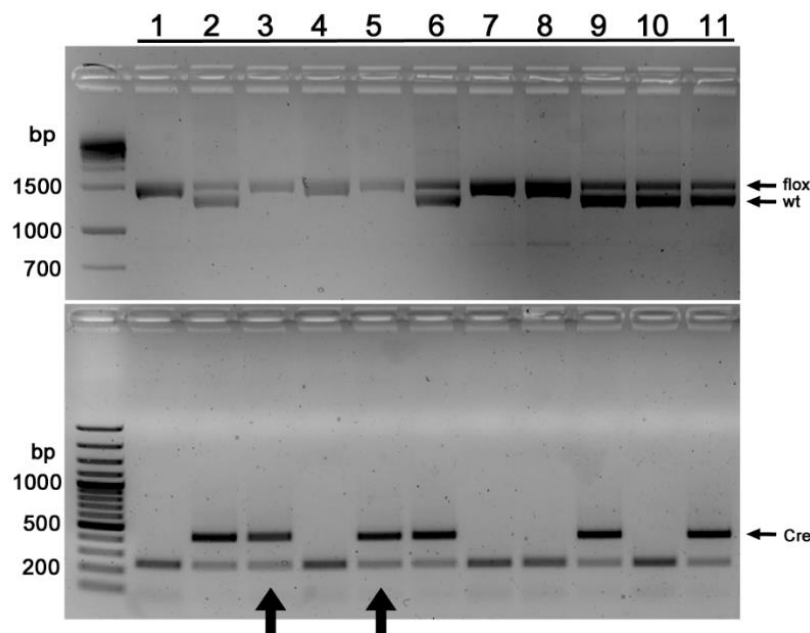


Abbildung 14. Repräsentative Genotypisierungsgele eines Wurfes nach der Kreuzung von $FoxD1^{Cre/+} \times AT_{1A}^{fl/+}$ Mäusen mit $FoxD1^{+/+} \times AT_{1A}^{fl/fl}$ Mäusen zur Verifizierung des erfolgreichen Crossing over Ereignisses zwischen den $FoxD1$ und AT_{1A} Genloci. Die Genotypisierung von AT_{1A} zeigte Fragmente bei 1500 bp für das gefloxtete AT_{1A} Allel und bei 1400 bp für das Wildtyp AT_{1A} Allel (obere Abbildung). Die Genotypisierung für die $FoxD1$ -Cre Rekombinase zeigte ein Fragment bei 450 bp für Mäuse, die Cre exprimierten (untere Abbildung). Durch das stattgefundene Crossing over zwischen dem $FoxD1$ und dem AT_{1A} Genlocus hatten zwei der 11 Mäuse in der F1-Generation den gewünschten Genotyp $FoxD1^{Cre/+} \times AT_{1A}^{fl/fl}$ (Nr. 3 und 5; Pfeile). Die Abbildung wurde übernommen aus Schrankl et al.¹²⁸

Um die Effizienz der Deletion zu überprüfen, wurden in-situ Hybridisierungen von AT_{1A} -Rezeptor mRNA und dem Marker $PDGFR-\beta$ durchgeführt. In Abbildung 15 ist die Expression von AT_{1A} -Rezeptoren in einer Wildtypmaus (Abb. 15A) und einer $FoxD1-AT_1ko$ Maus zu sehen (Abb. 15B). In der Wildtypmaus konnte eine deutliche Koexpression von $PDGFR-\beta$ und AT_{1A} mRNA (gelbes Signal) in intra- und extraglomerulären Mesangialzellen sowie interstitiellen Zellen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu fehlte in $FoxD1-AT_1ko$ Mäusen die Expression von AT_{1A} -Rezeptoren in diesen Zellen. Die AT_{1A} -Rezeptorexpression in proximalen Tubuluszellen ist von der spezifischen Deletion im $FoxD1$ -Kompartiment nicht betroffen.

Als zusätzlicher Nachweis für die erfolgreiche Deletion der AT_{1A} -Rezeptoren im $FoxD1$ -Kompartiment wurde die AT_{1A} -Rezeptor mRNA Abundanz sowohl in ganzen Nieren als auch in isolierten Glomeruli gemessen. Dabei war die AT_{1A} mRNA in den Gesamtnieren der $FoxD1-AT_1ko$ Tiere verglichen mit Wildtyptieren signifikant um etwa 40% erniedrigt. In isolierten

Glomeruli war die AT_{1A} mRNA Abundanz in FoxD1- AT_1 ko Tieren nur knapp über der Detektionsgrenze und im Vergleich zu Wildtyptieren um 96% erniedrigt (Abb. 16).

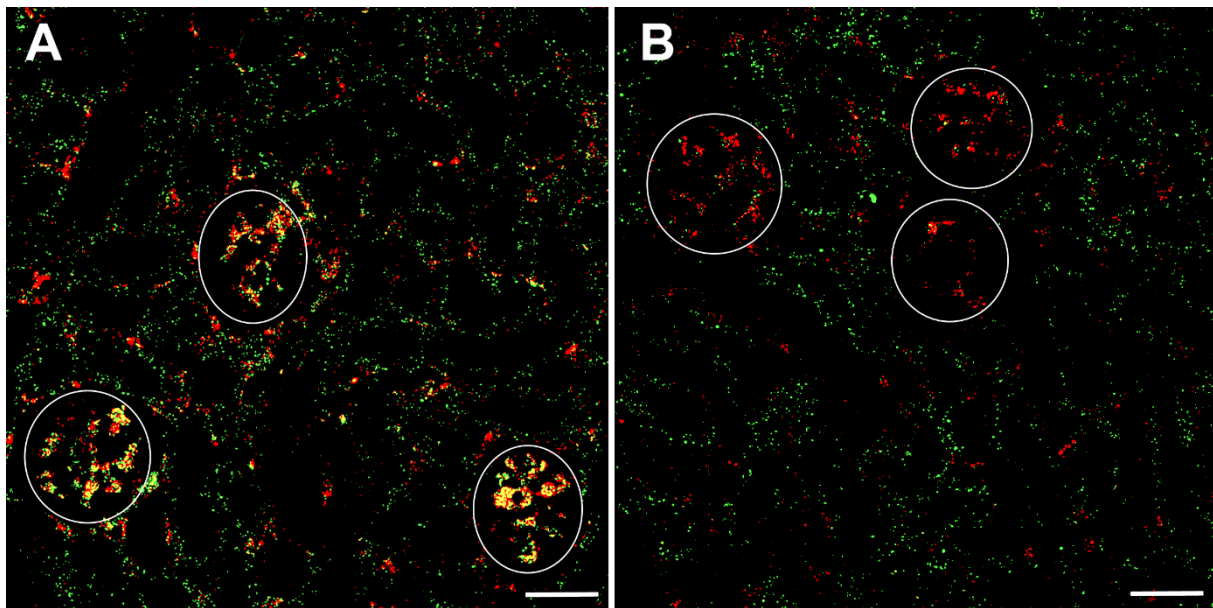


Abbildung 15. In-situ Hybridisierung von AT_{1A} (grün) und PDGFR- β mRNA (rot) auf murinen Nierenschnitten von einem Wildtyp (A) und einem FoxD1- AT_1 ko Tier (B). Auf dem Nierenschnitt des Wildtyps war die Kolokalisation von AT_{1A} (grün) und PDGFR- β mRNA (rot) in den intra- und extraglomerulären Mesangialzellen und den interstitiellen Zellen erkennbar (A). Auf den Schnitten des FoxD1- AT_1 ko Tieres war in diesen Zellen nahezu keine mRNA Expression der AT_{1A} -Rezeptoren zu sehen. Die AT_{1A} Expression in den proximalen Tubuluszellen blieb im FoxD1- AT_1 ko Tier unverändert bestehen (B). Die Kreise kennzeichnen Glomeruli. Maßstabsbalken 50 μ m.

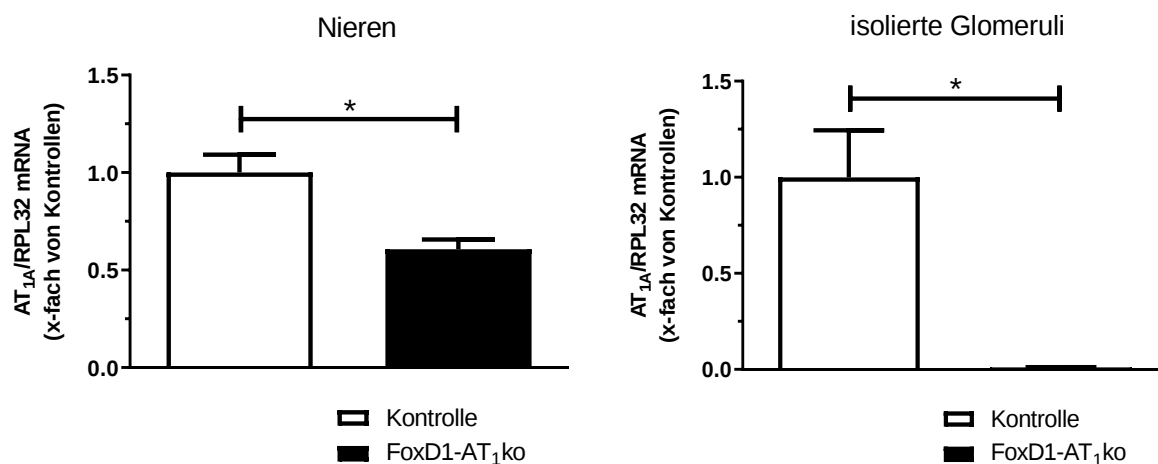


Abbildung 16. AT_{1A} mRNA Abundanz in ganzen Nieren (links) und in isolierten Glomeruli (rechts) von FoxD1- AT_1 ko Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. Die AT_{1A} mRNA Expression war in den Gesamtnieren von FoxD1- AT_1 ko Mäusen signifikant reduziert und in isolierten Glomeruli dieser Tiere kaum mehr detektierbar. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM; n=6; *:p<0,05.

3.2.2 Auswirkungen der Deletion von AT₁-Rezeptoren im Stromakompartiment auf die Nierenentwicklung

Mäuse mit einer globalen Deletion der AT₁-Rezeptoren weisen zahlreiche Nierenveränderungen auf. Die Veränderungen umfassen eine Atrophie der Papille, die Verdickung der Wände intrarenaler Arteriolen, interstitielle Fibrosen und Hyperplasien von Renin-produzierenden Zellen.^{99,101,112,113} Damit sind vor allem Zellen betroffen, die sich aus FoxD1-positiven Stromavorläuferzellen entwickeln, aber auch AT₁-Rezeptoren exprimieren. Deshalb sollte überprüft werden, ob die oben genannten Veränderungen auch durch die spezifische Deletion der AT₁-Rezeptoren im FoxD1-Kompartiment hervorgerufen werden. Die FoxD1-AT₁ko Mäuse wurden deshalb entsprechend der Schädigungen untersucht, die in globalen AT₁-Knockouttieren zu finden sind.

Um morphologische Veränderungen der Nieren sehen zu können, wurden Übersichtsaufnahmen von Nierenschnitten der FoxD1-AT₁ko Tiere und der Kontrolltiere angefertigt. Zusätzlich wurden Nierenübersichten von Tieren mit globaler AT₁-Deletion aufgenommen (Abb. 17A). Die Nieren der Tiere mit globaler AT₁-Rezeptordeletion waren im Vergleich zu Wildtyptieren verkleinert (Abb. 17B). Auffallend war vor allem die Atrophie der Papille. Im Gegensatz dazu waren die Nieren der FoxD1-AT₁ko Tiere normal entwickelt und hatten eine ähnliche Größe wie die Wildtypnieren. Zwischen den Nieren der FoxD1-AT₁ko Tiere und der Wildtyptiere konnten keine makroskopischen Anomalien festgestellt werden. Zudem war die Papille in den FoxD1-AT₁ko Tieren normal und zeigte keine atrophischen Veränderungen (Abb. 17C).

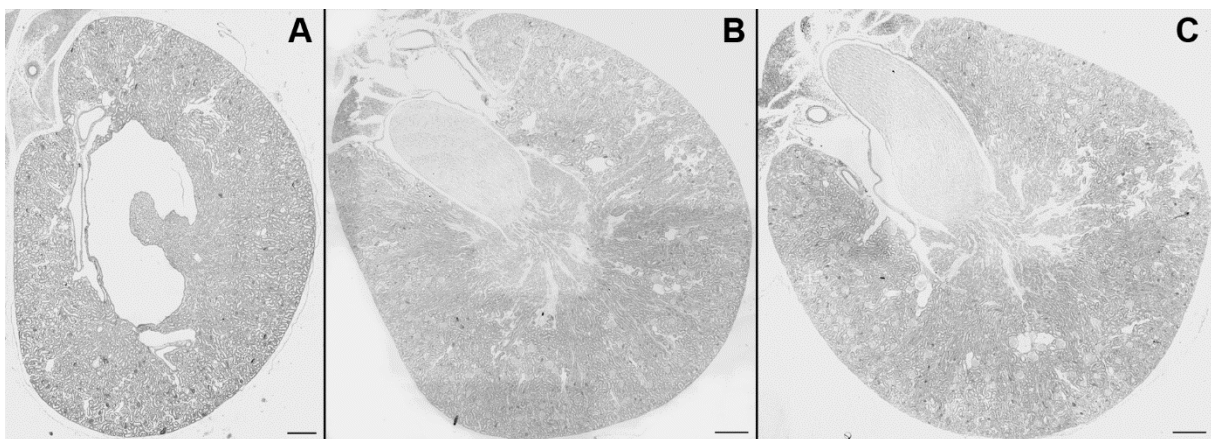


Abbildung 17. Übersichten von Nierenschnitten einer Maus mit globaler AT₁-Deletion (A), einer Wildtypmaus (B), und einer FoxD1-AT₁ko Maus (C). Das Tier mit der globalen AT₁-Rezeptordeletion (A) zeigte morphologische Nierenveränderungen mit einer ausgeprägten Atrophie der Papille. Die Niere der FoxD1-AT₁ko Maus (C) war normal entwickelt und zeigte keine Auffälligkeiten im Vergleich zur Niere des Wildtyptieres (B). Maßstabsbalken 500 µm.

Um die Wanddicke der Gefäße quantitativ analysieren zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen α -SMA auf Nierenschnitten von Kontrolltieren und FoxD1-AT₁ko Tieren gemacht (Abb. 18; obere Abbildung). Anhand der Aufnahmen konnte die Wanddicke der intrarenalen Arteriolen über die Differenz des äußeren und inneren Durchmessers bestimmt werden. Da die Wanddicke zusätzlich unabhängig von ihrer Größe beurteilt werden sollte, wurde das Verhältnis der Wanddicke zum äußeren Durchmesser bestimmt (bezeichnet als Ratio der Wanddicke). Dabei konnte kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden und es war keine Verdickung der Wände in den Arteriolen der Nieren von FoxD1-AT₁ko Mäusen zu sehen. (Abb. 18; untere Abbildung).

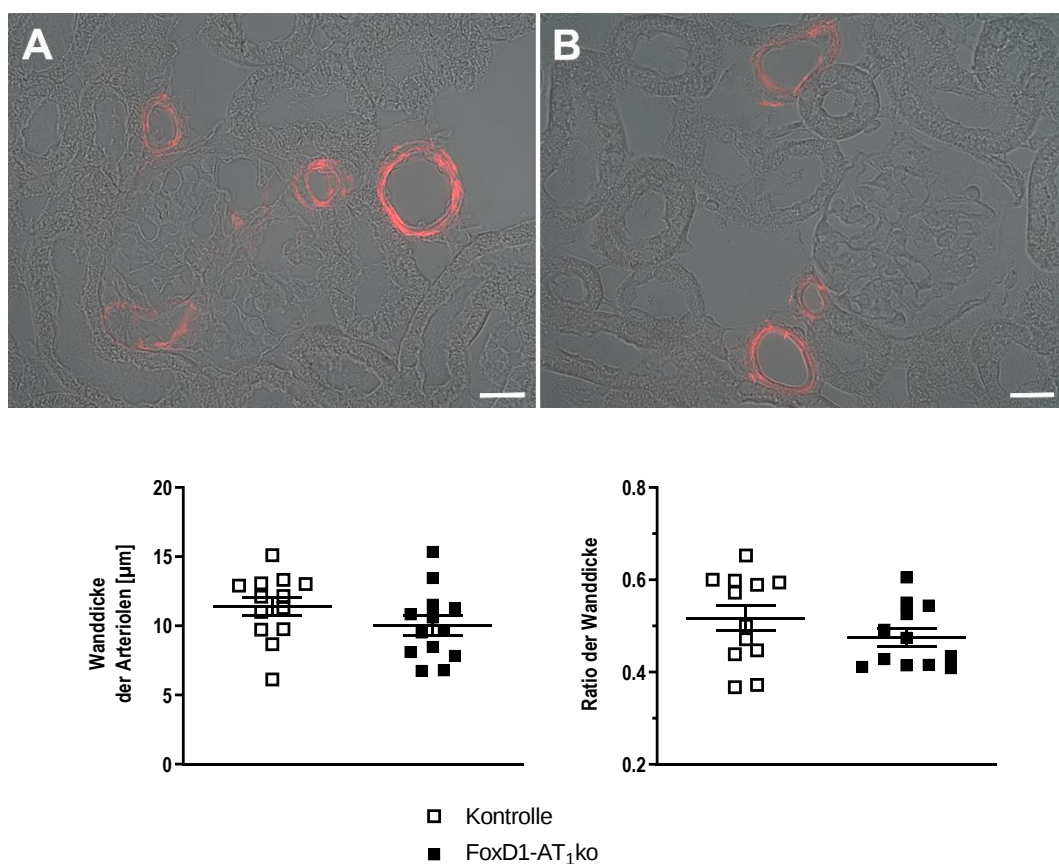


Abbildung 18. Bestimmung der Wanddicke von intrarenalen Arteriolen in Kontrolltieren und FoxD1-AT₁ko Tieren.

Obere Abbildung: Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA (rot) auf Nierenschnitten eines Kontrolltieres (A) und eines FoxD1-AT₁ko Tieres (B). Maßstabsbalken 20 μm .

Untere Abbildung: Quantitative Analyse der Wanddicke von Arteriolen und Bestimmung der Wanddicke im Verhältnis zur Größe der Arteriole (Ratio der Wanddicke) von Kontrolltieren und FoxD1-AT₁ko Mäusen. Die FoxD1-AT₁ko Tiere zeigten keine verdickten Arteriolenwände. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 Nieren pro Genotyp (mind. 4 Arteriolen pro Tier).

Um zu überprüfen, ob die Nieren entzündliche Veränderungen oder eine interstitielle Fibrose aufweisen, wurde die mRNA Abundanz der profibrotischen und proinflammatorischen Marker Kollagen 1, Fibronectin und F4/80 gemessen. Keiner dieser Marker zeigte einen Unterschied in der Expression zwischen FoxD1-AT₁ko Tieren und Kontrolltieren. Die Daten für den Makrophagen Marker F4/80 sind exemplarisch dafür in Abbildung 19 dargestellt.

Ein Charakteristikum der interstitiellen Zellen in der Niere ist die Produktion von Erythropoietin (EPO).¹²⁹ Da diese Zellen auch von den FoxD1-positiven Vorläuferzellen abstammen, wurde zusätzlich noch die Auswirkung der AT₁-Rezeptordeletion auf die renale EPO-Produktion überprüft. Dabei war die Plasma-EPO Konzentration nicht unterschiedlich zwischen Kontrolltieren und FoxD1-AT₁ko Tieren (Abb. 19).

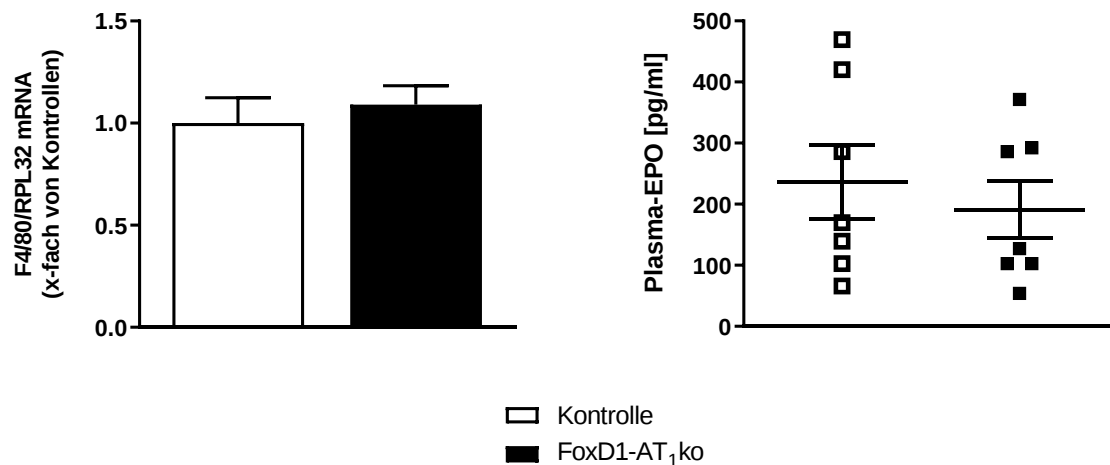


Abbildung 19. F4/80 mRNA Abundanz und Plasma-EPO Konzentration von FoxD1-AT₁ko Tieren verglichen mit Kontrolltieren. Die mRNA Abundanz von F4/80 lieferte keine Hinweise auf entzündliche Veränderungen in FoxD1-AT₁ko Tieren (linke Abbildung). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 8 Tieren pro Genotyp.

Die Plasma-EPO Konzentrationen zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen (rechte Abbildung). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 7 Tieren pro Genotyp.

3.2.3 Auswirkungen der Deletion von AT₁-Rezeptoren im Stromakompartiment auf die Nierenfunktion

Bei Mäusen mit einer globalen Deletion der AT₁-Rezeptoren ist das Körperwachstum sowie Nierenwachstum im Vergleich zu Wildtyptieren beeinträchtigt. Die Tiere haben außerdem einen signifikant erniedrigten Blutdruck. Zudem weisen sie häufig eine Polyurie auf und zeigen eine Beeinträchtigung bei der Konzentrierung des Harns.^{99,112} Daher sollte zunächst überprüft werden, ob die FoxD1-AT₁ko Tiere ähnliche funktionelle renale Beeinträchtigungen aufweisen, um daraus schließen zu können, welche Relevanz die AT₁-Rezeptoren im FoxD1-Kompartiment für die basalen Nierenfunktionen haben. Dafür wurden bei FoxD1-AT₁ko Tieren, entsprechend den Auffälligkeiten der globalen AT₁-Knockouttiere, verschiedene Parameter, wie systolischer Blutdruck, glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und Urinosmolarität bestimmt.

Die FoxD1-AT₁ko Tiere zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten und das Wachstum der Tiere war nicht beeinträchtigt. Es wurden die Körper- und Nierengewichte von adulten FoxD1-AT₁ko Mäusen bestimmt und mit den Kontrolltieren verglichen. Zusätzlich wurde das Nierengewicht in Relation zum Körpergewicht des jeweiligen Tieres gesetzt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abb. 20).

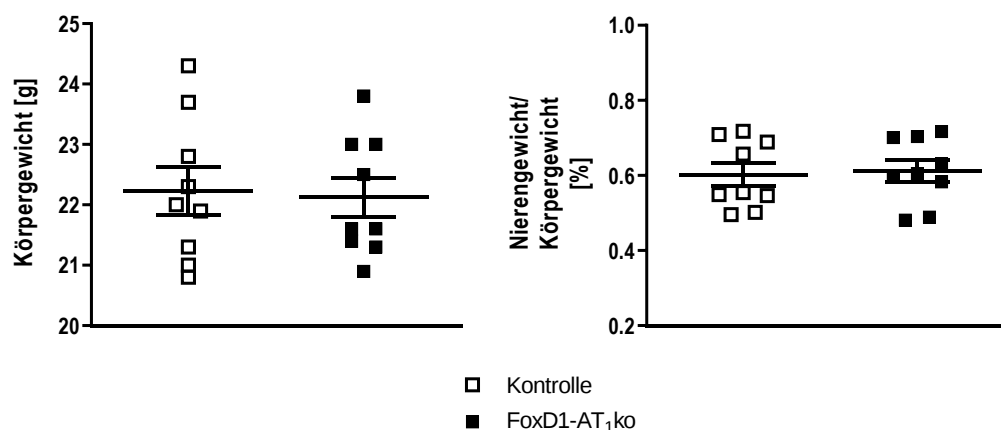


Abbildung 20. Körpergewichte und das Verhältnis von Nieren- zu Körpergewicht von FoxD1-AT₁ko Mäusen verglichen mit Kontrolltieren. Es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von 9 Tieren pro Genotyp.

Die Messung des systolischen Blutdrucks ergab für die FoxD1-AT₁ko Tiere einen Mittelwert von $122 \pm 3,6$ mmHg. Damit zeigten sie keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren ($121,9 \pm 4,7$ mmHg). Auch bei der Bestimmung der GFR konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Die FoxD1-AT₁ko Mäuse hatten im Mittel einen Wert von $304 \pm 20,9$ μ l/min. Dieser unterschied sich nicht signifikant von den Kontrolltieren, die einen

Mittelwert von $313,5 \pm 21,7 \mu\text{l/min}$ aufwiesen (Abb. 21, obere Abbildungen). Zudem wurden die Harnosmolarität sowie die Natrium- und Kaliumkonzentrationen des Urins bestimmt. Auch in diesen Parametern konnten keine Unterschiede zwischen FoxD1-AT₁ko Tieren und Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 21; mittlere und untere Abbildungen).

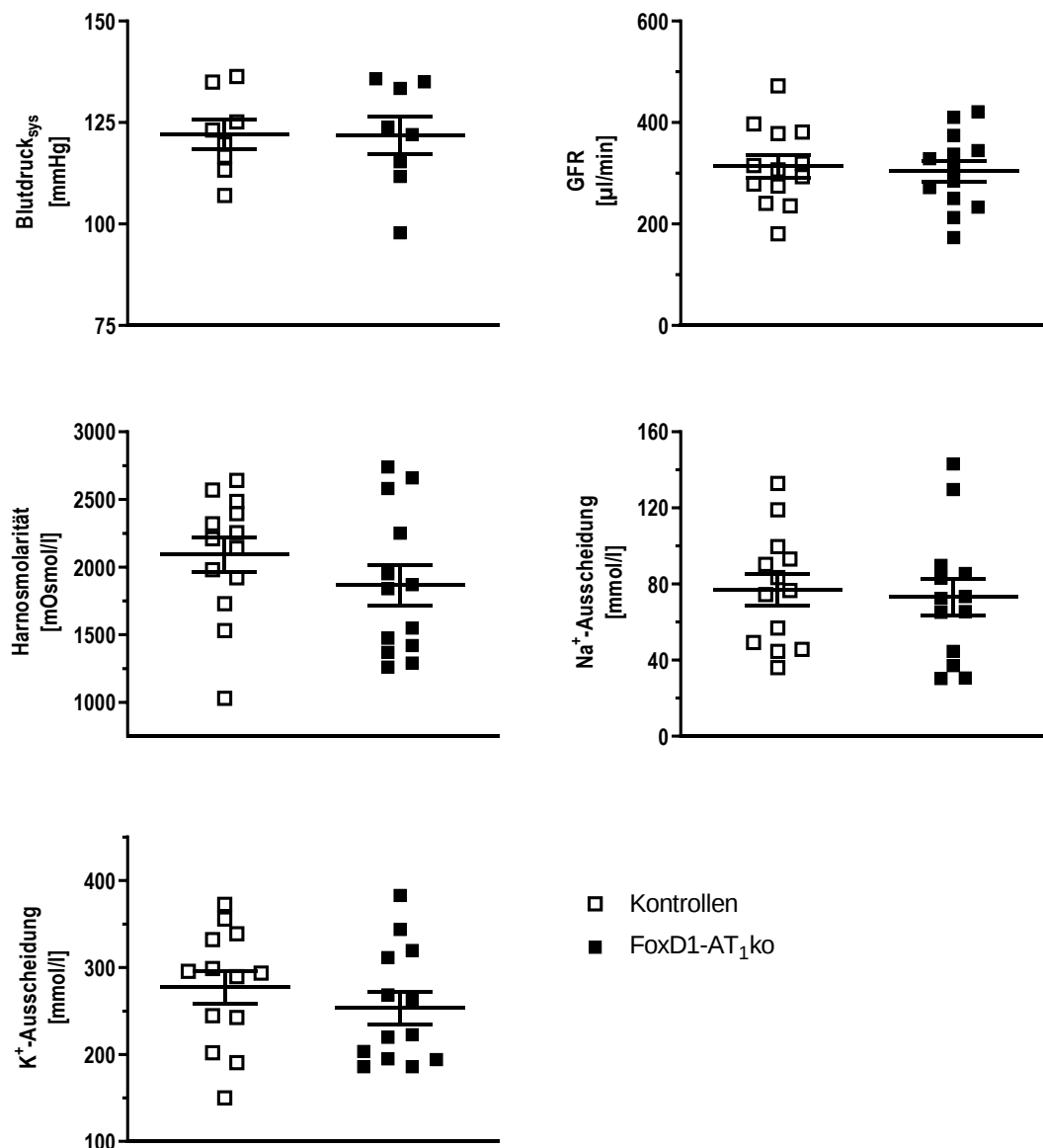


Abbildung 21. Systolischer Blutdruck, glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und Urinparameter von Kontrolltieren und FoxD1-AT₁ko Tieren.

Obere Abbildung: Systolischer Blutdruck und GFR waren in FoxD1-AT₁ko Mäusen unverändert verglichen mit Kontrolltieren. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ SEM von 8 Tieren (Blutdruck; Mittelwert pro Tier über 6 Tage) und 13 Tiere (GFR) pro Genotyp.

Mittlere und untere Abbildung: Weder die Osmolarität des Urins, noch die Natrium- oder Kaliumausscheidung im Urin zeigten signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltieren und FoxD1-AT₁ko Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von jeweils 13 Tieren pro Genotyp.

3.2.4 Auswirkungen der Deletion von AT₁-Rezeptoren im Stromakompartiment auf die Reninsekretion

Zusätzlich sollten die Auswirkungen der AT₁-Rezeptordeletion im Stromakompartiment auf die Renin-produzierenden Zellen und die Regulation von Renin untersucht werden. Dafür wurde mithilfe isoliert perfundierter Nieren die Reninaktivität in den FoxD1-AT₁ko Tieren bestimmt. Die Nieren wurden mit einem konstanten Druck von 90 mmHg perfundiert. Das Perfusat enthielt eine Konzentration von 10 nmol/l des β -Adrenorezeptor-Liganden Isoproterenol. Damit konnte zunächst die Reninsekretion durch eine Aktivierung von β_1 -adrenergen Rezeptoren stimuliert werden. Anschließend erfolgte die Zugabe von steigenden ANG II-Konzentrationen (0 - 1 nMol/l) zum Perfusat.

In den Kontrollnieren führte der kontinuierliche Anstieg der ANG II-Konzentration zu einer Abnahme des Perfusionsflusses von 14,3 auf 2,7 ml/min/g. Zusätzlich konnte durch die Zugabe von ANG II eine Abnahme der Reninaktivität im Perfusat von 39 auf 7,5 ng ANG I/ml/h beobachtet werden (Abb. 22; obere Abbildung). Hingegen war in isoliert perfundierten Nieren von FoxD1-AT₁ko Tieren der hemmende Effekt von ANG II auf den Perfusionsfluss aufgehoben. Zudem zeigten die FoxD1-AT₁ko Nieren keine Abnahme der Reninaktivität im Perfusat als Reaktion auf die ansteigenden ANG II-Konzentrationen (Abb. 22; untere Abbildung).

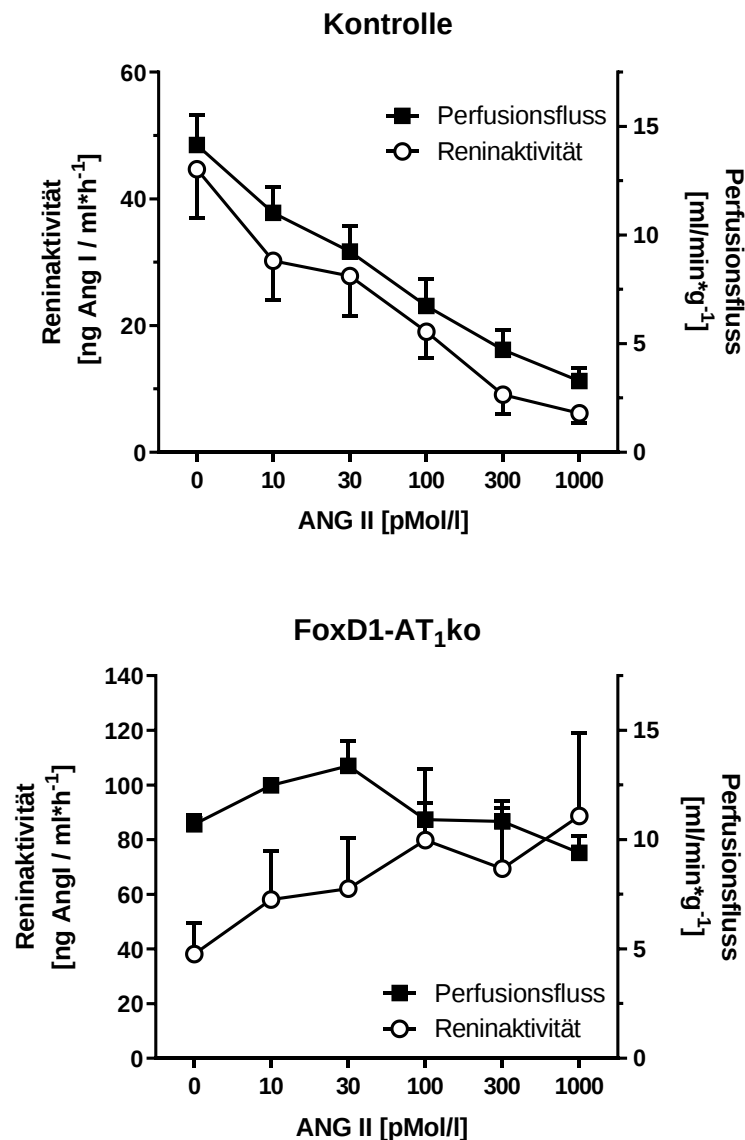


Abbildung 22. Effekte der steigenden Konzentrationen von ANG II auf den Perfusionsfluss und die Reninaktivität im Perfusat an isoliert perfundierten Nieren von Kontrolltieren (obere Abbildung) und von FoxD1-AT₁ko Tieren (untere Abbildung). Die Nieren wurden mit einem konstanten Druck von 90 mmHg mit einem Perfusat, das 10 nMol/l Isoproterenol enthielt, perfundiert. Es folgte eine Zugabe ansteigender Konzentrationen von ANG II. In Wildtypnieren war die inhibierende Wirkung von ANG II auf die Reninaktivität und den Perfusionsfluss erkennbar (obere Abbildung). In den FoxD1-AT₁ko Nieren fehlte der inhibierende Effekt von ANG II auf beide Parameter (untere Abbildung). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von 6 Nieren pro Genotyp.

Zusätzlich wurde die Anzahl und Verteilung der Renin-produzierenden Zellen mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Renin und α -SMA bestimmt. Die Renin-produzierenden Zellen waren in FoxD1-AT₁ko Tieren an der üblichen juxtaglomerulären Position in der Media der afferenten Arteriolen lokalisiert. Auch die Anzahl der Zellen war nicht auffällig im Vergleich zu den Kontrolltieren und es konnte keine Hyperplasie der Renin-produzierenden Zellen festgestellt werden (Abb. 23; obere Abbildung). Außerdem zeigten

weder die Bestimmung der Renin mRNA Abundanz noch der Plasmareninaktivität signifikante Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und FoxD1-AT₁ko Tieren (Abb. 23; untere Abbildung).

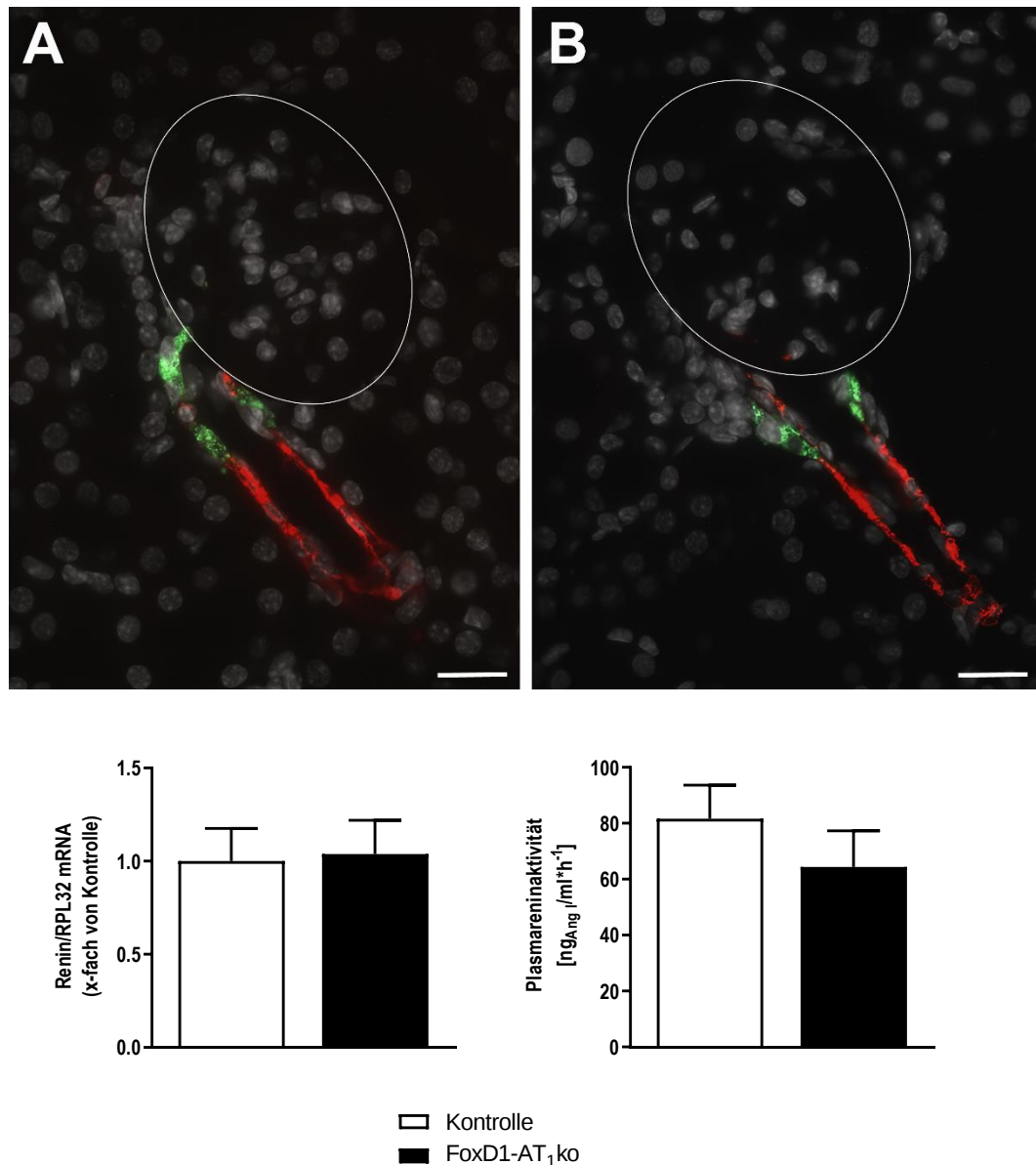


Abbildung 23. Verteilung der Renin-produzierenden Zellen, Renin mRNA Abundanz und Plasmareninaktivität in FoxD1-AT₁ko Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren.

Obere Abbildung: Immunfluoreszenzfärbung von Renin (grün) und α-SMA (rot) auf Nierenschnitten eines Kontrolltieres (A) und eines FoxD1-AT₁ko Tieres (B). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (grau). Kreise kennzeichnen Glomeruli. Maßstabsbalken 50 µm.

Untere Abbildung: Renin mRNA Abundanz (links) und Plasmareninaktivität (rechts) von Kontrolltieren und FoxD1-AT₁ko Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 8 Tieren pro Genotyp.

Weder Anzahl, Verteilung noch Renin mRNA Abundanz oder Plasmalevel zeigten Unterschiede zwischen den Genotypen.

3.3 Relevanz der AT₁-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen für die Aktivität des RAAS

Die Regulation des RAAS unterliegt negativen Rückkopplungsmechanismen, die auf die Renin-produzierenden Zellen wirken und damit die Expression und Sekretion von Renin steuern. Einige Studien konnten bereits eine Expression von AT₁-Rezeptoren auf den Renin-produzierenden Zellen nachweisen.^{50,51} Daher wird angenommen, dass die Regulation von Renin im Sinne einer negativen Rückkopplung direkt durch ANG II auf Ebene der Renin-produzierenden Zellen kontrolliert wird.^{46,56,58} Bisher war es allerdings schwierig, das Konzept des direkten Rückkopplungsmechanismus von ANG II *in vivo* zu beweisen, da Experimente, die auf einer pharmakologischen Manipulation der ANG II-Produktion oder der Wirkung von AT₁-Rezeptor-Antagonisten beruhen, zusätzliche systemische Auswirkungen auf das RAAS, wie beispielweise Änderungen des Blutdrucks, mit sich bringen. Daher wurden in dieser Arbeit Mäuse mit einer spezifischen AT₁-Rezeptordeletion in den Renin-produzierenden Zellen untersucht.

3.3.1 Verifikation der Deletion von AT₁-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen

Mithilfe der in-situ Hybridisierung konnte die mRNA Expression der AT_{1A}-Rezeptoren in präglomerulären Renin-produzierenden Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 6B; Abb. 24A). Um die *in vivo* Relevanz der AT_{1A}-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen für die Regulation der Reninexpression und -sekretion zu untersuchen, wurden Mäuse mit einer Cre/loxP-vermittelten spezifischen Deletion der AT_{1A}-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen gezüchtet (Ren-AT_{1A}^{fl/fl}). Abbildung 24B zeigt das Fehlen der AT_{1A}-Rezeptorexpression in den Renin-produzierenden Zellen eines Ren-AT_{1A}^{fl/fl} Tieres. Um eine mögliche kompensatorische Wirkung der AT_{1B}-Rezeptoren ausschließen zu können, wurden zusätzlich Mäuse mit einer globalen Deletion der AT_{1B}-Rezeptoren untersucht (AT_{1B}-KO). Außerdem wurden Mäuse generiert, die sowohl die spezifische Deletion der AT_{1A}-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen als auch die systemische Deletion der AT_{1B}-Rezeptoren aufwiesen (bezeichnet als Ren-AT₁ko).

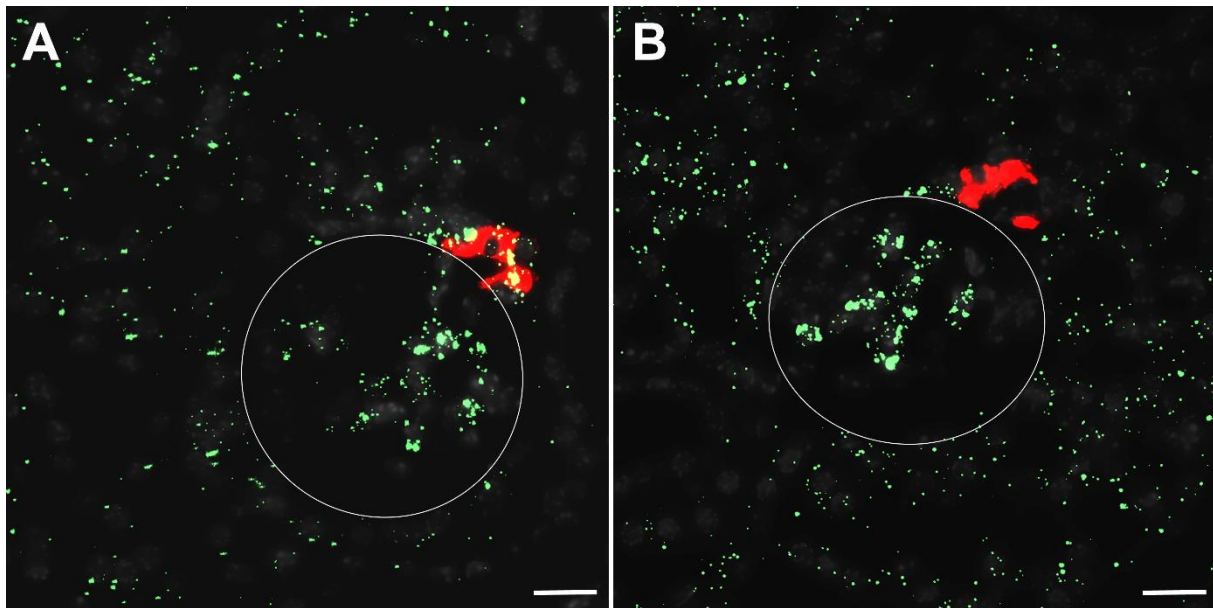


Abbildung 24. In-situ Hybridisierung von AT_{1A} (grün) und Renin mRNA (rot) auf murinen Nierenschnitten eines Wildtypieres (A) und eines Ren- $AT_{1A}^{fl/fl}$ Tieres (B). Auf dem Nierenschnitt des Wildtypieres war die Kolokalisation von AT_{1A} (grün) und Renin mRNA (rot) in den Renin-produzierenden Zellen erkennbar (A). Auf den Schnitten des Ren- $AT_{1A}^{fl/fl}$ Tieres war in den Renin-positiven Zellen keine Expression der AT_{1A} mRNA vorhanden. Die AT_{1A} Expression in den anderen Zelltypen blieb jedoch unverändert bestehen (B). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (grau). Die Kreise kennzeichnen Glomeruli. Maßstabsbalken 20 μ m.

Die Methode der isoliert perfundierten Niere diente der funktionellen Überprüfung der Deletion der AT_1 -Rezeptoren in den Renin-produzierenden Zellen. Die Nieren wurden mit einem konstanten Druck von 90 mmHg perfundiert. Die Stimulation der Reninsekretion erfolgte zunächst durch die Zugabe des β -Adrenorezeptor-Liganden Isoproterenol (10 nmol/l) zum Perfusat. Anschließend wurden zusätzlich steigende Konzentrationen von ANG II (0 - 1 nMol/l) zum Perfusat gegeben. In den Nieren der Wildtypiere hatte die Zugabe von ANG II einen inhibierenden Effekt auf den Perfusionsfluss und die Reninaktivität im Perfusat. Die Nieren der Ren- AT_1 ko Tiere reagierten mit einer Abnahme des Perfusionsflusses auf die ansteigenden ANG II-Konzentrationen. Jedoch zeigte die Reninaktivität im Perfusat der Ren- AT_1 ko Nieren keine Abnahme als Reaktion auf die ANG II-Zugabe. Da die AT_1 -Rezeptoren in diesen Nieren in Renin-produzierenden Zellen fehlten, konnte die hemmende Wirkung von ANG II auf die Reninaktivität nicht mehr vermittelt werden (Abb. 25).

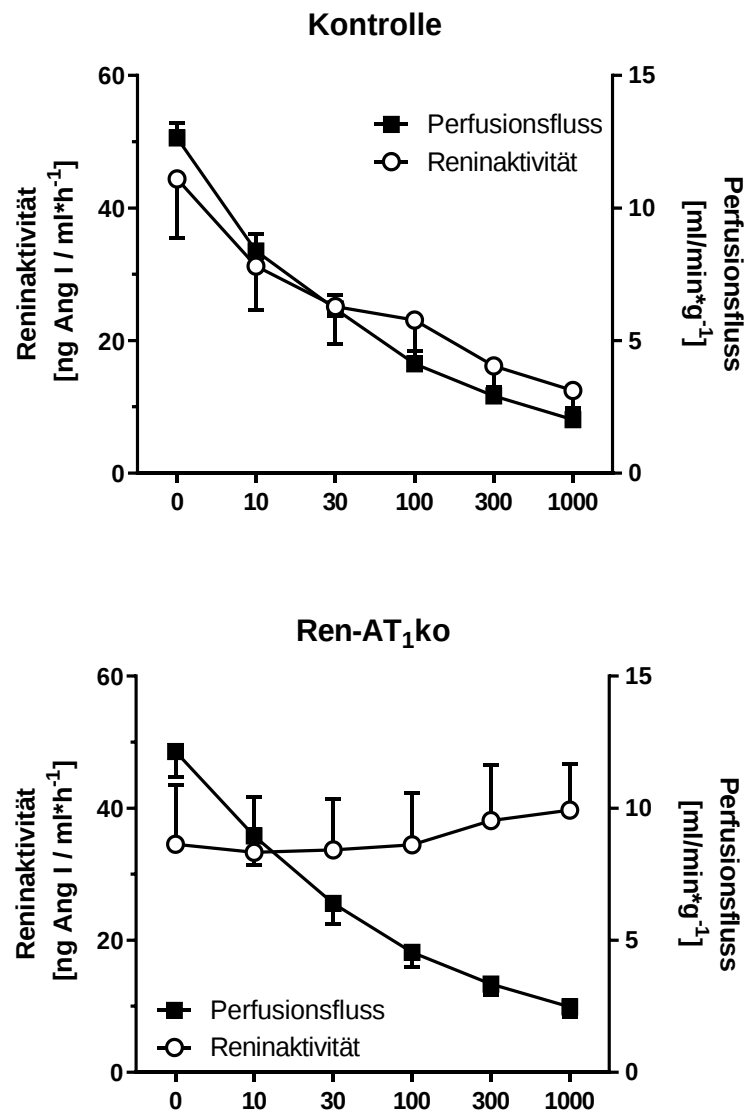


Abbildung 25. Effekte von steigenden ANG II-Konzentrationen auf den Perfusionsfluss und die Reninaktivität im Perfusat an isoliert perfundierten Nieren von Kontrolltieren (oben) und von Ren-AT₁ko Tieren (unten). Die Nieren wurden mit einem konstanten Druck von 90 mmHg mit einem Perfusat, das 10 nMol/l Isoproterenol enthielt, perfundiert. Es folgte eine Zugabe ansteigender Konzentrationen von ANG II. In Wildtypnieren war der inhibierende Effekt von ANG II auf die Reninaktivität und den Perfusionsfluss sichtbar (oben). In den Ren-AT₁ko Nieren nahm der Perfusionsfluss als Reaktion auf die Zugabe von ANG II ab. Jedoch fehlte der inhibierende Effekt von ANG II auf die Reninaktivität im Perfusat (unten). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von 6 Nieren pro Genotyp.

3.3.2 Relevanz der AT_1 -Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen für die basale Regulation des RAAS

Um den Effekt der Deletionen von AT_1 -Rezeptoren in den unterschiedlichen Genotypen auf die Verteilung und Anzahl der Renin-produzierenden Zellen zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Renin und α -SMA angefertigt. Die Renin-produzierenden Zellen waren in allen Tieren an der typischen juxtaglomerulären Position in der Media der afferenten Arteriolen lokalisiert (Abb. 26). Auch bezüglich der Anzahl der Renin-positiven Zellen konnten in keinem der untersuchten Genotypen signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren festgestellt werden.

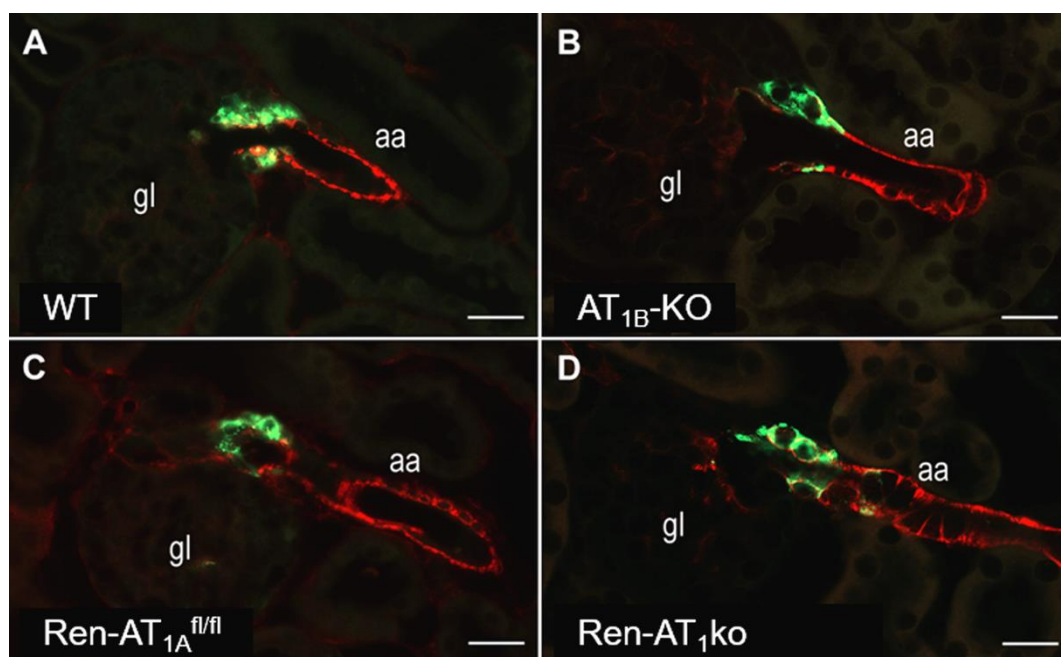


Abbildung 26. Immunfluoreszenzfärbung von Renin (grün) und α -SMA (rot) auf murinen Nierenschnitten von einem Wildtyp-Tier (A), einem AT_{1B} -KO Tier (B), einem Tier mit konditionaler Reninzell-spezifischer Deletion der AT_{1A} -Rezeptoren ($Ren-AT_{1A}^{fl/fl}$) (C) und einem Tier mit konditionaler Reninzell-spezifischer Deletion der AT_{1A} -Rezeptoren mit systemischer AT_{1B} -Defizienz ($Ren-AT_{1ko}$; D). Die untersuchten Genotypen zeigten keine Unterschiede in der Anzahl und Verteilung der Renin-produzierenden Zellen. gl: Glomerulus; aa: afferente Arteriole; Maßstabsbalken 20 μ m. Die Abbildung wurde modifiziert nach Neubauer et al.¹³²

Zusätzlich wurde von allen Genotypen die Renin mRNA Abundanz sowie die Plasminogenaktivität bestimmt. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zeigte dabei keine Gruppe eine signifikante Veränderung der Reninexpression oder der Freisetzung von Renin (Abb. 27; obere Abbildungen). Außerdem wurde der systolische Blutdruck mittels *Tail-cuff* Methode gemessen. Bei den Wildtyp-Tieren wurde im Mittel ein Wert von $112 \pm 1,9$ mmHg gemessen. Dabei konnten weder für die $Ren-AT_{1A}^{fl/fl}$ Tiere ($110 \pm 0,9$ mmHg), noch für die AT_{1B} -KO Tiere ($114 \pm 2,4$

mmHg) oder die Ren-AT₁ko Tiere ($113 \pm 2,2$ mmHg) signifikante Abweichungen zu den Wildtyptieren festgestellt werden (Abb. 27; untere Abbildung).

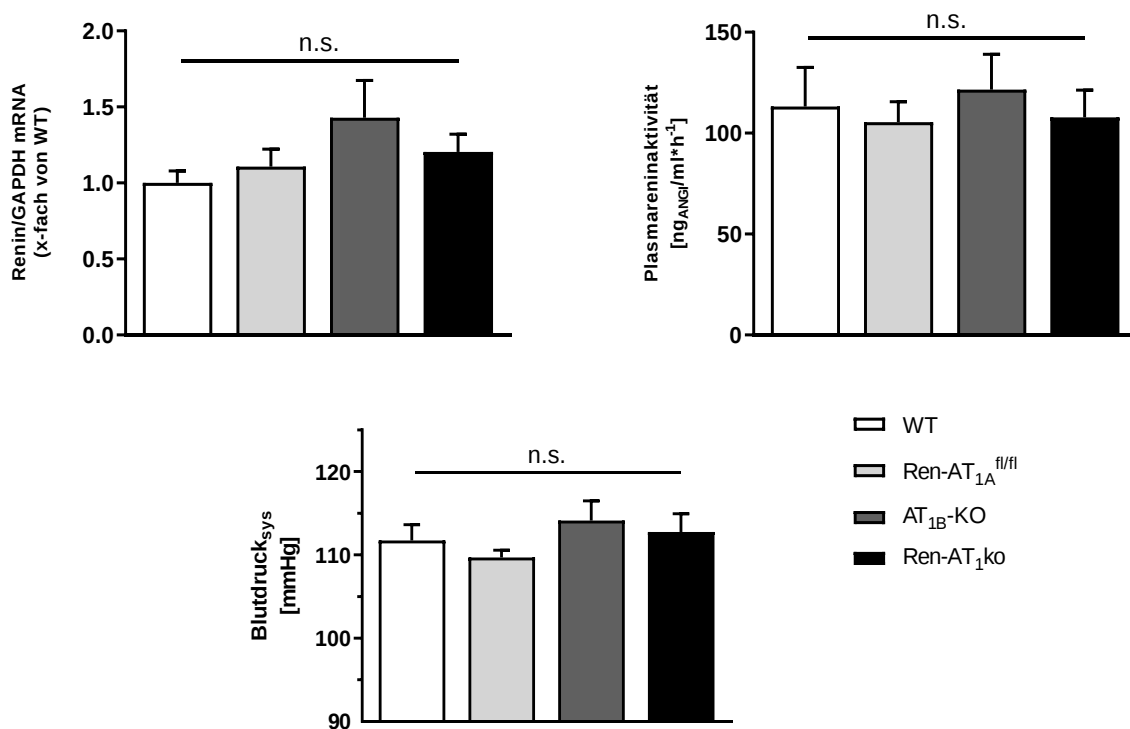


Abbildung 27. Renin mRNA Abundanz, Plasmareninaktivität und systolischer Blutdruck der verschiedenen AT₁-Rezeptor Knockouttiere im Vergleich zu Wildtyptieren.

Obere Abbildung: Die renale Renin mRNA Abundanz (links) und die Plasmareninaktivität (rechts) zeigten keine signifikanten Abweichungen zwischen den Wildtyptieren und den jeweiligen AT₁-Knockoutmodellen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 9 Tieren pro Genotyp.

Untere Abbildung: Der systolische Blutdruck unterschied sich in Ren-AT_{1A}^{fl/fl}, AT_{1B}-KO und Ren-AT₁ko Tieren weder untereinander, noch war er signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Wildtyptieren. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 5 Tieren pro Genotyp. n.s.: nicht signifikant.

3.3.3 Relevanz der AT₁-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen bei Suppression und Stimulation der RAAS-Aktivität

Die zellspezifische Deletion der AT_{1A}-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen verhindert die direkte Wirkung von ANG II auf die Renin-produzierenden Zellen. Durch Eingriffe in die Aktivität des RAAS konnte somit die Existenz des direkten Feedbacks von ANG II auf die Reninzellen überprüft werden. Dafür wurde das RAAS mithilfe verschiedener Substanzen stimuliert, beziehungsweise supprimiert. Anschließend sollte durch die Bestimmung der Reninexpression und der Plasmapareninaktivität überprüft werden, ob das Fehlen der AT₁-Rezeptoren die Regulation von Renin beeinflusst. Für die Stimulation der Reninsekretion wurde eine Nidrigsalzdiät kombiniert mit dem ACE-Hemmer Enalapril verwendet. Dadurch wurde die Reninproduktion über die erniedrigte Salzaufnahme und die Hemmung der Umwandlung von ANG I in ANG II aktiviert. Zudem wurde einer anderen Versuchsgruppe das Schleifendiuretikum Furosemid verabreicht, um über die Reduktion des Extrazellulärvolumens stimulierend auf die Reninsynthese einzuwirken.

In Wildtyp-tieren führte die Kombination aus Nidrigsalzdiät und Enalapril zu einer starken Zunahme der Renin mRNA Abundanz (8-fach) und einem 9-fachen Anstieg der Plasmapareninaktivität. Der Effekt nach der Gabe von Furosemid war nicht so ausgeprägt, dennoch konnte eine deutliche Stimulation der Reninexpression und der Plasmapareninaktivität erreicht werden (etwa 4-facher Anstieg verglichen mit unbehandelten Kontrollen). Diese signifikanten Änderungen konnten in allen drei untersuchten AT₁-Knockout-tieren in ähnlichem Ausmaß beobachtet werden. Dabei konnten für die jeweiligen Behandlungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abb. 28).

Um einen supprimierenden Effekt auf die Reninexpression und -sekretion zu generieren, wurden Versuchstieren der jeweiligen Genotypen osmotische Minipumpen implantiert, die subkutan eine ANG II-Konzentration von 2,5 µg/kg_{KG}/min über einen Zeitraum von 10 Tagen abgaben. Dadurch wurde die Renin mRNA Abundanz um 70% und die Plasmapareninaktivität um 40% in den Wildtyp-tieren im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gesenkt. Ähnliche Veränderungen konnten auch in den Ren-AT_{1A}^{fl/fl}, AT_{1B}-KO und Ren-AT₁ko Tieren gesehen werden. Auch für die Suppression auf die Reninexpression und Reninfreisetzung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp-tieren und den Tieren mit den jeweiligen AT₁-Deletionen festgestellt werden (Abb. 28).

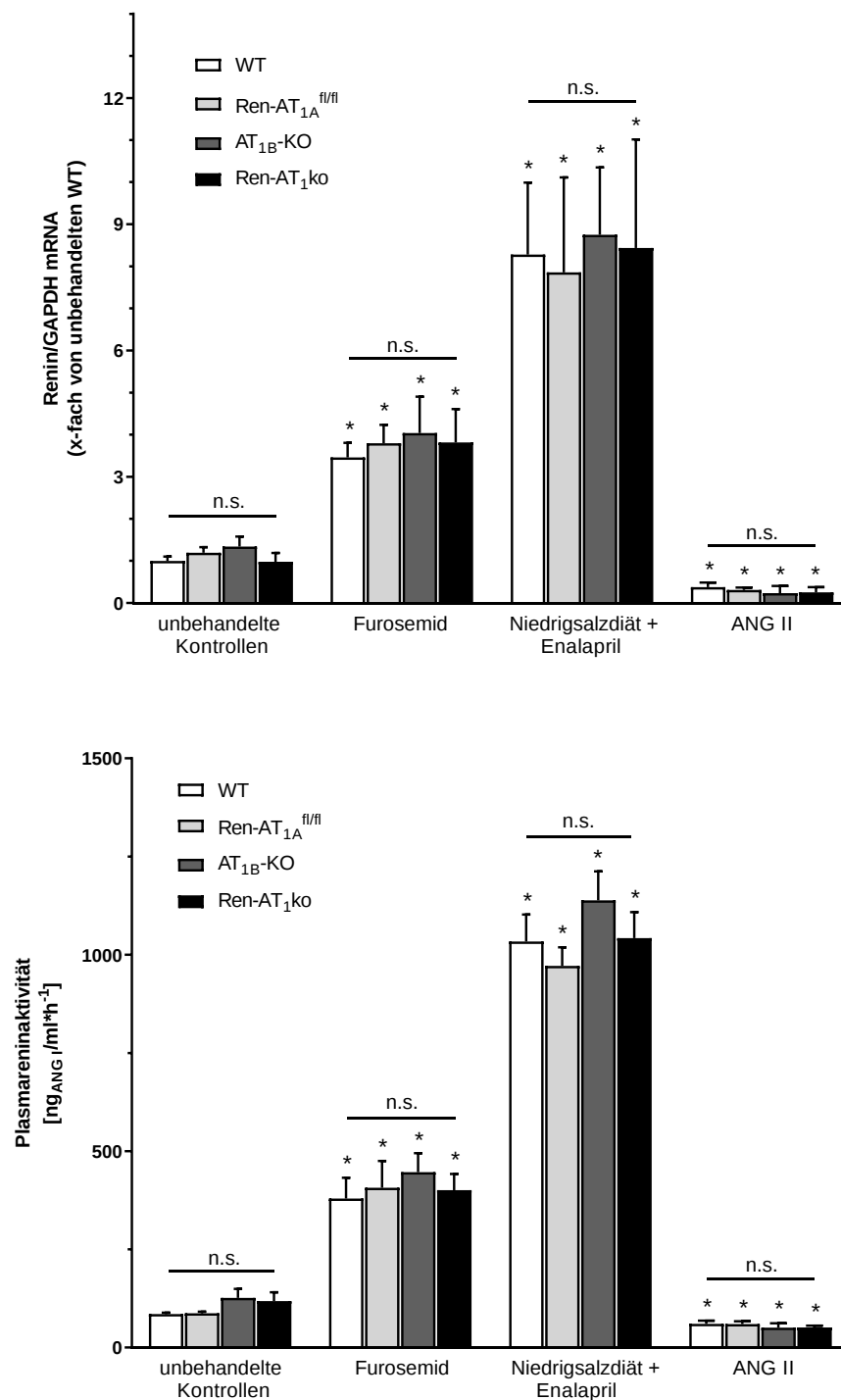


Abbildung 28. Renin mRNA Expression (oben) und Plasmareninaktivität (unten) der untersuchten Genotypen nach der Behandlung mit Furosemid, Nidrigsalzdiät + Enalapril und ANG II-Infusion. Zwischen den Genotypen waren keine Unterschiede in der Regulation von Renin als Reaktion auf die verschiedenen Stimuli zu sehen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 5-10 Tieren pro Genotyp. * kennzeichnet $p < 0,05$ verglichen mit den unbehandelten Kontrollen des jeweiligen Genotyps. n.s.: nicht signifikant (zwischen den Genotypen innerhalb einer Behandlung). Die Abbildung wurde modifiziert nach Neubauer et al.¹³²

Zusätzlich zur Regulation von Renin sollte der Blutdruck während der Infusion von ANG II bestimmt werden. Dazu wurde vor der Implantation der osmotischen Minipumpen von allen untersuchten Genotypen der basale systolische Blutdruck gemessen. Nach der Operation wurde den Tieren eine 4-tägige Erholungsphase zur Gewöhnung an die implantierten Pumpen gegeben und anschließend an den darauffolgenden 6 Tagen der systolische Blutdruck während der ANG II-Infusion gemessen. Bei den Wildtyptieren wurde basal ein Blutdruck von $115 \pm 2,6$ mmHg gemessen. Während der Infusion von ANG II stieg der Blutdruck auf $157 \pm 3,1$ mmHg an. Die Ren-AT_{1A}^{fl/fl} Tiere zeigten einen Anstieg des Ausgangswertes von $113 \pm 2,6$ mmHg auf $156 \pm 3,5$ mmHg. Auch die AT_{1B}-KO Tiere ($116 \pm 2,4$ mmHg vs. $153 \pm 2,8$ mmHg) und Ren-AT₁ko Tiere ($111 \pm 2,0$ mmHg vs. $153 \pm 1,7$ mmHg) zeigten ähnliche Blutdruckanstiege durch die ANG II-Infusion. Weder basal noch nach der Infusion von ANG II konnten signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen und den Wildtyptieren festgestellt werden (Abb. 29).

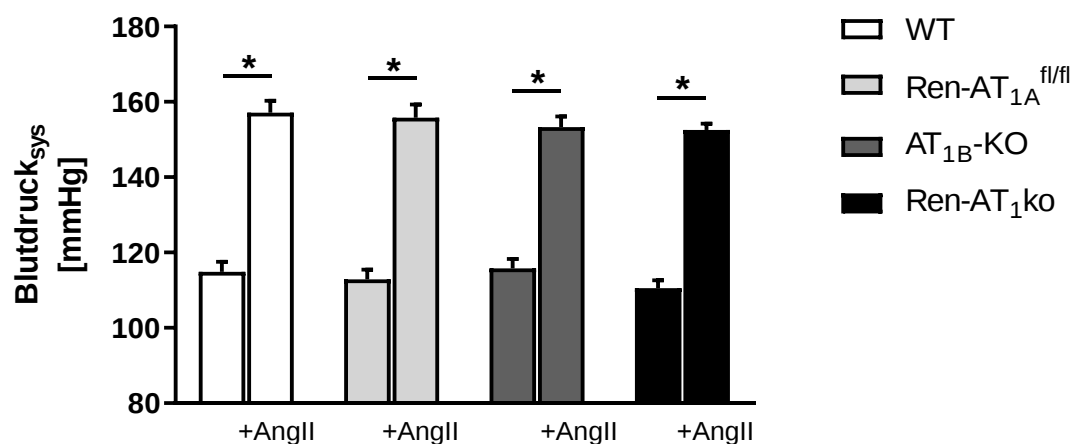


Abbildung 29. Systolischer Blutdruck vor und während ANG II-Infusion der AT₁-Knockouttiere verglichen mit den Wildtyptieren. Während der Infusion mit ANG II war in allen Genotypen ein signifikanter Anstieg des Blutdrucks in Vergleich zum basalen Ausgangswert zu messen. Dabei konnten weder basal noch während der Infusion mit ANG II signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 6 Tieren pro Genotyp. * kennzeichnet $p < 0,05$ während der ANG II-Infusion im Vergleich zum basalen Ausgangswert des jeweiligen Genotyps.

4 Diskussion

Das RAAS spielt nicht nur für die Regulation des Blutdrucks eine entscheidende Rolle, sondern hat auch eine essentielle Bedeutung für die Entwicklung und Funktion der Niere. Das Schlüsselhormon der RAAS-Kaskade ist ANG II. Seine Wirkung wird hauptsächlich über die AT_1 -Rezeptoren vermittelt. Während der Nephrogenese ist eine zeitlich präzise Steuerung des RAAS notwendig, damit eine normale Entwicklung und Funktion der Niere gewährleistet werden kann.^{99,102,103} Genetische Loss-of-Function-Mutationen^{105,112,113,133–135} oder eine pharmakologische Inhibition^{111,136–138} der AT_1 -Rezeptoren während der Nephrogenese können zu schweren Defekten in den Nieren von Säugetieren führen. Demnach ist anzunehmen, dass die renalen AT_1 -Rezeptoren für die Nephrogenese und die Nierenfunktion eine essentielle Rolle spielen. Es stellte sich daher die Frage, welche Zellen in der Niere AT_1 -Rezeptoren exprimieren und welchen Beitrag diese für die Entwicklung und die Funktion der Niere leisten.

Zudem wird den AT_1 -Rezeptoren auf Renin-produzierenden Zellen eine Rolle in der Vermittlung des direkten negativen Feedbacks von ANG II auf das RAAS zugeschrieben. Daher sollte zusätzlich die Existenz des direkten Rückkopplungsmechanismus von ANG II auf das RAAS untersucht werden.

4.1 Lokalisation der AT₁-Rezeptoren in der Niere

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen umfassenden Überblick über die zellspezifische Lokalisation und das Expressionsmuster der AT₁-Rezeptoren in der Mausniere, der Rattenniere und der humanen Niere zu erhalten. Davon ausgehend sollten Gemeinsamkeiten und mögliche Unterschiede zwischen den Expressionsmustern der intrarenalen AT₁-Rezeptoren in den Nieren von Mensch und Nagern ermittelt werden. Mithilfe verschiedener Tubulusmarker und Marker für interstitielle Zellen und Gefäße wurden Kolo-kalisationsstudien durchgeführt. Dadurch konnte die AT₁-Rezeptorexpression spezifisch den einzelnen Abschnitten des Tubulussystems und Gefäßsystems zugeordnet werden. Die Abbildung 30 fasst schematisch die Befunde zur Lokalisation der AT_{1A}-Rezeptorexpression in den Nieren von Mäusen und Ratten zusammen.

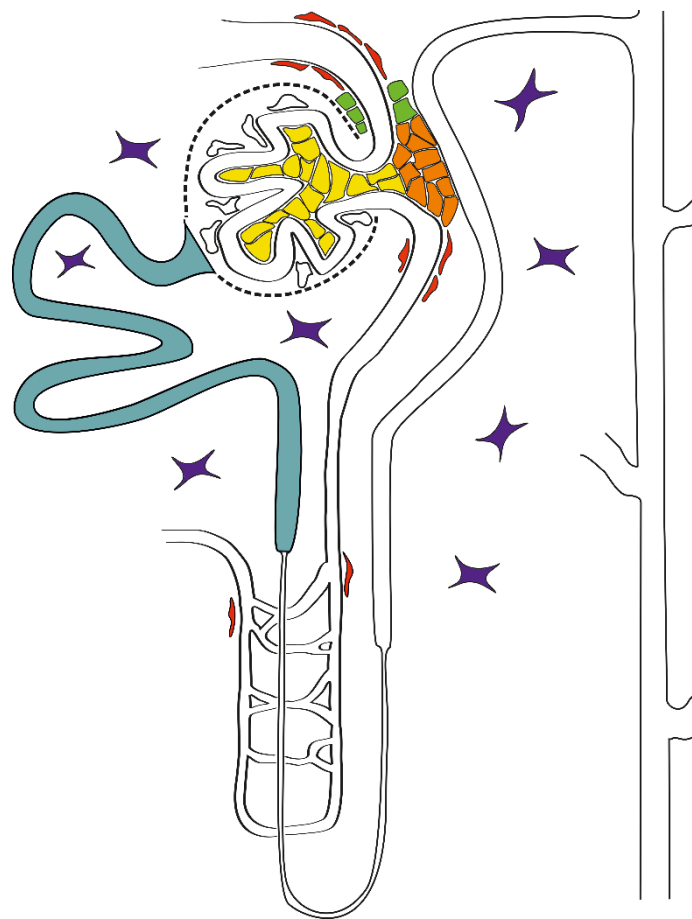


Abbildung 30. Schematische Zusammenfassung der Lokalisationsstudie mit den entsprechenden AT_{1A}-Rezeptor exprimierenden Kompartimenten (farbige Strukturen) in den Nieren von Mäusen und Ratten. Mittels in-situ Hybridisierung konnte die intrarenale Lokalisation der AT_{1A} mRNA in intraglomerulären (gelb) und extraglomerulären (orange) Mesangialzellen, Renin-produzierenden Zellen (grün) und in Zellen der afferenten und efferenten Arteriolen sowie den Vasa recta (rot) nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte die AT_{1A}-Rezeptorexpression in proximalen Tubuluszellen (blau) sowie interstitiellen Zellen des Kortex und der äußeren Medulla (lila) ermittelt werden.

Übereinstimmend mit der Expression in Nagern zeigen die Befunde, dass die AT₁-Rezeptoren in den humanen Nieren in Mesangialzellen und Renin-produzierenden Zellen exprimiert sind. In Nagern konnte zusätzlich in späten afferenten und frühen efferenten Arteriolen eine starke AT₁-Rezeptorexpression detektiert werden. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit Befunden aus früheren Studien in Rattennieren und menschlichen Nieren.^{50,51,82–84} Die hohe Expressionsdichte der AT₁-Rezeptoren im juxtaglomerulären Bereich und die fehlende Expression der Rezeptoren in größeren Gefäßen lässt vermuten, dass der renale vasokonstriktorische Effekt von ANG II hauptsächlich durch die Konstriktion der terminalen afferenten und frühen efferenten Arteriolen vermittelt wird. Eine entsprechende Konstriktion von beiden Gefäßabschnitten würde die Regulation der glomerulären Filtration erlauben, worauf auch bereits existierende Daten hindeuten.¹³⁹ Es würde implizieren, dass der Einfluss von ANG II auf die renale Perfusion sekundär zur Regulation der glomerulären Filtration ist. Zudem impliziert die starke Expression von AT₁-Rezeptoren in den Mesangialzellen aller untersuchten Spezies einen direkten Effekt von ANG II in diesen Zellen. Eine durch ANG II vermittelte direkte Kontraktion der Mesangialzellen würde entsprechend zu einer Senkung des glomerulären Ultrafiltrationskoeffizienten führen.¹⁴⁰

In allen drei untersuchten Spezies konnte eine Expression der AT₁-Rezeptoren in tubulointerstitiellen Zellen des Kortex und der äußeren Medulla festgestellt werden. Diese Zellen exprimierten PDGFR- β , was sie als fibroblastenartige Zellen oder Perizyten kennzeichnet.^{114,141} Einige interstitielle Zellen in der äußeren Medulla von Ratten zeigten zusätzlich eine Koexpression von AT_{1A} und α -SMA mRNA. Dabei handelt es sich vermutlich um kontraktile Perizyten. Dies ist in Übereinstimmung mit Befunden, in denen die AT₁-Rezeptoren in den Gefäßbündeln im Innenstreifen der äußeren Medulla detektiert wurden.^{82,83,96,142} Außerdem zeigten bereits frühere Studien, dass ANG II eine wichtige Rolle für die Regulation der medullären Perfusion spielt.¹⁴³

Ein Unterschied zwischen den Nieren von Nagern und Menschen zeigte sich in der Expression der AT₁ mRNA im renalen tubulären Kompartiment. Analog zu früheren Befunden konnte in Mäusen und Ratten AT_{1A} mRNA in proximalen Tubuluszellen nachgewiesen werden.^{3,50,51,144,145} Die Hybridisierungssignale der AT_{1A}-Rezeptoren in proximalen Tubuluszellen der Mausnieren waren dabei wesentlich stärker als die Signale in Rattennieren. Eine Expression des AT_{1A}-Rezeptors in anderen Abschnitten des Tubulussystems konnte im Gegensatz zu anderen Studien weder in Mausnieren noch in Rattennieren detektiert werden.^{80,81,87,146} In humanen Nieren konnte keine AT₁ Expression in Tubuluszellen nachgewiesen werden. Als Referenzmarker wurde hier der Natrium/Glukose-Kotransporter 2 (SGLT2) verwendet. SGLT2 ist ein Marker für die *pars convoluta* des proximalen Tubulus in Nieren von Mäusen und Menschen.^{147,148} Im renalen Kortex von Mäusen exprimierten alle Zellen, in denen die SGLT2 mRNA nachgewiesen wurde, auch AT_{1A}-Rezeptor mRNA. In den

humanen Nieren waren die Hybridisierungssignale für SGLT2 deutlich sichtbar und die Expressionsstärke vergleichbar mit der in der Mausniere. Jedoch konnte in diesen Zellen der humanen Nieren keine AT₁-Rezeptor mRNA detektiert werden. Aufgrund der suboptimalen Fixierung der humanen Gewebeproben kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Signale für schwächer exprimierte mRNAs nicht detektiert werden können. Die Ergebnisse zeigen dennoch, dass der Hauptexpressionsort für die AT₁-Rezeptoren in der humanen Niere die intraglomerulären Mesangialzellen sind und eine Expression der AT₁-Rezeptoren in humanen proximalen Tubuluszellen, falls vorhanden, deutlich schwächer zu sein scheint. Auch in anderen Studien an humanen Nieren konnte nur eine geringe Expression der AT₁-Rezeptoren in proximalen Tubuluszellen gefunden werden.^{84,149}

In dieser Arbeit wurde mittels in-situ Hybridisierung nur die Expression von mRNA nachgewiesen. Es ist schwierig, daraus eine konkrete Aussage über die Stärke der Proteinexpression abzuleiten. Jedoch dient die mRNA als Vorlage für die Proteinsynthese in den Zellen und ist demnach notwendig, um die Expression des entsprechenden Proteins zu gewährleisten.^{150,151} Die Befunde in dieser Arbeit zeigen die Unterschiede in den Expressionsorten oder den Expressionsstärken der AT₁-Rezeptoren zwischen Nagern und Menschen. Diese Unterschiede sollten beim Transfer von funktionellen Daten, welche aus Experimenten in Maus oder Rattennieren gewonnen werden, berücksichtigt werden.

4.2 Normale Nierenentwicklung in Mäusen mit einer Deletion der AT₁-Rezeptoren im FoxD1 exprimierenden Stromakompartiment

Mittels in-situ Hybridisierung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in adulten Mäusen AT_{1A}-Rezeptoren in Zellen des FoxD1-Kompartiments stark exprimiert sind. Dazu zählen Gefäßmuskelzellen, Renin-produzierende Zellen, Mesangialzellen und interstitielle Zellen. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung der AT₁-Rezeptoren in den Zellen des renalen FoxD1-Kompartiments für die Entwicklung und die Funktion der Nieren zu untersuchen. Dafür wurden Mäuse gezüchtet, die eine Deletion von AT_{1A}-Rezeptoren spezifisch in den Zellen aufwiesen, die aus dem stromalen FoxD1-Kompartiment hervorgehen. Um eine mögliche kompensatorische Regulation über die AT_{1B}-Rezeptoren ausschließen zu können, wurden zugleich die AT_{1B}-Rezeptoren global deletiert.

Obwohl die Gene für AT_{1A} und FoxD1 in Mäusen beide auf Chromosom 13 liegen, konnte durch den relativ großen Abstand von etwa 39 Centimorgan^{126,127} zwischen den beiden Genloci ein *Crossing over* stattfinden. Dadurch war die Zucht von Mäusen mit einem konditionalen

AT_{1A}-Rezeptor-Knockout im FoxD1-Kompartiment möglich. Die erfolgreiche Deletion konnte durch den signifikanten Rückgang der AT_{1A} mRNA Abundanz in der Gesamtniere gezeigt werden. In isolierten Glomeruli von FoxD1-AT₁ko Tieren war nahezu keine AT_{1A} mRNA mehr detektierbar. Auch mittels in-situ Hybridisierung konnte in Renin-produzierenden Zellen, Mesangialzellen, interstitiellen Zellen und glatten Gefäßmuskelzellen der FoxD1-AT₁ko Tiere eine Deletion der AT_{1A} mRNA nachgewiesen werden. Die Expression in den proximalen Tubuli blieb jedoch bestehen und war in FoxD1-AT₁ko Mäusen mit gleicher Intensität wie in Kontrolltieren vorhanden. Zudem zeigten die Versuche an isoliert perfundierten Nieren von FoxD1-AT₁ko Tieren, dass sowohl der vasokonstriktorische Effekt von ANG II, als auch die hemmende Wirkung auf die Reninsekretion aufgehoben war.

Die FoxD1-AT₁ko Mäuse zeigten keine Auffälligkeiten in der Nierenentwicklung. Die Papille war normal entwickelt und die Harnkonzentrierung war nicht beeinträchtigt. Auch die funktionellen Daten, wie Blutdruck oder GFR, waren unverändert zu den Kontrolltieren. Im Gegensatz zu Tieren mit globaler Deletion oder pharmakologischer Inhibition der AT₁-Rezeptoren konnte keine Verdickung der Arterienwände,^{112,113,133} keine Hyperplasie der Renin-produzierenden Zellen,^{112,134,136} und keine Fibrose im Interstitium festgestellt werden.¹³³ Daher scheinen diese unauffälligen *in vivo* Daten in Konflikt mit den *in vitro* Befunden der isoliert perfundierten Niere zu stehen. Basierend auf den Ergebnissen der isoliert perfundierten Niere würde man vermuten, dass die Reninsekretion in den FoxD1-AT₁ko Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht sein sollte, wenn der inhibitorische Effekt des zirkulierenden ANG II auf die Reninsekretion fehlt. Die FoxD1-AT₁ko Tiere zeigten jedoch weder veränderte Reninexpression noch erhöhte Plasmareninaktivität, oder eine Hyperplasie der Renin-produzierenden Zellen. Der direkte inhibierende Effekt von ANG II auf die Regulation von Renin scheint demnach *in vivo* keine große Rolle zu spielen. Dies würde auch zu den Befunden passen, in denen bereits in früheren Studien die Existenz des direkten negativen Rückkopplungseffekts von ANG II auf die AT₁-Rezeptoren der Renin-produzierenden Zellen angezweifelt wurde.^{59,60} In den isoliert perfundierten Nieren von Wildtyp-Tieren nehmen der Perfusionsfluss und die Reninsekretion in Reaktion auf die Gabe von ANG II in paralleler Weise ab (s. Abb. 22).¹⁵² Eine mögliche Erklärung wäre daher, dass die Effekte auf die Reninsekretion als Reaktion auf die von ANG II-vermittelten vaskulären Effekte erfolgen. Auch in Tieren ohne AT₁-Rezeptoren in Gefäßmuskelzellen waren der mittlere renale Blutfluss und die Reninexpression unverändert.¹⁵³ Da die GFR in den FoxD1-AT₁ko Tieren nicht verändert war, ist anzunehmen, dass der Blutfluss *in vivo* in diesen Tieren normal ist. Dies wiederum unterstützt die Befunde der unveränderten Plasmareninaktivität in den FoxD1-AT₁ko Tieren.

In den FoxD1-AT₁ko Tieren konnten keine der charakteristischen strukturellen und funktionellen Nierenveränderungen nachgewiesen werden, die mit einer globalen Inaktivierung der AT₁-Rezeptoren assoziiert sind. Daher scheinen die Schädigungen nicht

direkt aus der Inhibition der Effekte von ANG II auf die Zellen des FoxD1-Kompartiments zu resultieren. Es ist davon auszugehen, dass die AT_{1A} -Rezeptoren in Glattmuskelzellen, Fibroblasten, Mesangialzellen oder Renin-produzierenden Zellen nicht essentiell für eine normale Nierenentwicklung sind. Die AT_1 -Rezeptoren außerhalb dieses Kompartiments scheinen eine größere Bedeutung für die Nephrogenese zu haben. Daher stellt sich die Frage, in welchen Zellen eine intakte Funktion der AT_1 -Rezeptoren für eine normale Entwicklung des Gefäßsystems, des Tubulussystems und der endokrinen Nierenfunktion unabdingbar ist. Bei der Entwicklung von menschlichen renalen Fetopathien, die durch Defekte des RAAS entstehen können, geht man davon aus, dass der erniedrigte Blutdruck der Hauptgrund für die Beeinträchtigung der Nierenentwicklung und des Nierenwachstums ist.⁹⁹ Analog dazu haben auch Mäuse mit einem globalen Defekt der AT_1 -Rezeptoren einen erniedrigten Blutdruck.^{112,113} Nachweislich an der direkten oder indirekten Regulation des Blutdrucks beteiligt sind die AT_{1A} -Rezeptoren in proximalen Tubuluszellen oder AT_1 -Rezeptoren im Gehirn.^{3,10,154,155} Im Unterschied zu den globalen AT_1 -Knockouttieren waren diese in FoxD1- AT_1 ko Mäusen nicht beeinträchtigt. In Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass die AT_1 -Rezeptoren im Gehirn auch die Nierenentwicklung beeinflussen können.¹⁵⁶ Weitere Kandidaten zur Beeinflussung des Blutdrucks sind die AT_1 -Rezeptoren in systemischen Gefäßen, die den systemischen Gefäßwiderstand regulieren, oder AT_1 -Rezeptoren in der Nebenniere, welche entscheidend für die Natriumreabsorption sind.^{4-6,153} Eine Deletion der AT_1 -Rezeptoren im Gefäßsystem führt bei normaler Salzzufuhr zu einem moderaten Abfall des Blutdrucks. Jedoch zeigen diese Tiere nicht den renalen Phänotyp, der mit einer globalen Deletion der AT_1 -Rezeptoren assoziiert ist.¹⁵³ Eine beeinträchtigte Synthese von Aldosteron in den Nebennieren, welche normalerweise durch die AT_1 -Rezeptoren vermittelt wird,⁴ kann zur Ausprägung des renalen Phänotyps von globalen AT_1 -Knockouttieren führen, jedoch in abgeschwächter Form.¹⁵⁷ Daher scheinen die AT_1 -Rezeptoren in den Glomerulosazellen der Nebennieren relevant für eine normale Nierenentwicklung zu sein. Mäuse mit einer Defizienz der Aldosteronsynthase haben zudem einen erniedrigten Blutdruck und eine ausgeprägte Hyperplasie Renin-produzierender Zellen, obwohl die AT_1 -Rezeptoren auf den Renin-produzierenden Zellen unverändert exprimiert sind.¹⁵⁷ Die Hyperplasie der Renin-produzierenden Zellen, die durch die Aldosteron-Defizienz verursacht wird, ist auf eine erhöhte Expression von Cox-2 und der vermehrten Bildung von Prostaglandin E₂ durch die Macula densa Zellen zurückzuführen.¹⁵⁸ Auch eine globale Inaktivierung von AT_1 -Rezeptoren führt zu einer erhöhten renalen Cox-2 Expression in den Macula densa Zellen, was wahrscheinlich über die reduzierte Produktion von Aldosteron vermittelt wird.¹⁵⁹

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die AT_1 -Rezeptoren im stromalen FoxD1-Kompartiment der Niere keine essentielle Bedeutung für die renale Entwicklung und die Funktion der Niere haben.

4.3 Unbeeinträchtigte Regulation der Reninsekretion in Mäusen mit einer Deletion der AT₁-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen

Bei der Untersuchung der FoxD1-AT₁ko Tiere fiel auf, dass die Regulation von Renin nicht beeinträchtigt war, obwohl in diesen Tieren die AT_{1A}-Rezeptoren unter anderem in Renin-produzierenden Zellen fehlten. Daher sollte im letzten Teil dieser Arbeit nochmal spezifisch die Existenz einer direkten Feedback-Regulation von ANG II auf Ebene der Renin-produzierenden Zellen *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden Mäuse generiert, die eine spezifische Deletion der AT_{1A}-Rezeptoren in den Renin-produzierenden Zellen aufwiesen.

Eine gewisse Limitation dieser Studie ergibt sich dadurch, dass der murine Ren-1 Promotor während der Entwicklung auch in Nierenzellen aktiv ist, die letztlich aber nicht zu den Renin-produzierenden Zellen werden.⁴⁰ Demnach sollte berücksichtigt werden, dass die AT_{1A}-Rezeptoren zwar hauptsächlich, aber nicht ausschließlich in Renin-produzierenden Zellen der untersuchten Ren-AT₁ko Tiere deletiert wurden. Wie bereits die FoxD1-AT₁ko Tiere zeigten auch die Ren-AT₁ko Tiere keine renalen Auffälligkeiten oder Schädigungen, die bei globalen AT₁-Knockouts zu finden sind. Zudem konnte in den Ren-AT₁ko Tieren ein normales und intaktes RAAS festgestellt werden. Die Renin-produzierenden Zellen in den Ren-AT₁ko Mäusen zeigten keine Auffälligkeiten in der Verteilung oder der basalen Expression und Sekretion von Renin. Im Gegensatz dazu wurde bei einer globalen Deletion des AT_{1A}-Rezeptors oder bei systemischer Deletion von beiden Rezeptor-Isoformen (AT_{1A} und AT_{1B}) eine Hyperplasie Renin-produzierender Zellen und ein Anstieg der Reninexpression um das 5- bis 10-fache im Vergleich zu Wildtyptieren beschrieben.^{112,160–163}

In den untersuchten Ren-AT₁ko Mäusen stieg die Reninexpression in Reaktion auf eine Nidrigsalzdiät in Kombination mit zeitgleicher Gabe eines ACE-Hemmers stark an. Die Stärke der Stimulation von Reninexpression und Reninsekretion in den Ren-AT₁ko Tieren war jedoch nicht von den Kontrolltieren zu unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss von ANG II auf die Reninexpression auf indirekte Weise vermittelt wird. In Übereinstimmung mit früheren Studien konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Infusion von ANG II die Expression und Sekretion von Renin vermindert.^{56,58} Dieser Effekt konnte sowohl bei den Kontrolltieren als auch den AT₁-Knockouttieren in vergleichbarer Weise beobachtet werden. Diese Befunde lassen die Existenz eines direkten negativen Rückkopplungsmechanismus in Frage stellen. Bereits frühere Studien ließen Zweifel an der Existenz des direkten Feedback-Mechanismus aufkommen. Matsusaka *et al.* konnten in chimären Mäusen, die jeweils eine Mischung aus Wildtypzellen und AT_{1A}-defizienten Zellen aufwiesen, keinen Zusammenhang zwischen der An- oder Abwesenheit von AT₁-Rezeptoren auf Renin-produzierenden Zellen und der Produktion von Renin feststellen.⁵⁹ Dies würde gegen das Konzept sprechen, dass die ANG II-vermittelte Regulation der Reninproduktion eine lokale Interaktion mit den AT₁-

Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen involviert. Eine weitere Studie fand in Tieren mit intakten systemischen AT_{1A} -Rezeptoren, denen eine Niere ohne AT_{1A} -Rezeptoren transplantiert wurde, eine normale renale Reninexpression.⁶⁰ Zusätzlich konnte eine *in vitro* Studie mit Einzelzellen zeigen, dass supraphysiologische Konzentrationen von ANG II in weniger als 40% der isolierten adulten Renin-produzierenden Zellen eine Inhibierung der Reninsekretion hervorruft. Dies würde darauf hindeuten, dass ein Großteil der Renin-produzierenden Zellen nicht direkt durch ANG II beeinflusst werden kann. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass die hier verwendeten Konzentrationen an ANG II, die für den inhibierenden Effekt notwendig waren, *in vivo* erreicht werden können.⁵³ Über welche Signalwege ANG II Einfluss auf das RAAS nehmen könnte, wenn kein offensichtlicher direkter Effekt auf der Ebene der Renin-produzierenden Zellen *in vivo* erfolgt, bedarf näherer Untersuchungen. Die Gabe eines ACE-Hemmers in Kombination mit der Niedrigsalzdiät führte in Kontrolltieren und Mäusen ohne AT_1 -Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen zu einer vergleichbaren Abnahme des Blutdrucks.¹³² Entsprechend dazu führte die Infusion mit ANG II in beiden Genotypen zu ähnlichen Blutdruckanstiegen. Übereinstimmend mit den FoxD1- AT_1 ko Tieren weisen auch die *in vivo* Daten der Ren- AT_1 ko Tiere darauf hin, dass der entscheidende Faktor für die Regulation von Reninexpression und -sekretion der Blutdruck zu sein scheint. Bekanntermaßen beeinflusst der Blutdruck das RAAS in reziproker Weise.^{2,160,164} Weiterhin stützt auch der Befund, dass Mäuse mit globaler AT_1 -Rezeptordeletion einen erniedrigten Blutdruck aufweisen,¹⁶⁵ während die untersuchten Ren- AT_1 ko Tiere einen normalen Blutdruck zeigten, die Annahme, dass der Blutdruck entscheidend für die Reninregulation ist. Zusammenfassend gaben die Untersuchungen an den Ren- AT_1 ko Mäusen keinen Hinweis darauf, dass ein direkter Rückkopplungsmechanismus von ANG II auf Ebene der Renin-produzierenden Zellen existiert, der die Regulation von Reninproduktion und Reninfreisetzung *in vivo* beeinflusst.

5 Zusammenfassung

In der adulten Niere werden die Effekte von ANG II hauptsächlich über AT₁-Rezeptoren vermittelt. Die bisherigen Befunde zur renalen Lokalisation der AT₁-Rezeptoren weisen jedoch teilweise Unstimmigkeiten auf. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, einen Überblick über die Expression von AT₁-Rezeptoren in Maus-, Ratten- und menschlichen Nieren zu erstellen. Mithilfe der zellspezifischen und hochauflösenden RNAscope® Technik wurden Kolokalisationsstudien mit verschiedenen Markern durchgeführt, um spezifisch zwischen einzelnen Segmenten des tubulären und vaskulären Systems unterscheiden zu können. Übereinstimmend in den Nieren von Mäusen, Ratten und Menschen konnte dabei die AT₁-Rezeptorexpression in Mesangialzellen und Renin-produzierenden Zellen, sowie in interstitiellen Zellen des Kortex und der äußeren Medulla nachgewiesen werden. In Nagern konnte zusätzlich die Expression in späten afferenten und frühen efferenten Arteriolen gezeigt werden. Jedoch wurde in keiner der untersuchten Spezies eine Expression von AT₁-Rezeptoren in größeren Gefäßen detektiert. Zwischen den Spezies konnten Unterschiede in der tubulären Expression von AT₁-Rezeptoren festgestellt werden. In Mäusen war eine starke AT₁-Rezeptorexpression in proximalen Tubuluszellen vorhanden, wohingegen in humanen Nieren keine Expression in Zellen des Tubulussystems detektierbar war. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die (juxta)glomerulären Bereiche und das Tubulointerstitium die konservierten Expressionsstellen der AT₁-Rezeptoren zwischen den Spezies sind. Dadurch bilden sie vermutlich die Hauptzielstrukturen für ANG II in adulten humanen Nieren sowie den Nieren von Mäusen und Ratten. Diese Zellen des (juxta)glomerulären Bereiches und des Tubulointerstitiums stammen in der Maus von den FoxD1-positiven Stromavorläuferzellen ab und spielen eine entscheidende Rolle für die Nephrogenese. Daher wurde die Relevanz der AT₁-Rezeptoren in diesen Zellen für die Entwicklung und Funktion der Niere untersucht. Dafür wurden Mäuse mit einer spezifischen Deletion der AT₁-Rezeptoren in der FoxD1-positiven Stromazellpopulation gezüchtet. Diese Tiere entwickelten sich normal und die Nieren zeigten weder strukturelle noch funktionelle Veränderungen *in vivo*. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Deletion der AT₁-Rezeptoren in den Stromavorläuferzellen und deren Abkömmlingen die normale Nierenentwicklung und Nierenfunktion nicht beeinflussen. Desweiteren wird angenommen, dass ANG II einen direkten Effekt auf die AT₁-Rezeptoren der Renin-produzierenden Zellen ausübt und damit die Expression und Sekretion von Renin reguliert wird. In der Lokalisationsstudie konnte eine starke Expression der AT₁-Rezeptoren in Renin-produzierenden Zellen bestätigt werden. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Validität eines direkten ANG II-vermittelten Feedbacks auf die AT₁-Rezeptoren der Renin-produzierenden Zellen *in vivo* zu überprüfen. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit spezifischer AT₁-Rezeptordeletion in Renin-produzierenden Zellen keine Auffälligkeiten in

Bezug auf die Anzahl der Renin-produzierenden Zellen, die renale Renin mRNA Abundanz und Plasmapreninaktivität aufweisen. Auch bei einer Inhibition von ACE oder einer Infusion von ANG II verhielt sich die Regulation von Renin in Ren-AT₁ko Tieren wie in Kontrolltieren. Zusammenfassend scheinen die AT₁-Rezeptoren auf den Renin-produzierenden Zellen keine essentielle Rolle für die normale Regulation der Reninexpression und Reninsekretion in Mäusen zu spielen. Die Daten gaben keinen Hinweis darauf, dass *in vivo* ein direkter Rückkopplungseffekt von ANG II auf Ebene der Renin-produzierenden Zellen vorhanden ist, der eine Bedeutung für die Regulation von Renin hat.

6 Literaturverzeichnis

1. Wagner, C. & Kurtz, A. Regulation of renal renin release. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **7**, 437–441 (1998).
2. Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D. & Taugner, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol. Rev.* **70**, 1067–1116 (1990).
3. Gurley, S. B. *et al.* AT1A angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure. *Cell Metab.* **13**, 469–475 (2011).
4. Aguilera, G. Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* **90**, 53–60 (1992).
5. Masilamani, S., Kim, G.-H., Mitchell, C., Wade, J. B. & Knepper, M. A. Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β , and γ subunit proteins in rat kidney. *J. Clin. Invest.* **104**, R19–R23 (1999).
6. Griendling, K. K., Ushio-Fukai, M., Lassègue, B. & Alexander, R. W. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **29**, 366–373 (1997).
7. Brewster, U. C. & Perazella, M. A. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am. J. Med.* **116**, 263–272 (2004).
8. Kaschina, E. & Unger, T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* **12**, 70–88 (2003).
9. Stoll, M. & Unger, T. Angiotensin and its AT2 receptor: new insights into an old system. *Regul. Pept.* **99**, 175–182 (2001).
10. Forrester, S. J. *et al.* Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **98**, 1627–1738 (2018).
11. Bader, M. ACE2, angiotensin-(1–7), and Mas: the other side of the coin. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **465**, 79–85 (2013).
12. Santos, R. A. S. *et al.* Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8258–8263 (2003).
13. Alenina, N., Xu, P., Rentzsch, B., Patkin, E. L. & Bader, M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp. Physiol.* **93**, 528–537 (2008).
14. Metzger, R. *et al.* Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett.* **357**, 27–32 (1995).

15. Bader, M. Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 439–465 (2010).
16. Bader, M. ACE2 – das missbrauchte Multitalent. *Nephrol.* 1–4 (2020) doi:10.1007/s11560-020-00448-0.
17. Santos, R. A. S. & Ferreira, A. J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **16**, 122–128 (2007).
18. Passos-Silva, D. G., Verano-Braga, T. & Santos, R. A. S. Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions. *Clin. Sci.* **124**, 443–456 (2013).
19. Urata, H., Kinoshita, A., Misono, K. S., Bumpus, F. M. & Husain, A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J. Biol. Chem.* **265**, 22348–22357 (1990).
20. Belova, L. A. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochem. Biokhimiia* **65**, 1337–1345 (2000).
21. Paul, M., Poyan Mehr, A. & Kreutz, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol. Rev.* **86**, 747–803 (2006).
22. Hollenberg, N. Pharmacologic interruption of the renin-angiotensin system and the kidney: differential responses to angiotensin-converting enzyme and renin inhibition. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* (1999).
23. Bader, M. *et al.* Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **79**, 76–102 (2001).
24. Fitzsimons, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol. Rev.* **78**, 583–686 (1998).
25. Aguilera, G. & Kiss, A. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Vasopressin Secretion. in *Recent Advances in Cellular and Molecular Aspects of Angiotensin Receptors* (eds. Raizada, M. K., Phillips, M. I. & Sumners, C.) 105–112 (Springer US, 1996). doi:10.1007/978-1-4899-1376-0_11.
26. Wright, J. W. & Harding, J. W. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **18**, 21–53 (1994).
27. Koch-Weser Jan. Myocardial Actions of Angiotensin. *Circ. Res.* **14**, 337–344 (1964).
28. Leung, P. S. The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 267–273 (2004).
29. Wright, J. W. & Harding, J. W. The brain RAS and Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **223**, 326–333 (2010).

30. Mogi, M. & Horiuchi, M. Effect of angiotensin II type 2 receptor on stroke, cognitive impairment and neurodegenerative diseases. *Geriatr. Gerontol. Int.* **13**, 13–18 (2013).
31. Dostal, D. E. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul. Pept.* **91**, 1–11 (2000).
32. Dinh, D. T., Frauman, A. G., Johnston, C. I. & Fabiani, M. E. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 **100**, 481–492 (2001).
33. Crowley, S. D. *et al.* Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17985–17990 (2006).
34. Bader, M., Santos, R. A., Unger, T. & Steckelings, U. M. New therapeutic pathways in the RAS. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. JRAAS* **13**, 505–508 (2012).
35. Ekker, M., Tronik, D. & Rougeon, F. Extra-renal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 5155–5158 (1989).
36. Campbell, D. J., Kladis, A. & Duncan, A. M. Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **22**, 513–522 (1993).
37. Peters, J. *et al.* Losartan and angiotensin II inhibit aldosterone production in anephric rats via different actions on the intraadrenal renin-angiotensin system. *Endocrinology* **140**, 675–682 (1999).
38. Sequeira-Lopez, M. L. S. *et al.* The earliest metanephric arteriolar progenitors and their role in kidney vascular development. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **308**, R138–R149 (2015).
39. Sauter, A., Machura, K., Neubauer, B., Kurtz, A. & Wagner, C. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int.* **73**, 43–51 (2008).
40. Sequeira López, M. L. S., Pentz, E. S., Nomasa, T., Smithies, O. & Gomez, R. A. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev. Cell* **6**, 719–728 (2004).
41. Spangler, W. L. Pathophysiologic response of the juxtaglomerular apparatus to dietary sodium restriction in the dog. *Am. J. Vet. Res.* **40**, 809–809 (1979).
42. Graham, P. C., Stewart, H. V., Downie, I. & Lindop, G. B. The distribution of renin-containing cells in kidneys with renal artery stenosis--an immunocytochemical study. *Histopathology* **16**, 347–355 (1990).
43. Schweda, F. Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **467**, 565–576 (2015).
44. Castrop, H. *et al.* Physiology of kidney renin. *Physiol. Rev.* **90**, 607–673 (2010).

45. Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O. & Kurtz, A. Renin Release. *Physiology* **22**, 310–319 (2007).
46. Davis, J. O. & Freeman, R. H. Mechanisms regulating renin release. *Physiol. Rev.* **56**, 1–56 (1976).
47. Scholz, H., Kaissling, B., Inagami, T. & Kurtz, A. Differential response of renin secretion to vasoconstrictors in the isolated perfused rat kidney. *J. Physiol.* **441**, 453–468 (1991).
48. Carey, R. M., McGrath, H. E., Pentz, E. S., Gomez, R. A. & Barrett, P. Q. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J. Clin. Invest.* **100**, 1566–1574 (1997).
49. Boivin, V. *et al.* Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int.* **59**, 515–531 (2001).
50. Kakinuma, Y., Fogo, A., Inagami, T. & Ichikawa, I. Intrarenal localization of angiotensin II type 1 receptor mRNA in the rat. *Kidney Int.* **43**, 1229–1235 (1993).
51. Gasc, J. M., Shanmugam, S., Sibony, M. & Corvol, P. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **24**, 531–537 (1994).
52. Lorenz, J. N. *et al.* Effects of adenosine and angiotensin on macula densa-stimulated renin secretion. *Am. J. Physiol.* **265**, F187-194 (1993).
53. Tufro-McReddie, A. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor: role in renal growth and gene expression during normal development. *Am. J. Physiol.* **266**, F911-918 (1994).
54. Owen, R. A. *et al.* The morphology of juxtaglomerular cell hyperplasia and hypertrophy in normotensive rats and monkeys given an angiotensin II receptor antagonist. *Toxicol. Pathol.* **23**, 606–619 (1995).
55. Wagner, C., Kees, F., Krämer, B. K. & Kurtz, A. Role of sympathetic nerves for the stimulation of the renin system by angiotensin II receptor blockade. *J. Hypertens.* **15**, 1463–1469 (1997).
56. Johns, D. W., Peach, M. J., Gomez, R. A., Inagami, T. & Carey, R. M. Angiotensin II regulates renin gene expression. *Am. J. Physiol.* **259**, F882-887 (1990).
57. Naftilan, A. J. & Oparil, S. Inhibition of renin release from rat kidney slices by the angiotensins. *Am. J. Physiol.* **235**, F62-68 (1978).
58. Vander, A. J. & Geelhoed, G. W. Inhibition of Renin Secretion by Angiotensin .II. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **120**, 399–403 (1965).
59. Matsusaka, T. *et al.* Chimeric mice carrying 'regional' targeted deletion of the angiotensin type 1A receptor gene. Evidence against the role for local angiotensin in the in vivo

- feedback regulation of renin synthesis in juxtaglomerular cells. *J. Clin. Invest.* **98**, 1867–1877 (1996).
60. Crowley, S. D. *et al.* Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* **115**, 1092–1099 (2005).
 61. Karnik, S. S. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacol. Rev.* **67**, 754–819 (2015).
 62. Benigni, A. *et al.* Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 524–530 (2009).
 63. Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsoy, M. & Coffman, T. M. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. in *Comprehensive Physiology* 1201–1228 (American Cancer Society, 2014). doi:10.1002/cphy.c130040.
 64. Gasparo, M. de, Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. & Unger, T. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 415–472 (2000).
 65. Mehta, P. K. & Griendling, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C82–97 (2007).
 66. Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **34**, 976–982 (1999).
 67. Khan, N. S. *et al.* Cytosolic phospholipase A2 α is critical for angiotensin II-induced hypertension and associated cardiovascular pathophysiology. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **65**, 784–792 (2015).
 68. Sayeski, P. P. & Bernstein, K. E. Signal transduction mechanisms of the angiotensin II type AT(1)-receptor: looking beyond the heterotrimeric G protein paradigm. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. JRAAS* **2**, 4–10 (2001).
 69. Chen, X., Wang, J., Zhou, F., Wang, X. & Feng, Z. STAT proteins mediate angiotensin II-induced production of TIMP-1 in human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* **64**, 459–467 (2003).
 70. Booz, G. W., Day, J. N. E. & Baker, K. M. Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 1443–1453 (2002).
 71. Kawai, T. *et al.* AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* **125**, 4–13 (2017).

72. Zohn, I. E., Yu, H., Li, X., Cox, A. D. & Earp, H. S. Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6160–6168 (1995).
73. Higuchi, S. *et al.* Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin. Sci.* **112**, 417–428 (2007).
74. Taniyama, Y. *et al.* Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C494-499 (2004).
75. Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D. & Alexander, R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **74**, 1141–1148 (1994).
76. Touyz, R. M. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **37**, 1263–1273 (2004).
77. Griendling, K. K., Sorescu, D. & Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* **86**, 494–501 (2000).
78. Shanmugam, S. & Sandberg, K. ONTOGENY OF ANGIOTENSIN II RECEPTORS. *Cell Biol. Int.* **20**, 169–176 (1996).
79. Billet, S. *et al.* Gain-of-function mutant of angiotensin II receptor, type 1A, causes hypertension and cardiovascular fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 1914–1925 (2007).
80. Terada, Y., Tomita, K., Nonoguchi, H. & Marumo, F. PCR localization of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNAs in rat kidney. *Kidney Int.* **43**, 1251–1259 (1993).
81. Miyata, N., Park, F., Li, X. F. & Cowley, A. W. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* **277**, F437-446 (1999).
82. Sechi, L. A., Grady, E. F., Griffin, C. A., Kalinyak, J. E. & Schambelan, M. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **262**, F236–F240 (1992).
83. Zhuo, J., Dean, R., MacGregor, D., Alcorn, D. & Mendelsohn, F. A. Presence of angiotensin II AT2 receptor binding sites in the adventitia of human kidney vasculature. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23 Suppl 3**, S147-154 (1996).
84. Gröne, H. J., Simon, M. & Fuchs, E. Autoradiographic characterization of angiotensin receptor subtypes in fetal and adult human kidney. *Am. J. Physiol.* **262**, F326-331 (1992).
85. Gibson, R. E. *et al.* Angiotensin II receptor subtypes in renal cortex of rats and rhesus monkeys. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **261**, F512–F518 (1991).

86. Gimonet, V. *et al.* Nephrogenesis and angiotensin II receptor subtypes gene expression in the fetal lamb. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **274**, F1062–F1069 (1998).
87. Imanishi, K. *et al.* Type 1A angiotensin II receptor is regulated differently in proximal and distal nephron segments. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* **26**, 405–411 (2003).
88. Joly, E. *et al.* Differential Regulation of Angiotensin II Receptors During Renal Injury and Compensatory Hypertrophy in the Rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **32**, 241–248 (2005).
89. Herrera, M., Sparks, M. A., Alfonso-Pecchio, A. R., Harrison-Bernard, L. M. & Coffman, T. M. Lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type 1 receptor (AT1R) protein. *Hypertension* **61**, 253–258 (2013).
90. Bouressam, M.-L., Lartaud, I., Dupuis, F. & Lecat, S. No answer to the lack of specificity: mouse monoclonal antibody targeting the angiotensin II type 1 receptor AT1 fails to recognize its target. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **391**, 883–889 (2018).
91. Reinhold, S. W. *et al.* Nephron-specific expression of components of the renin–angiotensin–aldosterone system in the mouse kidney. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **13**, 46–55 (2012).
92. Qian, X. & Lloyd, R. Recent Developments in Signal Amplification Methods for In Situ Hybridization. *Diagn. Mol. Pathol.* **12**, 1–13 (2003).
93. Levsky, J. M. & Singer, R. H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J. Cell Sci.* **116**, 2833–2838 (2003).
94. Mahmood, R. & Mason, I. In-Situ Hybridization of Radioactive Riboprobes to RNA in Tissue Sections. in *Molecular Embryology: Methods and Protocols* (eds. Sharpe, P. T. & Mason, I.) 675–686 (Humana Press, 2009). doi:10.1007/978-1-60327-483-8_45.
95. Kakuchi, J. *et al.* Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. *Kidney Int.* **47**, 140–147 (1995).
96. Aguilera, G., Kapur, S., Feuillan, P., Sunar-Akbasak, B. & Bathia, A. J. Developmental changes in angiotensin II receptor subtypes and AT1 receptor mRNA in rat kidney. *Kidney Int.* **46**, 973–979 (1994).
97. Matsubara, H. *et al.* Tissue-Specific Expression of Human Angiotensin II AT1 and AT2 Receptors and Cellular Localization of Subtype mRNAs in Adult Human Renal Cortex Using in situ Hybridization. *Nephron* **80**, 25–34 (1998).
98. Schütz, S., Le Moullec, J. M., Corvol, P. & Gasc, J. M. Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. *Am. J. Pathol.* **149**, 2067–2079 (1996).

99. Gubler, M. C. & Antignac, C. Renin-angiotensin system in kidney development: renal tubular dysgenesis. *Kidney Int.* **77**, 400–406 (2010).
100. Pipkin, F. B. The renin-angiotensin system in mother and foetus. *Equine Vet. J.* **16**, 253–255 (1984).
101. Guron, G. & Friberg, P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J. Hypertens.* **18**, 123–137 (2000).
102. Bullo, M., Tschumi, S., Bucher, B. S., Bianchetti, M. G. & Simonetti, G. D. Pregnancy Outcome Following Exposure to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin Receptor Antagonists: A Systematic Review. *Hypertension* **60**, 444–450 (2012).
103. Serreau, R. *et al.* Developmental toxicity of the angiotensin II type 1 receptor antagonists during human pregnancy: a report of 10 cases. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **112**, 710–712 (2005).
104. Lacoste, M. *et al.* Renal Tubular Dysgenesis, a Not Uncommon Autosomal Recessive Disorder Leading to Oligohydramnios: Role of the Renin-Angiotensin System. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2253–2263 (2006).
105. Gribouval, O. *et al.* Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. *Nat. Genet.* **37**, 964–968 (2005).
106. Plazenet, C., Arrondel, C., Chavant, F. & Gubler, M.-C. Fetal renin-angiotensin-system blockade syndrome: renal lesions. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **29**, 1221–1230 (2014).
107. Spaggiari, E. *et al.* Prognosis and outcome of pregnancies exposed to renin–angiotensin system blockers. *Prenat. Diagn.* **32**, 1071–1076 (2012).
108. Hanssens, M., Keirse, M. J., Vankelecom, F. & Van Assche, F. A. Fetal and neonatal effects of treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **78**, 128–135 (1991).
109. Esther, C. R. *et al.* The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J. Clin. Invest.* **99**, 2375–2385 (1997).
110. 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.* **96**, 2947–2954 (1995).
111. Martinovic, J., Benachi, A., Laurent, N., Daïkha-Dahmane, F. & Gubler, M. C. Fetal toxic effects and angiotensin-II-receptor antagonists. *The Lancet* **358**, 241–242 (2001).

112. Oliverio, M. I. *et al.* Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15496–15501 (1998).
113. 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.* **101**, 755–760 (1998).
114. Humphreys, B. D. *et al.* Fate Tracing Reveals the Pericyte and Not Epithelial Origin of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. *Am. J. Pathol.* **176**, 85–97 (2010).
115. How Does it Work? ALZET® Osmotic Pumps
https://www.alzet.com/products/alzet_pumps/how-does-it-work/.
116. Qi, Z. *et al.* Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**, F590-596 (2004).
117. Wang, F. *et al.* RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagn. JMD* **14**, 22–29 (2012).
118. Schweda, F., Wagner, C., Krämer, B. K., Schnermann, J. & Kurtz, A. Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **284**, F770–F777 (2003).
119. Takemoto, M. *et al.* A New Method for Large Scale Isolation of Kidney Glomeruli from Mice. *Am. J. Pathol.* **161**, 799–805 (2002).
120. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
121. Burson, J. M., Aguilera, G., Gross, K. W. & Sigmund, C. D. Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am. J. Physiol.* **267**, E260-267 (1994).
122. Iwai, N. & Inagami, T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* **298**, 257–260 (1992).
123. Healy, D. P., Ye, M. Q. & Troyanovskaya, M. Localization of angiotensin II type 1 receptor subtype mRNA in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **268**, F220-226 (1995).
124. Gerl, K. *et al.* Activation of Hypoxia Signaling in Stromal Progenitors Impairs Kidney Development. *Am. J. Pathol.* **187**, 1496–1511 (2017).
125. Sequeira Lopez, M. L. S. & Gomez, R. A. Development of the Renal Arterioles. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **22**, 2156–2165 (2011).
126. National Center for Biotechnology Information. Agtr1a angiotensin II receptor, type 1a [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11607>.

127. National Center for Biotechnology Information. Foxd1 forkhead box D1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/15229>.
128. Schrankl, J. *et al.* Apparently normal kidney development in mice with conditional disruption of ANG II-AT1 receptor genes in FoxD1-positive stroma cell precursors. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **316**, F1191–F1200 (2019).
129. Maxwell, P. H. *et al.* Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int.* **44**, 1149–1162 (1993).
130. Campbell, D. J. Endogenous angiotensin II levels and the mechanism of action of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor type 1 antagonists. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23 Suppl 3**, S125-131 (1996).
131. Kurtz, A. & Penner, R. Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 3423–3427 (1989).
132. Neubauer, B. *et al.* Angiotensin II Short-Loop Feedback: Is There a Role of Ang II for the Regulation of the Renin System In Vivo? *Hypertens. Dallas Tex* **1979 71**, 1075–1082 (2018).
133. Ouyang, X. *et al.* Th1 inflammatory response with altered expression of profibrotic and vasoactive mediators in AT1A and AT1B double-knockout mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F902-910 (2005).
134. Machura, K. *et al.* Developmental renin expression in mice with a defective renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **297**, F1371-1380 (2009).
135. Zingg-Schenk, A. *et al.* Inherited renal tubular dysgenesis: the first patients surviving the neonatal period. *Eur. J. Pediatr.* **167**, 311–316 (2008).
136. Tufro-McReddie, A., Romano, L. M., Harris, J. M., Ferder, L. & Gomez, R. A. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am. J. Physiol.* **269**, F110-115 (1995).
137. Friberg, P. *et al.* Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney Int.* **45**, 485–492 (1994).
138. Madsen, K. *et al.* Angiotensin II Promotes Development of the Renal Microcirculation through AT1 Receptors. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **21**, 448–459 (2010).
139. Ichikawi, I. & Harris, R. C. Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone. *Kidney Int.* **40**, 583–596 (1991).

140. Blantz, R. C., Gabbai, F. B., Tucker, B. J., Yamamoto, T. & Wilson, C. B. Role of mesangial cell in glomerular response to volume and angiotensin II. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **264**, F158–F165 (1993).
141. Gerl, K. *et al.* Erythropoietin production by PDGFR- β (+) cells. *Pflugers Arch.* **468**, 1479–1487 (2016).
142. Zhuo, J., Alcorn, D., Allen, A. M. & Mendelsohn, F. A. O. High resolution localization of angiotensin II receptors in rat renal medulla. *Kidney Int.* **42**, 1372–1380 (1992).
143. Kennedy-Lydon, T. M., Crawford, C., Wildman, S. S. P. & Peppiatt-Wildman, C. M. Renal pericytes: regulators of medullary blood flow. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **207**, 212–225 (2013).
144. Gasc, J. M., Monnot, C., Clauser, E. & Corvol, P. Co-expression of type 1 angiotensin II receptor (AT1R) and renin mRNAs in juxtaglomerular cells of the rat kidney. *Endocrinology* **132**, 2723–2725 (1993).
145. Li, H. *et al.* Renal proximal tubule angiotensin AT1A receptors regulate blood pressure. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **301**, R1067–R1077 (2011).
146. Bouby, N. *et al.* Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 1658–1667 (1997).
147. Vrhovac, I. *et al.* Localizations of Na(+)-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. *Pflugers Arch.* **467**, 1881–1898 (2015).
148. Vallon, V. *et al.* SGLT2 Mediates Glucose Reabsorption in the Early Proximal Tubule. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **22**, 104–112 (2011).
149. Matsubara, H. *et al.* Tissue-specific expression of human angiotensin II AT1 and AT2 receptors and cellular localization of subtype mRNAs in adult human renal cortex using in situ hybridization. *Nephron* **80**, 25–34 (1998).
150. Liu, Y., Beyer, A. & Aebersold, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* **165**, 535–550 (2016).
151. Buccitelli, C. & Selbach, M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat. Rev. Genet.* **21**, 630–644 (2020).
152. Hackenthal, E., Aktories, K. & Jakobs, K. H. Pertussis toxin attenuates angiotensin II-induced vasoconstriction and inhibition of renin release. *Mol. Cell. Endocrinol.* **42**, 113–117 (1985).

153. Sparks, M. A. *et al.* Vascular Type 1A Angiotensin II Receptors Control BP by Regulating Renal Blood Flow and Urinary Sodium Excretion. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **26**, 2953–2962 (2015).
154. van Haaster, M. C., McDonough, A. A. & Gurley, S. B. Blood pressure regulation by the angiotensin type 1 receptor in the proximal tubule. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **27**, 1–7 (2018).
155. Davisson, R. L., Oliverio, M. I., Coffman, T. M. & Sigmund, C. D. Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J. Clin. Invest.* **106**, 103–106 (2000).
156. Lochard, N., Silversides, D. W., van Kats, J. P., Mercure, C. & Reudelhuber, T. L. Brain-specific restoration of angiotensin II corrects renal defects seen in angiotensinogen-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **278**, 2184–2189 (2003).
157. Makhanova, N. *et al.* Kidney function in mice lacking aldosterone. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**, F61–69 (2006).
158. Karger, C. *et al.* COX-2-derived PGE2 triggers hyperplastic renin expression and hyperreninemia in aldosterone synthase-deficient mice. *Pflügers Arch.* **470**, 1127–1137 (2018).
159. Peti-Peterdi, J. & Harris, R. C. Macula Densa Sensing and Signaling Mechanisms of Renin Release. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **21**, 1093–1096 (2010).
160. Machura, K. *et al.* Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **302**, F1278–F1285 (2012).
161. Le, T. H. *et al.* A γ GT-AT1A receptor transgene protects renal cortical structure in AT1 receptor-deficient mice. *Physiol. Genomics* **18**, 290–298 (2004).
162. Machura, K. *et al.* Developmental renin expression in mice with a defective renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **297**, F1371–F1380 (2009).
163. Sugaya, T. *et al.* Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J. Biol. Chem.* **270**, 18719–18722 (1995).
164. Nafz, B. *et al.* Flow versus pressure in the control of renin release in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* **273**, F200–205 (1997).
165. Ito, M. *et al.* Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3521–3525 (1995).

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS).....	8
Abbildung 2. Schematische Darstellung ausgewählter Signalwege der AT ₁ -Rezeptoren und ihrer jeweiligen Effekte.....	13
Abbildung 3. Schematische Darstellung und innerer Aufbau einer osmotischen Minipumpe.....	30
Abbildung 4. Übersicht der in-situ Hybridisierung zur Detektion der AT _{1A} mRNA (weiß) auf einem Nierenschnitt einer Wildtypmaus (A) und Ausschnitte aus verschiedenen Nierenzonen in höherer Vergrößerung (B-D).....	40
Abbildung 5. Kohybridisierung von AT _{1A} mRNA (grün) und Marker mRNAs (rot) für spezifische intraglomeruläre Zelltypen auf murinen Nierenschnitten.....	41
Abbildung 6. In-situ Hybridisierung der AT _{1A} (grün), α -SMA (rot) und Renin mRNA (blau) auf murinen Nierenschnitten.....	41
Abbildung 7. In-situ Hybridisierung der AT _{1A} mRNA (grün) mit verschiedenen Markern (rot) für spezifische Abschnitte des Tubulussystems auf murinen Nierenschnitten.....	42
Abbildung 8. In-situ Hybridisierung der AT _{1A} mRNA (grün) und AT _{1B} mRNA (rot) auf einem Schnitt einer murinen Nebenniere.....	43
Abbildung 9. In-situ Hybridisierung der AT _{1A} mRNA (weiß) in verschiedenen Zonen einer Rattenniere.....	44
Abbildung 10. In-situ Hybridisierung der AT _{1A} (grün) und α -SMA mRNA (rot) auf einem kortikalen Ausschnitt (A) und einem Ausschnitt der äußeren Medulla (B) einer Rattenniere.....	45
Abbildung 11. In-situ Hybridisierung der AT _{1A} mRNA (grün, A), AT _{1B} mRNA (rot, B) und die Kohybridisierung beider AT ₁ -Rezeptoren (C) auf einem Nierenschnitt einer Ratte.....	45
Abbildung 12. In-situ Hybridisierung der AT ₁ (grün), PDGFR- β (rot, A) und Renin mRNA (rot, B) auf humanen Nierenschnitten.....	46
Abbildung 13. In-situ Hybridisierung der AT _{1(A)} (grün) und SGLT2 mRNA (rot) auf murinen (A) und humanen (B) Nierenschnitten.....	47
Abbildung 14. Repräsentative Genotypisierungsgele eines Wurfes nach der Kreuzung von FoxD1 ^{Cre/+} x AT _{1A} ^{fl/+} Mäusen mit FoxD1 ^{+/+} x AT _{1A} ^{fl/fl} Mäusen zur Verifizierung des erfolgreichen <i>Crossing over</i> Ereignisses zwischen den FoxD1 und AT _{1A} Genloci.....	49
Abbildung 15. In-situ Hybridisierung von AT _{1A} (grün) und PDGFR- β mRNA (rot) auf murinen Nierenschnitten von einem Wildtyptier (A) und einem FoxD1-AT ₁ ko Tier (B).....	50
Abbildung 16. AT _{1A} mRNA Abundanz in ganzen Nieren (links) und in isolierten Glomeruli (rechts) von FoxD1-AT ₁ ko Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren.....	50
Abbildung 17. Übersichten von Nierenschnitten einer Maus mit globaler AT ₁ -Deletion (A), einer Wildtypmaus (B), und einer FoxD1-AT ₁ ko Maus (C).....	51
Abbildung 18. Bestimmung der Wanddicke von intrarenalen Arteriolen in Kontrolltieren und FoxD1-AT ₁ ko Tieren.....	52
Abbildung 19. F4/80 mRNA Abundanz und Plasma-EPO Konzentration von FoxD1-AT ₁ ko Tieren verglichen mit Kontrolltieren.....	53
Abbildung 20. Körpergewichte und das Verhältnis von Nieren- zu Körpergewicht von FoxD1-AT ₁ ko Mäusen verglichen mit Kontrolltieren.....	54
Abbildung 21. Systolischer Blutdruck, glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und Urinparameter von Kontrolltieren und FoxD1-AT ₁ ko Tieren.....	55

Abbildung 22. Effekte der steigenden Konzentrationen von ANG II auf den Perfusionsfluss und die Reninaktivität im Perfusat an isoliert perfundierten Nieren von Kontrolltieren (obere Abbildung) und von FoxD1-AT ₁ ko Tieren (untere Abbildung).	57
Abbildung 23. Verteilung der Renin-produzierenden Zellen, Renin mRNA Abundanz und Plasmareninaktivität in FoxD1-AT ₁ ko Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren.....	58
Abbildung 24. In-situ Hybridisierung von AT _{1A} (grün) und Renin mRNA (rot) auf murinen Nierenschnitten eines Wildtypieres (A) und eines Ren-AT _{1A} ^{fl/fl} Tieres (B).	60
Abbildung 25. Effekte von steigenden ANG II-Konzentrationen auf den Perfusionsfluss und die Reninaktivität im Perfusat an isoliert perfundierten Nieren von Kontrolltieren (oben) und von Ren-AT ₁ ko Tieren (unten).	61
Abbildung 26. Immunfluoreszenzfärbung von Renin (grün) und α -SMA (rot) auf murinen Nierenschnitten von einem Wildtypier (A), einem AT _{1B} -KO Tier (B), einem Tier mit konditionaler Reninzell-spezifischer Deletion der AT _{1A} -Rezeptoren (Ren-AT _{1A} ^{fl/fl}) (C) und einem Tier mit konditionaler Reninzell-spezifischer Deletion der AT _{1A} -Rezeptoren mit systemischer AT _{1B} -Defizienz (Ren-AT1ko; D).....	62
Abbildung 27. Renin mRNA Abundanz, Plasmareninaktivität und systolischer Blutdruck der verschiedenen AT ₁ -Rezeptor Knockouttiere im Vergleich zu Wildtypieren.....	63
Abbildung 28. Renin mRNA Expression (oben) und Plasmareninaktivität (unten) der untersuchten Genotypen nach der Behandlung mit Furosemid, Natriumsalzdiät + Enalapril und ANG II-Infusion.	65
Abbildung 29. Systolischer Blutdruck vor und während ANG II-Infusion der AT ₁ -Knockouttiere verglichen mit den Wildtypieren.....	66
Abbildung 30. Schematische Zusammenfassung der Lokalisationsstudie mit den entsprechenden AT _{1A} -Rezeptor exprimierenden Kompartimenten (farbige Strukturen) in den Nieren von Mäusen und Ratten.	68

7.2. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -Glattmuskelaktin
aa	afferente Arteriole
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
AQP2	Aquaporin 2
AT ₁	Angiotensin II Typ 1
AT ₂	Angiotensin II Typ 2
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i> (PECAM-1)
Cox-2	Cyclooxygenase 2
Cy	Cyanin
DAG	1,2-Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ea	efferente Arteriole
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENaC α	alpha-Untereinheit des Epithelialen Natriumkanals
ERK	extrazelluläres Signal-regulierte Kinase, (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen))

EPO	Erythropoietin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxD1	<i>forkhead box D1</i>
G	Glomerulus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
JAK	Januskinase
JG	juxtaglomerulär
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated</i> Proteinkinasen
MEK	<i>mitogen-activated</i> Proteinkinase-Kinase (MAPKK)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBF	<i>neutral buffered formalin</i>
NKCC2	Na-K-2Cl-Cotransporter
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR-β	<i>platelet-derived growth factor receptor β</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLA2	Phospholipase A ₂
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Raf	<i>rat fibrosarcoma</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPL32	ribosomales Protein L32
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RTD	renale tubuläre Dysgenese
s.	siehe
SGLT2	<i>Sodium dependent glucose transporter 2</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiozyanat
WT	Wildtyp

Die Kenntnis chemischer Elementsymbole und Stoffverbindungen sowie von SI-Maßeinheiten und gängigen, in den Naturwissenschaften und in der Medizin gebrauchten Begriffsabkürzungen wurden vorausgesetzt.

7.3 Kongressbeiträge

5th International Symposium of the Collaborative Research Centre Sonderforschungsbereich 699, 29.06.-30.06.2017, Regensburg, Deutschland - Poster

“The negative short feedback loop of renin control is dispensable for the in vivo regulation of renin and blood pressure”

9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 14.09. - 17.09.2017, Mannheim, Deutschland - Poster

„Regulation von Reninsynthese und -sekretion im gewebespezifischen AT_{1A} Knockout-Modell“

Europhysiology 2018, 14.09. - 16.09.2018, London, Vereinigtes Königreich - Poster

„AT₁ receptors in renal FoxD1⁺ stromal cells are not required for normal kidney development”

10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 27.09.2018 – 30.09.2018, Berlin, Deutschland - Poster

„AT₁ Rezeptoren in renalen FoxD1⁺ Stromazellen sind nicht essentiell für eine normale Nierenentwicklung“

98th Meeting of the German Physiological Society, 30.09.2019 – 02.10.2019, Ulm, Deutschland - Poster

“Intrarenal distribution of AT₁ receptors”

7.4 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Neubauer B, Schrankl J, Steppan D, Neubauer K, Sequeira-Lopez ML, Pan L, Gomez RA, Coffman TM, Gross KW, Kurtz A, Wagner C.

Angiotensin II Short-Loop Feedback: Is There a Role of Ang II for the Regulation of the Renin System In Vivo?

Hypertension. 2018; 71(6):1075-1082.

Schrankl J, Neubauer B, Fuchs M, Gerl K, Wagner C, Kurtz A.

Apparently normal kidney development in mice with conditional disruption of ANG II-AT1 receptor genes in FoxD1-positive stroma cell precursors.

American Journal of Physiology-Renal Physiology. 2019 316:6, F1191-F1200

Schrankl J, Fuchs M, Broeker K, Daniel C, Kurtz A, Wagner C.

Localization of AT₁ receptor gene expression in rodent and human kidneys.

American Journal of Physiology-Renal Physiology. 2020. (minor revision)

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Anleitung zur erfolgreichen Durchführung der vorliegenden Arbeit. Vielen Dank dafür, dass ich jederzeit zu dir kommen konnte, du mich bei sämtlichen Fragen und Problemen immer unterstützt hast und du aber auch Vertrauen in meine selbstständige Arbeit hattest.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die zahlreichen Ratschläge, Hilfestellungen und die wissenschaftliche Betreuung bedanken, die wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön geht an meine tollen Kolleginnen. Danke an Susanne Fink, Sandra Kohl, Marcela Loza und Ramona Steppan für eure Unterstützung im Labor und eure stets gute Laune, mit der ihr das Institut bereichert und die Arbeit erleichtert habt.

Liebe Katha, liebe Micha, ich möchte mich bei euch für die vielen schönen Stunden innerhalb und außerhalb des Labors bedanken. Vielen Dank, dass ihr mich bei allem so tatkräftig unterstützt und immer ein offenes Ohr für sämtliche Fragen und Probleme habt. Ohne euch wäre die Arbeit nicht mal halb so schön gewesen!

Besonders danken möchte ich auch Robert Götz für die Durchführung der isoliert perfundierten Niere.

Mein letzter Dank geht an meine Familie. Vielen Dank für eure Unterstützung in allen Lebensbereichen! Ich weiß es sehr zu schätzen, dass ihr immer für mich da seid und ich mich stets auf euch verlassen kann.