

# **Einfluss des Cyclooxygenase-2-Inhibitors SC-236 auf ein stimuliertes wie unstimuliertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.**

## **DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MEDIZIN (DR. MED.)

DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III

- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



Vorgelegt von  
Fabian Herrmann aus Schwäbisch Hall

Im Jahr 2020

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von September 2012 bis Juni 2020 unter der Anleitung von Herr Prof. Dr. Armin Kurtz und unter der Betreuung von Dr. Katharina Machura am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Dekan: Prof. Dr. Ralph Witzgall

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Armin Kurtz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Fuchshofer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2021

## Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	6
1.1	Anatomie der Niere .....	6
1.2	Die Renin bildende Zelle .....	10
1.3	Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem der Niere .....	12
1.4	Reninsynthese und Reninsekretion .....	15
1.5	Regulation der Reninsynthese und Reninsekretion .....	16
1.5.1	Faktoren der physiologischen Regulation .....	16
1.5.2	Weitere humorale und lokal sezernierte Faktoren .....	20
1.5.3	Zelluläre Ebene der Regulation .....	21
1.6	Die Cyclooxygenase .....	24
1.6.1	Prostaglandin E <sub>2</sub> und I <sub>2</sub> .....	25
1.6.2	Cyclooxygenase 2 .....	25
1.6.3	Stickstoffmonoxid (NO) .....	26
1.7	Zielsetzung .....	28
2.	Material und Methoden	30
2.1	Material .....	30
2.1.1	Geräte .....	30
2.1.2	Verbrauchsmaterial .....	31
2.1.3	Chemikalien, Enzyme, Kits .....	32
2.1.4	Primer .....	34
2.1.5	Antikörper .....	34
2.1.6	Puffer und Lösungen .....	34
2.1.7	Software und Internetdienste .....	35
2.2	Methoden .....	36
2.2.1	Versuchstiere .....	36

2.2.2	Histologische Methoden .....	36
2.2.3	Dreidimensionale Rekonstruktion .....	40
2.2.4	Molekularbiologische Methoden .....	44
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Reninexpressionsmuster der Wildtyp-Maus .....	50
3.2.	Reninexpressionsmuster der adulten Wild-Typ Maus unter Behandlung mit dem COX-2 Inhibitor SC-236 .....	55
3.3.	Reninexpressionsmuster der adulten Wildtyp-Maus nach Stimulation des RAAS mittels Nidrigsalzdiät und Gabe von Enalapril.....	60
3.3.1.	Reninexpressionsmuster der weiblichen adulten Wildtyp-Maus nach Stimulaion des RAAS mittels Nidrigsalzdiät und Gabe von Enalapril.....	60
3.3.2.	Reninexpressionsmuster der männlichen adulten Wildtyp Maus unter Nidrigsalzdiät und Gabe von Enalapril.....	67
3.4.	Reninexpressionsmuster der adulten Wildtyp Maus unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe .....	73
3.4.1.	Reninexpressionsmuster der weiblichen adulten Wildtyp- Maus unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe.....	73
3.4.2.	Reninexpressionsmuster der männlichen adulten Wildtyp Maus unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe.....	80
4.	Diskussion	86
4.1	Analyse der 3D-Rekonstruktionen und der histologischen Aufnahmen in Zusammenschau mit den Ergebnissen der RNA- und Plasmeninkonzentrationen.....	87
4.1.1	Die adulte Wildtyp-Maus mit und ohne Behandlung mit dem selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitor SC-236 .....	87
4.1.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede der Reninexpression nach Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.....	89
4.1.3	Geschlechtsspezifische Unterschiede der Reninexpression unter Cyclooxygenase- 2-Blockade nach Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.....	93
5.	Zusammenfassung	99

6. Literatur und Abbildungsverzeichnis 101

7. Anhang 123

## 1. Einleitung

### 1.1 Anatomie der Niere

Die Niere übernimmt vielfältige Funktionen im Organismus. Dazu gehört die Exkretion exogen zugeführter sowie endogen gebildeter harnpflichtiger Substanzen. Ferner sorgt sie für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes und sie verfügt über endokrine Funktionen. Anatomisch handelt es sich bei der Mäuseniere um eine unipapilläre Niere, während die des Menschen meist aus 7 bis 9 Markpyramiden besteht (Junqueira et al., 2005; Weisert, 1990). Strukturell stimmen die Nieren der Nagetiere jedoch grundsätzlich mit der Niere von anderen Säugetieren sowie der des Menschen überein (Lüllmann-Rauch, 2006; Weisert, 1990).

Die Niere ist ein paariges Organ, welches retroperitoneal im dorsalen Abdomen liegt. Dort wird ihre Lage durch eine sie umgebende Fettkapsel (Capsula adiposa) und die Fascia renalis gewährleistet. Das Nierenparenchym wird von einer bindegewebigen Organkapsel (Capsula fibrosa) begrenzt und gliedert sich in Rinde (Cortex renalis) und Mark (Medulla renalis). Die Rinde lagert sich der Capsula fibrosa an und setzt sich als Columnae renales fort. Sie enthält sämtliche Glomeruli, die Bowmansche-Kapsel sowie die Pars convoluta des proximalen und distalen Tubulussystems. Bei den Glomeruli handelt es sich dabei um Gefäßknäuel durch welche der Primärharn in die Bowmansche-Kapsel gepresst und durch das Tubulussystem richtung Sammelrohr und letztendlich ins Nierenbecken fortgeleitet wird. Im Tubulussystem und Sammelrohr entsteht dabei durch Resorptions- und Sekretionsvorgänge der Endharn. Von der Rinde wird das Mark umfasst, welches die medullären Anteile des Sammelrohr- und Tubulussystems enthält. Es gliedert sich in eine Innen- und eine Außenzone, wobei innerhalb der Außenzone weiter zwischen einem Außen- und einem Innenstreifen unterschieden wird. Der Übertritt vom Außen- zum Innenstreifen wird durch den Übergang der proximalen Tubuli in die Intermediärtubuli markiert, während die Grenze zwischen Innenstreifen und Innenzone durch den Übergang der Intermediärtubuli auf die distalen Tubuli hervorgerufen wird (Abb 1.1). Das Mark geht in den Nierenkelch (Kalzies) über, welcher ins Nierenbecken (Pelvis renalis) mündet. Das Nierenbecken ist Teil des Sinus renalis, welcher außerdem Gefäße, Nerven und Fettgewebe enthält. Am Hilum, einer zentralen Einziehung der Niere, verlässt der Ureter gemeinsam mit der Vena renalis und Lymphgefäßen den Sinus renalis, während Arteria renalis und Nerven in ihn einmünden (Lüllmann-Rauch, 2006).

## Einleitung

Das Nephron stellt die strukturelle und funktionelle Grundeinheit der Niere dar, die jeweils aus einem Nierenkörperchen (Malpighi-Körperchen), und den sich anschließenden unverzweigten Nieren-Kanälchen (Tubulussystem) besteht (Lüllmann-Rauch, 2006; Smith, 1951). Das Malpighi-Körperchen besteht dabei aus dem Glomerulus (kapilläres Gefäßknäuel) und der umgebenden Kapsel (Bowman-Kapsel).

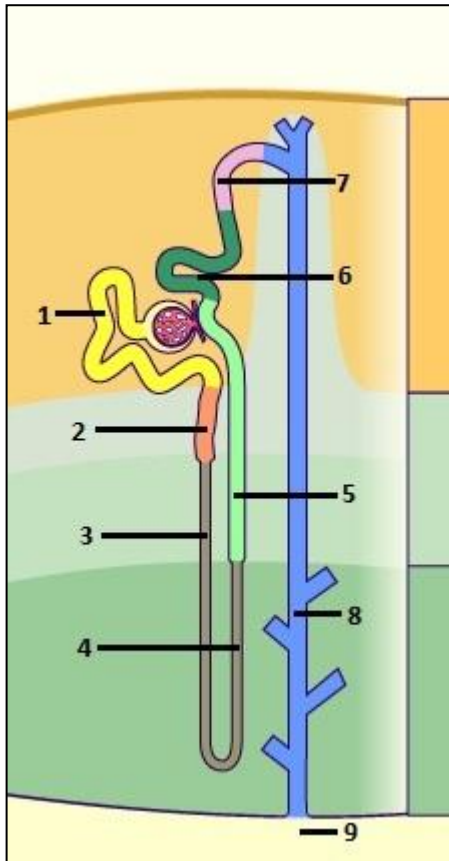


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Lage der Tubulussegmente:

1. Proximaler Tubulus, Pars convoluta
2. Proximaler Tubulus, Pars recta, Absteigender Ast der Henle-Schleife
3. Intermediärtubulus, Absteigender Ast der Henle-Schleife
4. Intermediärtubulus, Aufsteigender Ast der Henle-Schleife
5. Distaler Tubulus, Pars recta, Aufsteigender Ast der Henle-Schleife
6. Distaler Tubulus, Pars convoluta
7. Verbindungstubulus
8. Sammelrohr
9. Ductus papillaris

(überarbeitete Abbildung nach Schwaller, Département de Médecine, Division d'Histologie de l'Université de Fribourg, 2005)

Das Anfangsstück eines jeden Nephrons bildet das Glomerulus, ein Kapillarknäuel, das von einer zuführenden Arteriole (Vas afferens) gespeist wird und eine ableitende Arteriole (Vas efferens) abgibt. Die Media des Vas afferens wird am terminalen Ende von den Renin bildenden Zellen (juxtaglomeruläre Zellen) gebildet. Die Ein- bzw. Austrittspunkte beider Arteriolen liegen in enger Nachbarschaft und bilden den Gefäßpol des Nephrons. Gestützt wird das Glomerulus von Mesangiumzellen, an denen die Kapillarschlingen befestigt sind. Benötigt wird diese besondere Stabilisierung da der transmurale Druckgradient in den glomerulären Kapillaren höher ist als für Kapillaren üblich. Die Mesangiumzellen setzen sich in den Winkel zwischen Vas afferens und Vas efferens am Gefäßpol fort und sind Bestandteil des Juxtaglomerulären Apparats, zu welchem auch die Renin bildenden Zellen und die Macula densa gerechnet werden (Lüllmann-Rauch, 2006).

## Einleitung

Umgeben wird das Glomerulus von der Bowmanschen-Kapsel. Sie besitzt ein enges Lumen, über welches der Kapselraum in das Tubulussystem übergeht und damit den Harnpol markiert (Abb. 1.2). Die Bowmansche-Kapsel besteht aus einem viszeralen und einem parietalen Blatt. Das viszerale Blatt enthält spezialisierte Epithelzellen (Podozyten) und Tubulusepithel-ähnlichen Zellen und bildet gemeinsam mit dem Kapillarendothel und dessen Basalmembran den Filter zwischen Blut- und Harnkompartiment. Die Durchtrittsstellen des Filters bilden 50-100 nm breite Poren des Kapillarendothels sowie 20-30 nm breite Schlitze, die die Fortsätze der Podozyten unverschlossen lassen (Yamada, 1955). Durch diesen Filter wird das Blutplasma, durch den Blutdruck innerhalb der Arteriole, gepresst und bildet den Primärharn (Wehner et al., 2007).

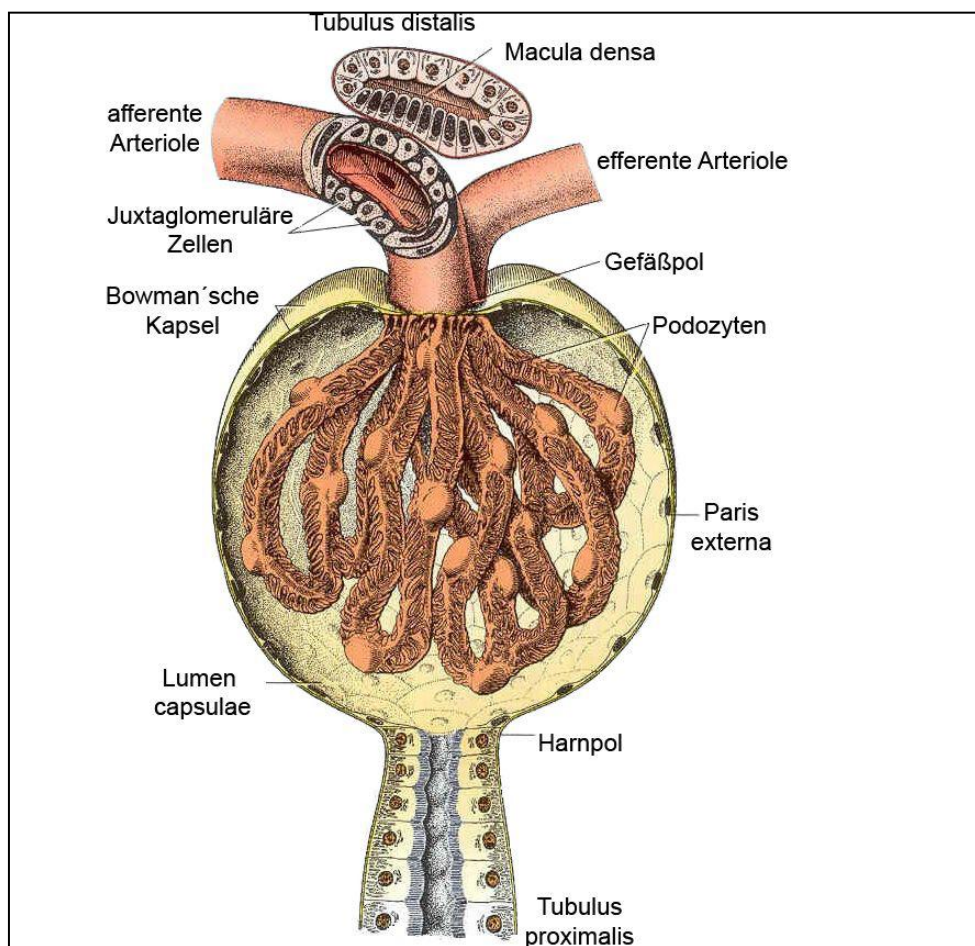


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Glomerulus (Abbildung nach Junqueira, 2002)

Dem Harnpol des Glomerulus entspringt das Tubulussystem. Den Anfang bildet der proximale Tubulus, welcher sich in die vorgeschalteten Pars convoluta und die Pars recta untergliedert (Abb. 1.1). Dieser geht in den Intermediärtubulus über, welcher in den distalen Tubulus mündet. Der



## Einleitung

distale Tubulus gliedert sich wiederum in die Pars recta und die nachgeschalteten Pars convoluta. Pars recta des proximalen Tubulus, der Intermediärtubulus und die Pars recta des distalen Tubulus bilden die Henle-Schleife (Abb. 1.1; Lüllmann-Rauch, 2006). Innerhalb des Tubulussystems finden die wesentlichen Resorptions und Exkretionsvorgänge der Niere statt, wodurch der Sekundärharn gebildet wird (Klinke et al., 2005). Dem Ende des distalen Tubulus entspringt der Verbindungstubulus, welcher das Tubulussystem in Rindenhöhe mit dem Sammelrohr verbindet. Die Sammelrohre verlaufen innerhalb der Markstrahlen und besitzen die Fähigkeit den Sekundärharn weiter zu konzentrieren. Auf Höhe des Nierenmarks fusionieren bis zu acht Sammelrohre zu einem Ductus papillaris, welcher ins Nierenbecken mündet (Lüllmann-Rauch, 2006), das der Sekundärharn über den Ureter verlässt.

Die Gefäßarchitektur der Niere, eines der am besten durchbluteten Organe, ist entscheidend für die Funktion der Niere. Das Blut durchläuft dabei zwei Kapillarbette nacheinander. Das erste Kapillarbett besteht aus den glomerulären Kapillarschlingen, in deren Verlauf der Primärharn abgepresst wird. Das zweite Kapillarbett besteht aus dem peritubulären Kapillarnetz, welches der Harnkonzentrierung und dem Abtransport resorbierter Stoffe dient (Abb. 1.3; Lüllmann-Rauch, 2006; Leonhardt et al., 1987).

Die Blutversorgung der Niere erfolgt über die A. renalis, einem direkten Abgang der Aorta abdominalis. Innerhalb des Sinus renalis gibt sie zwei Aa. interlobares ab, die innerhalb der Columnae renales verlaufen. Diese setzen sich auf Höhe der Mark-Rinden-Grenze in die Aa. arcuatae fort welchen wiederum arcuate Seitenäste entspringen. Aus den Aa. arcuatae und den arcuaten Seitenästen gehen die Aa. interlobulares ab, welche Ursprung der afferenten Arteriolen sind (Lüllmann-Rauch, 2006), wobei einige afferente Arteriolen auch direkt aus den arcuaten Haupt- oder Seitenästen entspringen (Sauter et al, 2008). An den terminalen Enden der afferenten Arteriolen finden sich in juxtaglomerulärer Position die Renin bildenden Zellen (Sauter et al, 2008; Barajas, 1979). Am Gefäßpol des jeweiligen Glomerulus geht die afferente Arteriole ins glomeruläre Kapillarknäuel über das wiederum am Gefäßpol die efferente Arteriole abgibt. Diese ergießt sich in die peritubulären Kapillaren (Abb. 1.3). Aus den peritubulären Kapillaren gelangt das venöse Blut direkt oder über die Vasa recta in die Vv. arcuatae. Diese geben es in die Vv. interlobares ab von wo es über die V. renalis in die V. cava mündet (Klinke et al., 2005).

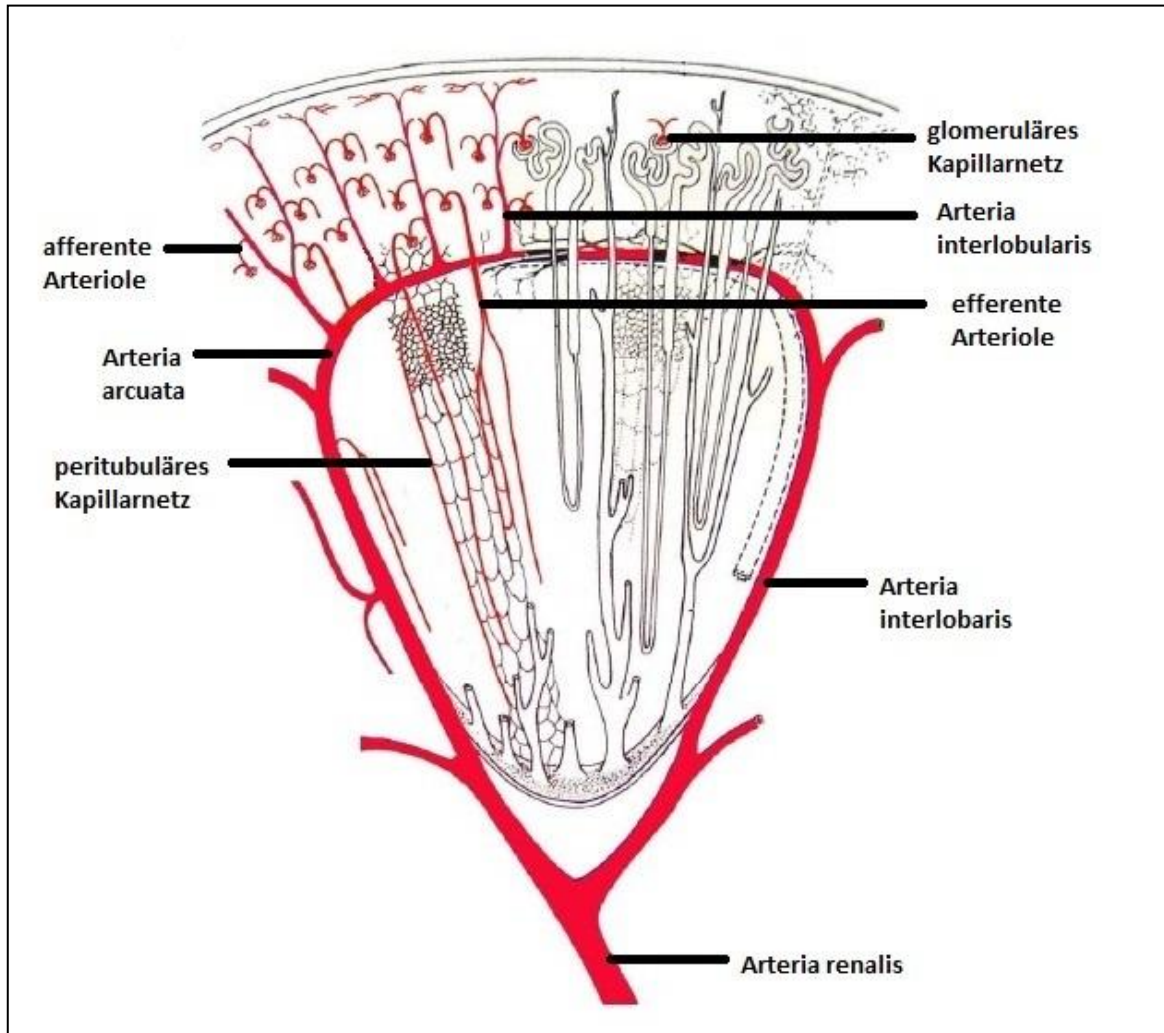


Abbildung 1.3: Gefäßarchitektur der Niere (überarbeitete Abbildung nach Dyce et al., 1999)

## 1.2 Die Renin bildende Zelle

Renin konnte im menschlichen Gehirn, Chorion sowie der Hypophyse, Nebenniere und Hoden von Ratten als auch in der Unterkieferspeicheldrüse von Mäusen nachgewiesen werden (Tanaka et al., 1980; Slater et al., 1980; Naruse et al., 1981; Parmentier et al., 1983). Es ist jedoch allgemein anerkannt, dass das zirkulierende aktive Renin der Niere entstammt (Castrop et al., 2010). Die Renin bildende Zelle ist der vorwiegende Ort der Synthese, Speicherung und Freisetzung des Renins. Im adulten Organismus befinden sich diese epithelartigen Zellen im terminalen Abschnitt der afferenten Arteriolen in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus und bilden dort die Media des Gefäßes (Abb. 3.4; Hackenthal et al. 1990). Auf Grund ihrer Lage in juxtaglomerulärer Position, werden sie auch als

## Einleitung

juxtaglomeruläre Zellen bezeichnet (Hackenthal et al. 1990). Es handelt sich um modifizierte glatte Muskelzellen. Es wurde postuliert, dass diese kein Glattmuskelaktin ( $\alpha$ -SMA) exprimieren, im Ergebnisteil dieser Arbeit wird jedoch gezeigt, dass insbesondere im Übergangsbereich der Gefäßmuskelzellen zu den juxtaglomerulären Zellen, Zellen existieren, die sowohl Glattmuskelaktin als auch Renin exprimieren (Liu and Ballermann, 1998). Die Renin bildenden Zellen besitzen einen locker strukturierten, ovalen Zellkern und sind dicht bepackt mit Renin-Speichergranula, die ihnen eine kubische epitheloide Form verleihen (Barajas, 1979). Zusammen mit den Zellen der Macula Densa und den extraglomerulären Mesangiumzellen bilden die juxtaglomerulären Zellen den juxtaglomerulären Apparat (Abb. 1.4; Taugner et al., 1984).

Während der Nierenentwicklung findet man die Renin bildenden Zellen entlang des gesamten präglomerulären Gefäßbaums. Zum ersten Mal treten Renin bildende Zellen am 15. Embryonaltag auf (Kon, 1999; Sauter et al., 2008). Sie finden sich zuerst innerhalb der arcuaten Hauptstämme und zeigen ein diskontinuierliches Verteilungsmuster. Mit fortschreitender Nierenreifeung weitet sich die Lokalisation Renin bildender Zellen sowohl nach proximal wie auch nach distal hin aus. Nach der Geburt verringert sich die Zahl Renin bildender Zellen bis sie am zehnten postpartalen Tag fast nur noch in juxtaglomerulärer Position zu finden sind (Sauter et al., 2008). Die Anzahl und Lokalisation Renin bildender Zellen ist jedoch kein stabiler Zustand. So können äußere Faktoren eine Zu- oder Abnahme Renin bildender Zellen bewirken. Eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), zum Beispiel durch Salz- oder Volumenmangel, führt zur Transformation von Glattmuskelzellen in Renin bildende Zellen. Diese finden sich diskontinuierlich entlang der afferenten Arteriolen und Interlobulararterien. Dieses Phänomen wird als retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen bezeichnet (Casellas et al., 1994; Reddi et al., 1998; Fuchs et al., 2002). Eine gegenläufige Reaktion lässt sich durch Suppression des RAAS, zum Beispiel durch Salz- oder Volumenüberschuss, beobachten. Es erfolgt eine Umwandlung von Renin bildenden Zellen in Glattmuskelzellen (Kurtz, 1989). Der zelluläre Mechanismus welcher Grundlage der Rekrutierung Renin bildender Zellen ist, ist noch nicht bekannt. Es wird von einer metaplastischen Transformation der Glattmuskelzellen ausgegangen (Cantin 1977). Jedoch scheinen nicht alle Glattmuskelzellen zu einer solchen Trans-formation befähigt zu sein, möglich wäre eine genetische Prädisposition zur Transformation (Castrop et al., 2010; Sequeira et al., 2004).

### 1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem der Niere

Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS) der Niere spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Blutdrucks sowie der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts. Die Aktivierung dieses Systems durch nervale Stimulation, Abfall des Gefäßdrucks, gemessen an Barorezeptoren des Vas afferens oder Abfall der  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Konzentration am distalen Tubulus (Macula densa), hat einen Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Reabsorption mit konsekutivem Anstieg des Blutdrucks zur Folge (Hackenthal et al., 1990). Schlüsselenzym zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems ist die Protease Renin, welche von den juxtaglomerulären Zellen gebildet wird (Kurtz and Wagner, 1999; Barajas, 1979; Taugner et al., 1984a).

Die Aspartylprotease Renin wird von den juxtaglomerulären Zellen direkt in das Lumen der afferenten Arteriole sezerniert (Horky et al., 1971, 1973). Innerhalb des Kreislaufsystems spaltet sie, das überwiegend von der Leber synthetisierte und sezernierte,  $\alpha$ -Glycoprotein Angiotensinogen zu dem Decapeptid Angiotensin I, das einzig bekannte Substrat des Renins (Abb. 1.4; Hall, 2003; Hackenthal et al., 1990). Die Spaltung des Angiotensinogens abhängig von der Reninkonzentration ist der die Geschwindigkeit bestimmende Schritt der Kaskade. Angiotensin I (ANG I), welches kein physiologischer Effektor ist, wird hauptsächlich vom Angiotensin Converting Enzym (ACE) zum Octapeptid Angiotensin II (ANG II) aktiviert (Unger et al., 1996; Ferrão et al., 2014). Bei dem Angiotensin Converting Enzym handelt es sich dabei um eine Membran gebundene Metalloprotease, die vorwiegend an der Oberfläche der Endothelzellen der Lungenkapillaren exprimiert wird. Als Haupteffektor des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems wird das Angiotensin II gesehen (Levens et al., 1981; Paul et al., 2006).

Die klassische Wirkung des Angiotensin II erfolgt über die Angiotensinrezeptoren (AT-Rezeptoren) 1 ( $\text{AT}_1$ ) und 2 ( $\text{AT}_2$ ). Der  $\text{AT}_1$ -Rezeptor untergliedert sich bei Nagern weiter in den  $\text{AT}_{1a}$ -Rezeptor und den  $\text{AT}_{1b}$ -Rezeptor (Burson et al., 1994). Die Wirkung am  $\text{AT}_1$ -Rezeptor vermittelt Vasokonstriktion, Durst sowie die Freisetzung von Vasopressin aus dem Hypothalamus und Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Vasopressin bewirkt eine Vasokonstriktion und Wasserretention über den Einbau von Aquaporinen ins Sammelrohr, während Aldosteron die Resorption von  $\text{Na}^+$  innerhalb des Verbindungstubulus und Sammelrohrs stimuliert (Klinke et al., 2005). Ferner wirkt der  $\text{AT}_1$ -Rezeptor als Mediator des zellulären Wachstums und der Zellmigration (Fyhrquist, 2008). Des Weiteren wird vermutet, dass die Stimulation des  $\text{AT}_1$ -Rezeptors eine vermehrte Aufnahme von ANG II in die Niere bewirkt (Zhuo et al., 2013). Studien an Mäusen, bei denen ein Knockout des renalen  $\text{AT}_1$ -Rezeptors

vorliegt, haben dessen Notwendigkeit bei der Entstehung des Bluthochdrucks gezeigt (Crowley SD et al., 2006). Der  $AT_2$ -Rezeptor vermittelt Vasodilatation, die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und inhibiert Wachstumsprozesse (Fyhrquist, 2008). Gehemmt wird der Ablauf des RAAS durch Hemmung der Reninsekretion über einen negativen Feedback-Mechanismus ausgelöst durch den arteriellen Blutdruck, die extrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration sowie die ANG II Konzentration (Hackenthal et al., 1990; Schweda and Kurtz, 2011). Es wird jedoch auch vermutet, dass eine Vorwärtsschleife bestehen könnte, da nach einer Langzeitbehandlung von Mäusen mit ANG II, Prorenin, Renin, Angiotensinogen und ACE signifikant erhöht waren (Prieto-Carrasquero et al., 2005; Prieto et al., 2011; Liu et al., 2011; Kobori et al., 2007; Kobori et al., 2001; Harrison-Bernard et al., 2002). Bei Prorenin handelt es sich hierbei um die inaktive Vorstufe des Renins. Ursprung des Prorenins ist die Niere, wobei die Plasmaproreninspiegel um das zehnfache über dem Plasmareninspiegel liegen können und sich nicht notwendig parallel zu diesen verändern (Danser et al., 1998; Hsueh et al., 1991; Toffelmire et al., 1989).

Neben der klassischen Achse des RAAS bestehend aus ACE, ANG II und AT-Rezeptoren wurden weitere Systeme entdeckt. Diese beinhalten den Proreninrezeptor (PRR), ACE II, den Mas-Rezeptor, und es scheint, dass ANG II als intrazelluläres Peptid Wirkung besitzt (Zhuo et al., 2013). Ferner wird davon ausgegangen, dass alle Komponenten, des Renin-Angiotensin-Systems, die für die Bildung von ANG II nötig sind, innerhalb der Niere vorliegen (Carey et al., 2003; Chappell, 2012; Kobori et al., 2007; Navar et al., 2011; Zhuo et al., 2011). Es konnte mittels eines Fusionsproteins (ECFP/ANG II) intrazelluläres ANG II in den Nieren transgener Mäuse, welche in allen Geweben vermehrt ANG II bildeten, nachgewiesen werden. Obwohl der Plasma-ANG II Spiegel unverändert war, stieg der Blutdruck. Das intrazelluläres ANG II den Blutdruck beeinflusst, erscheint somit als erwiesen (Redding et al., 2010).

Es werden drei neue Achsen des RAAS beschrieben, die ACE2/ANG (1-7)/Mas-Rezeptor Achse, die Prorenin/PPR/MAP Kinase (Mitogen-activated protein kinases) Achse und die ANG IV/AT4/IRAP (Insulin-regulated aminopeptid) Achse (Abb. 1.4; Chappell, 2007; Nguyen 2011; Rector et al., 1966; Santos et al., 2013; Ferrario et al., 2010). Bezüglich der ACE2/ANG (1-7)/Mas-Rezeptor Achse wird berichtet, dass ANG (1-7) vasodilatierende und den Blutdruck senkende Eigenschaften wie Natriuresis und Diuresis besitzt. Es kann somit als Gegenspieler des ANG II gesehen werden (Chappell, 2007; Santos et al., 2013; Ferrario et al., 2010; Gwathmey et al., 2012). Der Signalweg hingegen ist noch nicht vollständig verstanden. Sicher scheint jedoch, dass ANG (1-7) innerhalb der Niere durch ACE II von ANG II abgespalten wird (Ferrario et al., 2010). Die Prorenin/PPR/MAP Kinase Achse fußt auf Prorenin, welches als biologisch inaktiver Vorläufer des Renins angesehen wurde. Heute scheint es

sicher, dass es konstitutiv von der Niere sezerniert wird und gemeinsam mit Renin als Ligand des Proreninrezeptors fungiert. Wobei Prorenin eine höhere Affinität zu Proreninrezeptor zu haben scheint (Nguyen G et al., 2002). Die genaue Wirkung des Prorenins ist noch unbekannt. Wirkung auf die physiologische Regulation des Blutdrucks und der Funktion der Niere erscheint aber wahrscheinlich. Zum Beispiel ist bekannt, dass Mäuse im Vergleich zu Ratten und Menschen vermehrt Prorenin und Proreninrezeptoren bilden, jedoch keinen Bluthochdruck oder renale Erkrankungen entwickeln (Zhuo et al., 2013). Andererseits konnte Kaneshiro et al. zeigen, dass transgene Ratten mit einer Überexpression von Prorenin Nierenerkrankungen entwickelten (Kaneshiro et al., 2007). Des Weiteren ist ein Überleben von Mäusen mit genetisch ausgeschaltetem PRR nicht möglich, was die Untersuchung des PRR erschwert (Cruciat CM et al., 2010).

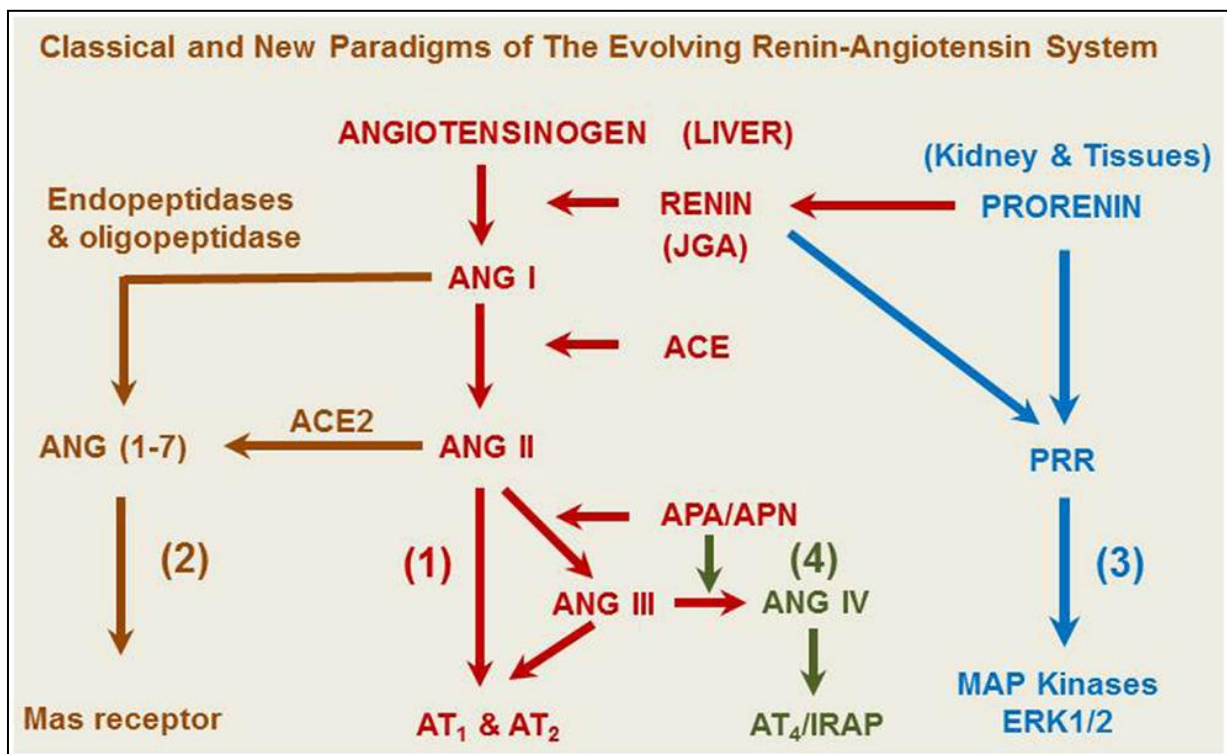


Abbildung 1.4: Achsen des Renin-Angiotensin-Systems (nach Zhuo et al, 2013)

Die ANG IV/AT4/IRAP-Achse basiert auf ANG III welches ein Derivat des ANG II ist. Es wird mittels der Aminopeptidase A vom ANG II abgeleitet (Zhuo et al., 2013, Abb. 1.4). ANG III wirkt abhängig von der Dosis, Natriuretisch oder Antinatriuretrisch. Vermittelt wird die Wirkung über den AT<sub>1</sub>- oder AT<sub>2</sub>-Rezeptor (Carey et al., 2003; Chappell 2013; Harris et al., 1987; Yugandhar et al., 2013). Ein AT<sub>3</sub>-

Rezeptor ist nicht bekannt. In der Niere kann ANG III mittels der Aminopeptidase zu ANG IV oder ANG (2-8) hydrolysiert werden (Carey et al., 2003; Chappell 2013). ANG IV bindet am AT<sub>1</sub>- und AT<sub>4</sub>-Rezeptor (Li et al., 2006). Es gilt als gesichert, dass ANG IV Wirkung auf den Blutdruck und die Funktion der Niere hat, die genaue Wirkungsweise ist jedoch noch unklar (Zhuo et al., 2013, Abb. 1.4).

Es lässt sich festhalten, dass neben der klassischen Achse des Renin-Angiotensin-Systems, dessen Funktion bekannt ist, weitere Systeme bestehen deren Einfluss auf Blutdruck und Funktion der Niere als gesichert gilt, ihre Funktion aber noch nicht abschließend geklärt ist.

### 1.4 Reninsynthese und Reninsekretion

Die Niere gilt als das wichtigste Organ, welches zur Freisetzung von enzymatisch aktivem Renin in den Kreislauf fähig ist. Ort der Reninsekretion sind die Renin bildenden Zellen in juxtaglomerulärer Position innerhalb der Media der terminalen afferenten Arteriole, wobei Anzahl und Lokalisation variieren können (Hackenthal et al., 1990; Cantin et al., 1977; Chen et al., 2007; Sequeira Lopez et al., 2004).

Bezüglich der Anzahl der Reningene existieren zwei unterschiedliche Mausstämme. Ein Stamm besitzt ein Reningen, das Ren-1C, wohingegen ein anderer Stamm zwei Reningene aufweist, das Ren-1D und Ren-2. Dies ist wahrscheinlich das Resultat einer Genduplikation die vor ungefähr drei Millionen Jahren stattgefunden hat (Dickinson et al., 1984). Ren-2 wird in der Glandula submandibularis exprimiert, das Ren-1 in der Glandula submandibularis und Niere. Ein Unterschied der Plasmoreninlevel abhängig von der Anzahl der Reningene konnte jedoch nicht festgestellt werden (Hansen et al., 2004). Das Reningen weist eine hohe Homologie zwischen den verschiedenen Spezies auf. Das auf Chromosom eins liegende Reningen der Maus weist neun Exons und acht Introns auf, ein Exon weniger als das des Menschen (Castrop et al., 2010). Die Reninsynthese beginnt mit der Transkription und Translation, was zum Erhalt des vorläufigen Zwischenprodukts, dem Prä-Prorenin-Protein, führt. Das neu synthetisierte Prä-Prorenin-Protein wird dann in die Zisternen des endoplasmatischen Retikulums überführt. Während dieses Vorgangs wird das Signalpeptid abgespalten wodurch Prorenin entsteht. Das Prorenin wird weiter in die Zisternen des Golgi-Apparats überführt. Von diesem Punkt an werden zwei unterschiedliche Pfade beschritten. Zum einen wird das Prorenin in kleine, klare Vesikel verpackt und unverzüglich konstitutiv sezerniert. Zum anderen

wird das Prorenin unter Abspaltung der Pro-Sequenz in Vesikeln gespeichert, welche als dichte Granula (Dense Core Vesikel) imponieren. Diese sekretorischen Speichervesikel unterstehen der regulierten Exozytose und werden nach dem Alles oder Nichts Prinzip freigesetzt (Schweda et al., 2007; Peti-Peterdi et al., 2004). Es finden ca. 25% des synthetisierten Renins den Weg in die Dense Core Vesikel, während 75% des Renins konstitutiv sezerniert werden (Pratt et al., 1987). Studien an Mäusen haben gezeigt, dass nur Mäuse, die das Renin-1-Gen aufweisen, fähig sind die für die regulierte Exozytose nötigen dichten Granula zu bilden (Clark et al., 1997). Das ausgehend vom Renin-1-Gen gebildete Renin weist drei Glykosylierungsstellen auf. Diese mögen sowohl für den Weg des Renins in die Speichervesikel wie auch den späteren Übertritt in anderes Gewebe nötig sein (Mullins et al., 2000; Peters et al., 2002). Die Speichervesikel beinhalten, neben dem Prorenin Proteasen, die Prohormone Convertase und Cathepsin B. Diese sind befähigt, die Prosequenz des Prorenins abzuspalten und somit das aktive Renin zu bilden (Alund 1980; Buhrle et al., 1984; Mercure et al., 1996; Neves et al., 1996). Die Menge des sezernierten Renins und Prorenins hängt von der Stimulation ab. Während eine akute Stimulation zu einer gesteigerten Reninsekretion führt, resultiert eine chronische Stimulation z.B. mit einer Nidrigsalzdiät und oder Enalaprilgabe, in einer erhöhten Renin- und Proreninsekretion (Toffelmire et al., 1989). Während das totale Zellvolumen und die totale Menge an juxtaglomerulärer Zellgranula sich unter Stimulation vervielfacht, bleibt das mittlere Zellvolumen und die Granulamenge pro juxtaglomerulärer Zelle gleich (Rasch et al., 1998). Eine Stimulation des RAAS äußert sich demnach in einer Zunahme der Renin produzierenden Zellen und nicht über eine Veränderung der Prozesse innerhalb der einzelnen Zelle (Schweda et al., 2007).

## **1.5 Regulation der Reninsynthese und Reninsekretion**

### **1.5.1 Faktoren der physiologischen Regulation**

An der physiologischen Regulation der Reninsynthese und Reninsekretion sind mehrere Faktoren beteiligt. Einfluss nehmen der Blutdruck, die Salzkonzentration, das sympathische Nervensystem sowie Angiotensin II.



### 1.5.1.1 Der Blutdruck

Der Blutdruck nimmt Einfluss auf die Reninsynthese und Reninsekretion, wobei der Druck, nicht das Volumen, die entscheidende Einflussgröße ist (Nafz et al., 1997). Bei steigendem Blutdruck sinkt die im Plasma gemessene Reninkonzentration, während sie bei sinkendem Blutdruck ansteigt (Skinner et al., 1964; Bock et al., 1992). Es wird von einem renalen Barorezeptor ausgegangen, dessen genaue Lokalisation noch unbekannt ist. Untersuchungen an einer denervierten Hundeniere unter Ausschluss der Filtrationsfunktion sowie einer isoliert perfundierten Niere einer Ratte legen nahe, dass der Mechanismus des Barorezeptors innerhalb der Nierengefäße beheimatet ist (Hackenthal et al., 1990). Möglicherweise wird der Barorezeptor-Mechanismus über die Dehnung der Renin sezernierenden Zellen ausgelöst. Versuche an juxtaglomerulären Zellen einer Ratte weisen in diese Richtung. Die in einer Kultur angezüchteten Granulazellen wurden mechanischer Dehnung ausgesetzt und sie reagierten darauf mit Herabsetzung der Reninfreisetzung (Carey et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass juxtaglomeruläre Zellen vermehrt extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen, wenn der Perfusionsdruck innerhalb der afferenten Arteriole zunimmt. Die Aufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  scheint über mechanosensible Kationenkanäle und L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu erfolgen (Lai et al., 2011). Für die Hemmung der Reninfreisetzung bei erhöhtem Blutdruck scheint unter anderem der A1 Adenosin Rezeptor verantwortlich zu sein. Dies ergab eine Studie, innerhalb deren der A1 Adenosin Rezeptor pharmakologisch blockiert und genetisch deletiert wurde. Bei herabgesetztem Blutdruck nimmt der A1 Adenosin Rezeptor keinen Einfluss auf das Reninsystem (Schweda et al., 2005). Ferner bestehen Gap-junctions zwischen den einzelnen juxtaglomerulären Zellen. Wesentlicher Bestandteil dieser Gap-junctions ist das Protein Connexin 40, dessen Relevanz an Connexin 40-Knockout-Mäusen untersucht wurde. Die Renin bildenden Zellen zeigten eine Verlagerung von ihrer juxtaglomerulären Lokalisation ins periglomeruläre Interstitium und wiesen gesteigerte Plasmapreninlevel sowie einen erhöhten Blutdruck auf. Weiter konnte eine Beeinträchtigung der perfusionsbedingten Regulation der Reninsynthese festgestellt werden. Somit scheint die juxtaglomeruläre Position der Renin bildenden Zellen und das Vorhandensein von Connexin 40 für die physiologische Funktion des Barorezeptors unabdingbar zu sein (Kurtz et al., 2007; Machura et al., 2014). Die genaue Lokalisation und Funktion bleibt jedoch weiter unklar, während die Existenz und Wirkung des Barorezeptors allgemein anerkannt ist.

### 1.5.1.2 Die Salzkonzentration an der Macula densa

Der distale Tubulus hat engen Kontakt zum Gefäßpol des zugehörigen Glomerulus und wird als Macula densa bezeichnet. Die Macula densa ist Teil des juxtaglomerulären Apparats und fungiert als Chemorezeptor. Sie hat direkten Einfluss auf die glomeruläre Filtrationsrate. Wird an der Macula densa eine erhöhte  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Konzentration gemessen, erfolgt eine Konstriktion der afferenten Arteriole, was zur Abnahme der glomerulären Filtrationsrate führt (Thurau et al., 1965; Wright et al., 1974; Schlatter et al., 1989; Castrop, 2007). Weiter konnte gezeigt werden, dass bei Vorliegen einer gesteigerten  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Konzentration an der Macula Densa, vermindert Renin aus den juxtaglomerulären Zellen ausgeschüttet wird, während eine verminderte  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Konzentration eine vermehrte Ausschüttung von Renin zur Folge hat (Lorenz et al., 1991; Skot et al., 1987; Traynor et al., 1999; Weihprecht et al., 1990). Die  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Konzentration, gemessen an der Macula Densa, beeinflusst somit über die Reninausschüttung den Salz- und Wasserhaushalt und als Folge den systemischen Blutdruck. Als Sensor dient die Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters (Obermüller et al., 1996). Dementsprechend verhindert die Gabe von Schleifendiuretika die Suppression der Reninsekretion auch bei hohen  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Konzentrationen (Lorenz et al., 1991). Die Signalweiterleitung von der Macula Densa auf die juxtaglomerulären Zellen ist noch nicht gesichert. Es sind aber drei Moleküle bekannt, die möglicherweise eine Rolle bei der Signalweiterleitung spielen, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Stickstoffmonoxid (NO) und Adenosin 1. Prostaglandin E<sub>2</sub> wird von der Cyclooxygenase-2 und NO von der NO-Synthase gebildet. Beide werden von den Zellen der Macula Densa exprimiert und bei Stimulation gemeinsam mit Renin hochreguliert (Bosse et al., 1995; Harris et al., 1994; Mann et al., 2001). Adenosin 1 ist hingegen mit der Hemmung der Renin-Freisetzung vergesellschaftet. Als Reaktion auf hohe  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Konzentrationen setzen die Zellen der Macula Densa vermehrt ATP (Adenosintri-phosphat) frei. Dieses wird zu Adenosin 1 abgebaut und supprimiert die Reninfreisetzung über Adenosin 1-Rezeptoren (Kurtz, 1988). Der genaue Signalweg ist noch unbekannt, die zentrale Rolle der Macula Densa innerhalb der Reninregulation, besonders der akuten, gilt jedoch als gesichert (Schweda, 2014).

### 1.5.1.3 Das sympathische Nervensystem

Sympathisch innerviert werden die Glattmuskelzellen der Gefäßwände, die Zellen des proximalen und distalen Tubulus, die Zellen der Henle-Schleife sowie die juxtaglomerulären Zellen (Barajas et al.,

1992; DiBona, 2000). Die Wirkung des Sympathikus wird über verschiedene Rezeptoren, welche gewebeabhängig exprimiert werden, vermittelt. Es sind  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, und  $\beta_3$ -Rezeptoren bekannt.

Direkten Einfluss hat das sympathische Nervensystem über den  $\beta_1$ -Rezeptor. Dieser konnte mittels Rezeptor-Bindungs-Studien und in situ Hybridisation auf juxtaglomerulären Zellen nachgewiesen werden (Hackenthal et al., 1990). Um die Wirkung des  $\beta_1$ -Rezeptors zu verstehen, wurde einerseits Versuchstieren  $\beta$ -Blocker verabreicht und andererseits die nervale Versorgung der Niere unterbunden. Beide Versuche resultierten in einer verminderten Reninsekretion (Keeton et al., 1980; Holmer et al., 1994). Des Weiteren wurden  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -Rezeptor-Knockout-Mäuse untersucht. Sie wiesen eine um 85% verminderte Plasmaninkonzentration im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf. Die Wirkung äußerer Stimuli der Reninsekretion auf  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -Rezeptor-Knockout-Mäuse blieb dabei erhalten, jedoch in abgeschwächtem Ausmaß (Kim et al., 2004). Somit scheint die sympathische Innervation der juxtaglomerulären Zellen einer der stärksten Hintergrundstimuli der basalen Reninsekretion zu sein (Castrop et al., 2010). Als Stimulus am  $\beta_1$ -Rezeptor wirken zirkulierende und lokal sezernierte Katecholamine, wie Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Sie binden am  $\beta_1$ -Rezeptor und aktivieren über das G-Protein  $G_{\alpha}$  die Adenylatcyclase 5 und 6, was zu einem Anstieg des cAMPs führt, welches wiederum eine Steigerung der Reninsekretion bewirkt (Aldehni et al., 2011; Chen et al., 2007 ; Friis et al., 2013). Auswirkungen auf die Reninsekretion durch Stimulation der  $\alpha$ -Rezeptoren werden als indirekt angesehen. Eine direkte Stimulation der Renin bildenden Zellen über  $\alpha$ -Rezeptoren ist nicht bekannt (Hackenthal et al., 1990).

Indirekten Einfluss auf die Reninproduktion haben folgende Faktoren. Die Stimulation der  $\alpha_1$ -Rezeptoren führt zur Konstriktion der Gefäßwände und  $\beta_1$ -Rezeptoren vermitteln am Herzen positive Inotropie und Chronotropie. Beide bewirken sekundär einen Anstieg des systemischen Blutdrucks. Die  $\alpha_2$ -,  $\beta_2$ -, und  $\beta_3$ -Rezeptoren wirken vasodilatatorisch und senken so den Blutdruck (Klinke et al., 2005). Über die Blutdruckregulation haben die genannten Rezeptoren indirekten Einfluss auf die Reninproduktion.

### 1.5.1.4 Angiotensin II

Angiotensin II (ANG II) ist ein potenter Vasokonstriktor und vermittelt die Freisetzung von Vasopressin und Aldosteron. Zusammen sorgen sie für eine Erhöhung des systemischen Blutdrucks. Durch die Erhöhung des Blutdrucks senkt ANG II indirekt die Reninsekretion im Sinne einer negativen

Feedback-Schleife (Hackenthal et al., 1990). Ferner wird von einer direkten negativen Feedback-Schleife ausgegangen, bestehend aus einer direkten Hemmung der Reninsekretion abhängig von der ANG II Konzentration. Dies ist wahrscheinlich, da die juxtaglomerulären Renin bildenden Zellen reich mit AT<sub>1</sub>-Rezeptoren bestückt sind (Burson et al., 1994; Schweda and Kurtz, 2011). Des Weiteren resultierte die Gabe von ANG II in vivo, an der isoliert perfundierten Niere, sowie an isolierten Renin bildenden Zellen in einer Hemmung der Reninsynthese und Reninsekretion (Vandogen et al., 1974; Schunkert et al., 1992). Ebenso führte die Gabe von ANGII, in nicht vasopressorischer Dosis, zu einer Verminderung der Reninsekretion (Davis et al., 1976; Hackenthal et al., 1990). Die Gabe von ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockern, in systemisch wirksamer Dosis, führt ebenso zu einer stark erhöhten Plasmanreninkonzentration und Rekrutierung Renin bildender Zellen innerhalb der afferenten Arteriole (Castrop et al., 2003; Hoher et al., 2001). Zusätzlich wurden Studien an AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen durchgeführt. Die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäuse zeigten unter physiologischer Ernährung fünffach erhöhte Renin mRNA Level im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen. Die Gabe von Niedrigsalzfutter führte bei den AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen zu einem Anstieg der Reninexpression um das zwölffache. Während die gemessenen Blutdruckunterschiede der Wildtyp-Mäuse unter Hoch-Salz-Diät und Niedrig-Salz-Diät gering waren, betragen sie bei AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen 30 mmHg (Machura et al., 2012). Zusammenfassend kann sowohl von einer direkten Feedback-Schleife als auch einer indirekten Hemmung ausgegangen werden, wobei die indirekte Hemmung über den Baro-Rezeptor wohl die ausschlaggebendere ist. (Castrop et al., 2010; Schweda and Kurtz, 2011).

### 1.5.2 Weitere humorale und lokal sezernierte Faktoren

Eine breite Palette weiterer Faktoren hat Einfluss auf die Reninsynthese und/oder die Reninsekretion. Einen stimulierenden Einfluss wird folgenden Faktoren zugeschrieben: Adrenomedulin (Kurtz et al., 1988c), Calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Kurtz et al., 1988c), Dopamin (Imbs et al. 1975), Glukagon (Keeton and Campbell 1980), Parathormon (Keeton and Campbell, 1980), Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) (Hautmann et al., 2007), Prostaglandin E<sub>2</sub> (Jensen et al., 1996), Prostaglandin I<sub>2</sub> (Jensen et al., 1996), Vasoactive intestinal peptide (VIP) (Porter et al., 1982), Bradykinin (Beierwaltes et al., 1985), Glukokortikoide (Klar et al., 2004), Histamin (Gerber and Nies, 1983), Stickstoffmonoxid (Beierwaltes, 1997), Thyroxin und Triiodthyronin (Chen et al., 2005), Vitamin A (Shi et al., 2001). Einen hemmenden Einfluss auf das Reninsystem wird den

folgenden Faktoren beigemessen:  $\alpha$ -adrenerge Agonisten (Keeton and Campbell, 1980), Adenosin (Churchill and Churchill, 1985), Arginin-Vasopressin (Bunag et al., 1967), Atrial natriuretic peptide (ANP) (Burrell et al., 2005), Endothelin (Kurtz et al., 1991), Neuropeptide Y (NPY) (Bischoff et al., 1997), Interleukin-1 (Jensen et al., 1998), Interleukin-6 (Pan et al., 2005), Onkostatine M (Baumann et al., 2000), Plättchen-aktivierender-Faktor (Pfeilschifter et al., 1985), Substanz P (Pinet et al., 1987), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (Todrov et al., 2002), Vasopressin (Antidiuretisches Hormon) (Aoyagi et al., 2008), Vitamin D (Li et al., 2002).

### 1.5.3 Zelluläre Ebene der Regulation

Vergleichbar mit der Hormonfreisetzung anderer sekretorischer Zellen, wird die Reninsekretion mittels intrazellulärer Messenger-Systeme gesteuert. Innerhalb der Renin bildenden Zelle übernehmen zyklisches AMP (cAMP), zyklisches GMP (cGMP) und Kalzium diese Aufgabe.

#### 1.5.3.1 Der cAMP-Signalweg

cAMP ist der zentrale intrazelluläre Stimulator der Reninfreisetzung (Castrop et al., 2010). Dies zeigt sich darin, dass alle Hormone welche die Reninsekretion stimulieren ihre Wirkung über die cAMP-Konzentration entfalten. Beispielsweise Prostaglandin  $E_2$  und  $I_2$  (Jensen et al., 1996), Dopamin (Kurtz et al., 1988 b), PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) (Hautmann et al. 2007) und Adrenomedullin (Jensen et al., 1997) stimulieren die Reninfreisetzung isolierter juxtaglomerulärer Zellen direkt und bewirken gleichzeitig einen Anstieg der cAMP-Konzentration. Des Weiteren führt die Aktivität des sympathischen Nervensystems über  $\beta_1$ -Rezeptoren zur Aktivierung des cAMP-Signalwegs mit konsekutiver Erhöhung der Reninsekretion. So konnte an Adenylatzyklase-Knock-Out-Mäusen gezeigt werden, dass eine Stimulation mit einem  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonist zu deutlich verminderten Plasmaninkonzentrationen im Vergleich mit der Kontrollgruppe führt (Aldehni et al. 2011). Nach Bindung des Liganden an seinen jeweiligen Rezeptor erfolgt die Aktivierung des G-Proteins  $G_s$ , welches aus drei Untereinheiten besteht. Das aktivierte  $G_s$ -Protein dissoziiert in eine aktive  $\alpha$ -Untereinheit und einen Komplex bestehend aus  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert die Adenylatzyklase, welche wiederum die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert (Alberts et al., 2005). Die Bedeutung der Adenylatzyklase konnte an isolierten juxtaglomerulären Zellen

gezeigt werden. Diese setzen vermehrt Renin frei, nachdem sie mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase, stimuliert wurden (Grünberger et al., 2006). Die Konzentration des cAMP ist abhängig von der Aktivität der Adenylatzyklase und der Aktivität von Phosphodiesterasen (PDE), welche cAMP zu 5'-AMP hydrolysieren. PDE-3 und PDE-4 sind vermutlich die maßgeblichen Isoformen innerhalb der juxtaglomerulären Zelle (Chiu et al., 1996; Chiu et al., 1999). Die PDE-3 wird über cGMP gesteuert. Ein Anstieg der Konzentration an cGMP führt zur Hemmung der PDE-3, was zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration führt (Beavo, 1995). Das synthetisierte cAMP hemmt die Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum und vermindert die Kalzium-Permeabilität der Zellmembran. Die daraus resultierende verminderte Kalziumkonzentration hat positiven Einfluss auf die Reninsekretion (DellaBruna et al., 1993; siehe 1.5.3.3). Ferner stimuliert cAMP die Proteinkinase A von der ausgegangen wird, dass sie Teil des Mechanismus ist, welcher für die Freisetzung des Renins aus seinen Speichervesikeln verantwortlich ist (Friis et al., 2002; Castrop et al., 2005). Die Funktionsweise der Reninfreisetzung ist jedoch noch unbekannt (Schweda and Kurtz, 2011). Die zentrale Bedeutung des cAMP-Signalwegs konnte jedoch an reninzellspezifischen  $G_s\alpha$ -Knockoutmäusen gezeigt werden. Diese zeigten eine starke Reduktion der Reninexpression und Reninplasmakonzentration. Auch war bei diesen Mäusen eine Stimulation über Katecholamine, den Blutdruck oder den Macula-densa-Mechanismus kaum zu erreichen (Chen et al., 2007).

### 1.5.3.2 Der cGMP-Signalweg

Stickstoffmonoxid (NO) und das Atrial Natriuretic Peptid (ANP) sind in der Lage die cGMP-Konzentration zu erhöhen (Kurtz et al., 1986). Die Signalkaskade beginnt mit der Aktivierung zytosolischer oder membrangebundener Guanylatzyklasen durch NO und ANP. Die Guanylatzyklasen katalysieren die Synthese von cGMP aus GTP. Untersuchungen haben gezeigt, dass cGMP gegenüber der Phosphodiesterase-3 (PDE-3) als auch zu cGMP-aktivierende Kinasen (cGKs) Affinität besitzt und somit zwei Signalwege aktivieren kann (Butt et al., 1992). Zum einen bewirkt ein Ansteigen der cGMP-Konzentration die Hemmung der PDE-3 was zu einer Abnahme der Hydrolyse von cAMP und somit zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration führt. Der Anstieg der cAMP-Konzentration wiederum erhöht die Reninfreisetzung (Beavo, 1995, Friis et al., 2002; siehe 1.5.3.1). Zum anderen sind zwei cGMP abhängige Protein Kinasen bekannt, cGKI und cGKII. Die cGKI ist im Zytosol lokalisiert während die cGKII mit Renin Speichervesikeln assoziiert ist (Gambaryan et al. 1996, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von stabilem cGMP in juxtaglomerulären Zellkulturen vom Wildtyp

und Zellkulturen mit mangelnder cGKI zu einer Abnahme der Reninsekretion führt. Unter Ausschaltung der cGKII und unter stabiler cGMP-Gabe konnte hingegen keine Abnahme der Reninsekretion beobachtet werden (Gambaryan et al., 1998; Wagner et al., 1998). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die cGKII abhängig von der cGMP-Konzentration die Reninsekretion vermindert. Was ausschlaggebend für das Beschreiten des jeweiligen Signalwegs ist, ist noch nicht gesichert. Eine Möglichkeit wird in der Höhe der cGMP-Konzentration gesehen. Eine niedrige cGMP-Konzentration würde demnach die Reninsekretion stimulieren und ein Anstieg der cGMP-Konzentration die Reninsekretion inhibieren (Kurtz and Wagner, 1998). Außerdem spielt möglicherweise die Kompartimentbildung innerhalb der Zelle eine Rolle. Dies macht die unterschiedliche Lokalisation der Guanylatzyklen sowie die Lokalisation der PDE-3 und cGKII wahrscheinlich. Ein unabhängiges Bestehen der beiden Signalwege wäre so denkbar (Castrop et al., 2010; Schweda and Kurtz, 2011).

### 1.5.3.3 Kalzium

Während cAMP als der wesentliche Stimulator der Reninfreisetzung angesehen wird, betrachtet man die zytosolische Kalziumkonzentration ( $\text{Ca}^{2+}$ ) als den hauptsächlichsten Inhibitor der Reninfreisetzung (Castrop et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass die Gabe von ANGII, Endothelin, Vasopressin und Norepinephrin zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration innerhalb juxtaglomerulärer Zellen führt und eine Hemmung der Reninfreisetzung bewirkt (Grünberger et al., 2006, Ichihara et al. 1995, Kurtz et al., 1984, 1986 c). Ferner konnte an der isoliert perfundierten Niere einer Ratte die hemmende Wirkung erhöhter Kalziumkonzentrationen innerhalb juxtaglomerulärer Zellen auf die Reninausschüttung gezeigt werden. Dies wurde mittels Hemmung der endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durch Thapsigargin und Cyclopiazonsäure erreicht, woraus eine erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration mit konsekutiver Abnahme der Reninsekretion resultierte (Schweda et al., 2000). Des Weiteren konnte mittels des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatbildners BAPTA gezeigt werden, dass sinkende Kalziumspiegel mit einer Steigerung der Reninsekretion einhergehen und eine Endothelin vermittelte Inhibierung ausbleibt (Moe et al., 1991). Auch die extrazelluläre Kalziumkonzentration nimmt Einfluss auf die Reninsekretion. Eine niedrige extrazelluläre Kalziumkonzentration geht mit einer Stimulation der Reninsekretion einher, während Infusionen von Kalzium zu einer Reduktion der Reninsekretion führen (Hackenthal et al., 1990; Watkins et al., 1976). Somit äußert sich der Anstieg der intrazellulären wie der extrazellulären Kalziumkonzentration mit einem Abfall der Reninsekretion, wohingegen ein Abfall der intra- oder extrazellulären Kalziumkonzentration mit einem Anstieg der

Reninsekretion manifest wird. Dies wird als Kalzium-Paradoxon der Reninfreisetzung bezeichnet, da in den meisten sekretorischen Zellen ein Anstieg der Kalziumkonzentration mit einer Steigerung der Sekretionsrate einhergeht (Cohen et al., 1997). Es wird von einer positiven Korrelation zwischen dem extrazellulären und intrazellulären Kalzium ausgegangen (Castrop et al., 2010; Schweda and Kurtz, 2011). Zudem ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing-Rezeptor bekannt, der möglicherweise, abhängig von der extrazellulären Kalziumkonzentration, Einfluss auf die Reninsekretion nimmt (Ortiz-Capisano et al. 2007 a). Bezüglich des intrazellulären Mechanismus, welcher durch Änderungen der Kalziumkonzentration ausgelöst wird, bestehen mehrere Ansätze. Eine Möglichkeit besteht in einem durch Interaktion von Kalzium und Calmodulin bestehenden Mechanismus, da die medikamentöse Unterdrückung von Calmodulin in Kulturen juxtaglomerulärer Zellen zu einer Steigerung der Reninsekretion geführt hat (Della Bruna et al., 1992). Ein weiter Ansatz wird in durch Kalzium aktivierbaren Chloridkanälen gesehen, welche sich in der Zellmembran juxtaglomerulärer Zellen befinden. Dafür sprechen Untersuchungen an einer isoliert perfundierten Niere einer Ratte die gezeigt haben, dass die pharmakologische Blockade der Chloridkanäle die inhibitorischen Effekte von ANG II auf die Reninsekretion vermindert (Nabel et al., 1999). Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Hemmung der Reninfreisetzung durch die Kalziumabhängige Proteinkinase C (PKC). Innerhalb von in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass PKC-Inhibitoren die inhibitorischen Einflüsse von Endothelin auf die Reninsekretion abschwächen (Münter and Hackenthal, 1989). Schlussendlich scheint die Hemmung von Adenylatzyklen (AC) durch Kalzium eine Rolle zu spielen. In Zellen mit Knockdown der AC5 und AC6 wurde keine Hemmung der Reninfreisetzung durch Gabe von Kalzium abhängigen Inhibitoren der Reninfreisetzung erreicht (Grünberger et al 2006). Des Weiteren führte die Gabe von Kalziumchelatoren zu keiner Erhöhung der cAMP Level und Reninfreisetzung bei gleichzeitiger Blockade der AC5 und AC6 (Ortiz-Capisano et al., 2007 c). Beides spricht für eine Kalzium abhängige Hemmung der Adenylatzyklen mit daraus resultierender Minderung des cAMP-Spiegels und konsekutiv erniedrigter Reninfreisetzung. Der letztgenannte Weg könnte eine gute Erklärung für das Kalzium-Paradoxon sein, weiterer Forschungsbedarf bleibt jedoch bestehen (Schweda and Kurtz, 2004; Schweda and Kurtz, 2011).

### 1.6. Die Cyclooxygenase



### 1.6.1 Prostaglandin E<sub>2</sub> und I<sub>2</sub>

Über das komplexe Zusammenspiel der Prostaglandine wird eine Vielzahl von Prozessen im Körper reguliert. Dazu zählen die Vasoaktivität von Gefäßen, die Nierendurchblutung, Thrombozytenaggregation, Bronchokonstriktion und –dilatation, die Vermittlung von Schmerzen und Fieber, die Modulation von Immunantworten sowie die Produktion von Säure und Schleim im Magen. Die Synthese der Prostaglandine beginnt mit der Freisetzung der Arachidonsäure (Bonventre, 1999). Diese wird mittels der Phospholipase A2 hydrolytisch aus den Phospholipiden der Zellmembran gespalten. Die Konversion der Arachidonsäure zum Prostaglandin H<sub>2</sub> wird durch die Cyclooxygenase (COX) katalysiert, die das geschwindigkeitsbestimmende Enzym ist (Herschman, 1996). Für sie sind zwei Unterformen bekannt, die COX-1 und COX-2, welche beide innerhalb der Niere exprimiert werden (Hao and Breyer 2007). Die Umwandlung des Prostaglandin H<sub>2</sub> zu biologisch aktiven Prostaglandinen, wie Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), erfolgt mittels spezifischer Synthesen. Prostaglandin E<sub>2</sub> entfaltet seine Wirkung über die Prostaglandin EP1-4 Rezeptoren während Prostaglandin I<sub>2</sub> den IP-Rezeptor aktiviert (Breyer and Breyer, 2000). Es konnte anhand von juxtaglomerulären Zellkulturen gezeigt werden, dass die Aktivierung des EP2-, EP4- und IP-Rezeptors zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration und Reninsekretion führt (Friis et al. 2005).

### 1.6.2 Cyclooxygenase 2

COX-2-Expression konnte innerhalb der Zellen der Macula densa und dem angrenzenden kortikalen aufsteigenden Anteil der Henle-Schleife (cTAL) sowie in den Sammelrohren und den interstitiellen Zellen des Nierenmarks nachgewiesen werden (Harris, 2006). Die Tatsache das die Zellen der Macula densa und die benachbarten Zellen des cTAL COX-2 exprimieren, lässt vermuten, dass sie eine Rolle innerhalb des tubuloglomerulären Feedbacks und der Reninsekretion spielen. Untersuchungen an Ratten, die zum einen mit einer Niedrig- und zu anderen mit einer Hochkochsalzdiät behandelt wurden haben gezeigt, dass die kortikale COX-2 Expression unter Niedrigsalzdiät stimuliert wird, während sie unter Hochsalzdiät supprimiert wird. Im Mark verhält es sich umgekehrt. Hier führt die Niedrigsalzdiät zu einer verminderten COX-2 Expression während die Gabe einer Hochsalzdiät eine erhöhte Expression der COX-2 bewirkt. Veränderungen der COX-1 Expression, welche in Kortex und Mark exprimiert wird, konnten unter keiner der beiden Diäten festgestellt werden (Yang et al., 1998; Jensen and Kurtz, 1997). Des Weiteren resultiert die Gabe von ACE-Inhibitoren, AT<sub>1</sub>-Antagonisten

und Furosemid ebenfalls in einer gesteigerten Reninfreisetzung und vermehrter Expression der COX-2 in den Zellen der Macula densa und den Zellen des cTAL (Cheng et al., 1999; Mann et al., 2001). Die gesteigerte Reninfreisetzung ausgelöst durch ACE-Inhibitoren und Furosemid konnte mittels selektiven COX-2 Inhibitoren signifikant gehemmt werden (Cheng et al., 1999; Mann et al., 2001). Gleiches konnte bei Untersuchungen an COX-2-Knockout-Mäusen beobachtet werden. Diese reagierten weder auf ACE-Hemmer noch auf eine Nidrigsalzdiät mit gesteigerter Reninexpression, die bei Wildtyp-Mäusen zu erwarten gewesen wäre (Cheng et al., 2001). Ferner konnte ein durch Phorbol ester induziertes Ansteigen der COX-2 Expression durch die Gabe von ANG II, in cTAL Zellkulturen, unterdrückt werden (Cheng et al., 1999). Es wird eine generelle Unterdrückung der COX-2 Expression durch ANG II vermutet (Castrop et al., 2002). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass mit reduzierter Salzzufuhr perfundierte isolierte Macula densa Zellen das COX-2 abhängige PGE<sub>2</sub> an der basolateralen Zellmembran freisetzen (Peti-Peterdi, 2003). Ein Einfluss der cTAL und Macula densa abhängigen Prostaglandine, gebildet durch die COX-2, auf die Reninfreisetzung erscheint daher möglich. Darüber hinaus wird von einer Regulierung der Reninexpression durch die COX-2 der Macula densa ausgegangen, in Abhängigkeit von Salzkonzentration gemessen an der Macula densa durch den Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-Rezeptor (Schnermann, 1998; Harris, 2008). Die Frage bleibt jedoch strittig, da laut einer Studie Änderungen der Reninexpression ohne signifikante Änderungen der COX-2 Expression möglich sind und die COX-2 als nicht essentiell für die Regulation der Reninsekretion angesehen wird (Wagner et al., 2003; Höcherl et al., 2002 b). Eine mögliche Lösung könnte folgende Studie anbieten. Ratten mit einer unilateralen Nierenarterienstenose wurden mit einem selektiven COX-2 Inhibitor behandelt. Die einmalige Gabe führte zu keiner Abnahme der Plasmapreninaktivität. Nach fünftägiger Gabe konnte jedoch eine Abnahme der Reninaktivität festgestellt werden (Matzdorf et al., 2007). Die von der COX-2 gebildeten Prostaglandine könnten demnach Verstärker der basalen Reninsekretion sein, ohne in der Akutsituation Wirkung zu entfalten (Schweda and Kurtz, 2011).

### 1.6.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kleines Molekül, welches aufgrund seiner Lipophilie frei über Zellmembranen diffundieren kann. Es wirkt als lokaler Mediator in vielen Geweben des Körpers. Zum Beispiel setzen Gefäßendothelzellen NO als Antwort auf Stimulation durch Nervenzellen frei. In den glatten Muskelzellen der Gefäßwand führt es dann zu einer Dilatation. NO hat nur lokale Wirkung, da es durch Reaktion mit Sauerstoff und Wasser schnell zu Nitrat und Nitrit umgewandelt wird (Alberts

et al., 2005). NO wird aus L-Arginin mittels NO-Synthasen (NOS) synthetisiert. Es existieren drei Isoformen der NOS, die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS) (Morissey et al., 1993; Bachmann et al. 1995). Die Renin bildenden Zellen sind umgeben von Zellen die befähigt sind NO zu bilden. Dazu gehören die endothelialen Zellen der Arterien, Arteriolen, die glomerulären Kapillaren, die Vas recta (eNOS) sowie die Zellen der Macula densa (nNOS) (Bachmann et al., 1995). Studien konnten zeigen, dass sich die Expression der nNOS der Macula densa parallel zur Reninexpression verhält. Neben der zu erwartenden Steigerung der Reninexpression wurden Steigerungen der nNOS Expression unter Volumenmangel, Salzrestriktion und Gabe von Schleifendiuretika gemessen (Bosse et al., 1995, Singh et al., 1996). Zudem wurde beobachtet, dass die Blockade der NO-Bildung die Stimulation des Reninsystems durch eine Nidrigsalzdiät verhindert (Schricker and Kurtz, 1996). Unter Einsatz des nicht selektiven NO-Synthetase-Inhibitors L-Name, konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der NO-Bildung zum Ausbleiben der Rekrutierung entlang der afferenten Arteriolen und zur Minderung der Rekrutierung in juxtaglomerulärer Poition führt (Neubauer et al., 2013). Es gilt als gesichert, dass NO die Reninsynthese und -freisetzung auf Dauer stimuliert, während die kurzfristige Gabe inhibierend wirkt (Kurtz and Wagner 1989). Es wird vermutet, dass NO über den cGMP-Signalweg (siehe 1.5.3.2) Wirkung entfaltet. So konnte gezeigt werden, dass die stimulierende wie die inhibierende Wirkung von NO bei gleichzeitiger Gabe eines Guanylat-Zyclase-Inhibitors aufgehoben wurde (Schricker and Kurtz 1993; Greenberg et al., 1995). Die inhibitorische Wirkung wird vermutlich über die GKII (cGMP abhängige Protein Kinase) während die stimulatorischen Eigenschaften vermutlich durch einen Anstieg des cAMP durch Blockade der PDE3 (Phosphodiesterase-3) vermittelt werden (siehe 1.5.3.2; Kurtz and Wagner, 1989; Kurtz et al., 1998). Ferner wird davon ausgegangen, dass bei der Stimulation der Reninfreisetzung die A-Kinase und bei Inhibierung der Reninfreisetzung die G-Kinase eine Rolle spielt (Kurtz and Wagner 1989). Um die Bedeutung der eNOS und nNOS für das Reninsystem zu zeigen wurden Untersuchungen an Knockout-Mäusen durchgeführt. Die eNOS-Knockout-Mäuse zeigten eine reduzierte Reninexpression bei normalen Plasmareninkonzentrationen. Die nNOS-Knockout-Mäuse hingegen zeigten verminderte Plasmareninkonzentrationen bei gleichbleibender Reninexpression. Dies lässt vermuten, dass NO der eNOS die Reninsynthese stimuliert während NO der nNOS die Reninfreisetzung stimuliert (Castrop et al., 2004 b). Es lässt sich festhalten, dass NO sich vornehmlich stimulierend auf die Reninsynthese und Sekretion auswirkt (Schweda and Kurtz, 2011).

## 1.7 Zielsetzung

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Frage welche Faktoren bei der Stimulierbarkeit des RAAS eine Rolle spielen. Eine Stimulation des RAAS äußert sich zum einen durch ein vermehrtes Auftreten Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriolen, was als retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen bezeichnet wird. Zum anderen liegen die Reninzellen der stimulierten Maus in unmittelbarer Nähe zum Gefäßpol mehrschichtig vor, dies wird als Clusterbildung bezeichnet. Beim Mechanismus der Rekrutierung Renin bildender Zellen handelt es sich dabei um die metaplastische Umwandlung glatter Gefäßmuskelzellen in Renin bildende Zellen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Frage, in wie weit sich die Inhibierung der COX-2 auf die Stimulierbarkeit der RAAS auswirkt. Insbesondere soll die Lage der Renin bildenden Zellen innerhalb des Gefäßbaums der adulten Mäuseniere untersucht werden. Die Arbeitsgruppe um Armin Kurtz beschäftigt sich bereits seit längerer Zeit mit diesem Thema. Ein Teil ihrer Arbeit widmet sich der Frage, in wie weit Stickstoffmonoxid (NO) eine Rolle innerhalb der Rekrutierung Renin bildender Zellen spielt? Dafür wurden Mäusen mit einem Knockout der Stickstoffmonoxid sensiblen Guanylat Zyklyase untersucht. Im Ergebnis zeigte sich, unter Stimulation mittels Nidrigsalzdiät und ACE-Inhibitorgabe, ein Ausbleiben der Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole während die Clusterbildung in juxtaglomerulärer Position weiter bestand (Neubauer et al., 2013). Das NO ein wesentlicher Faktor der Rekrutierung Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriole ist, ist somit erwiesen. Es stellt sich die Frage, welche Faktoren, bei stimuliertem RAAS, für die Clusterbildung in juxtaglomerulärer Positionverantwortlich sind? In diese Richtung weisen frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Armin Kurtz. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem ACE-Hemmer und einer Nidrigsalzdiät zu einer Erhöhung der COX-2 Expression innerhalb der Macula densa führt (Castrop et al., 2003). Die COX-2 käme somit als wesentlicher Faktor für die Clusterbildung bei stimuliertem RAAS in Frage. Bezüglich der Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentrationen unter COX-2-Hemmung besteht Uneinigkeit. Frühere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass ein COX-2-Knockout sich in einer aufgehobenen Stimulierbarkeit der Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentration zeigt (Cheng et al., 2001; Yang et al., 2000). Neuere Studien kommen hingegen zu dem Ergebnis, dass sowohl ein COX-2-Knockout, als auch die Behandlung mit dem COX-2-Inhibitor SC-58236 zu einer verminderten basalen Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentration führt, eine leicht eingeschränkte Stimulierbarkeit jedoch weiter besteht (Kim et al., 2007; Matzdorf et al., 2007).

Innerhalb dieser Arbeit werden die Messungen der mRNA- und Plasmareninkonzentration repliziert und um die Untersuchung der histologischen Aufnahmen und der 3D-Rekonstruktionen erweitert.

## Einleitung

Hierfür wurden histologische Serienschnitte von unbehandelten Wildtyp-Mäusen mit und ohne SC-236 (COX-2-Hemmer) Behandlung, sowie von Tieren die ausschließlich mit einer Niedrigsalzdiät und Enalapril (ACE-Hemmer) behandelt wurden, als auch von Tieren welche mit Niedrigsalzdiät, Enalapril und SC-236 behandelt wurden, angefertigt. Darüber hinaus wurde zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterschieden. Die Serienschnitte wurden gegen Renin und gegen Glattmuskulaktin fluoreszenzgefärbt. Die histologischen Aufnahmen wurden ausgewertet und aus der Gesamtheit der Serienschnitte, die 3D-Rekonstruktionen erstellt.

Die These, dass die COX-2 essentiell für die Stimulierbarkeit des RAAS und die Rekrutierung Renin bildender Zellen ist, sollte sich wie folgt darstellen. Die Rekrutierung entlang der afferenten Arteriolen und oder die Rekrutierung in juxtaglomerulärer Position müsste unter Stimulation des RAAS und Inhibierung des COX-2 geringer ausfallen. Des Weiteren müssten die Renin-mRNA- und Plasmarenin-konzentrationen geringer ausfallen. Eine unveränderte Rekrutierung Renin bildender Zellen und gleichbleibende mRNA- und Plasmareninkonzentrationen würden hingegen darauf hinweisen, dass die Mechanismen der Macula densa und des Barorezeptors unabhängig von der COX-2 ablaufen können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
<b>Computer</b>	Precision T5600, Dell, Frankfurt am Main
<b>Eismaschine</b>	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
<b>Filtersets</b>	
<b>TRITC-Filter:</b>	Filter set 43, Zeiss, Jena
<b>Anregung 533-558nm</b>	
<b>Emission 570-640nm</b>	
<b>Cy2-Filter:</b>	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
<b>Anregung 450-490nm</b>	
<b>Emission 500-550nm</b>	
<b>Fluoreszenzlampe</b>	X-Cite 120, EXFO Life Sciences Industrial Division, Mississauga, Canada
<b>Homogenisator</b>	Ultra-Turrax T25, Janke und Kunkel, Staufen
<b>Inkubationsschrank</b>	Modell B6200, Heraeus, Hanau
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
<b>Kamera</b>	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
<b>Magnetrührer</b>	MR 80, Heidolph, Schwabach
<b>Mikroskope</b>	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
<b>Mikrotom</b>	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
<b>MilliQ Plus PF Reinwasseranlage</b>	Millipore, Schwalbach

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
<b>PCR-Geräte</b>	LabCycler, Senso Quest GmbH Göttingen
<b>pH-Meter</b>	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
<b>Pipetten</b>	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
<b>Scantisch</b>	motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller) Ludl Electronic Products, München
<b>Schüttler</b>	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
<b>Spannungsquellen</b>	PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>UV-Leuchttisch</b>	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
<b>UV-Spektrometer</b>	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
<b>Vortexgeräte</b>	Vortex-Genie 2, Scientic Industries, New York USA REAX1, Heidolph, Schwabach
<b>Waagen</b>	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Waagen Feinwaage W13, Mettler, Gießen
<b>Wärmeblöcke</b>	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
<b>Wärmeplatte</b>	HI 1220, Leica, Wetzlar
<b>Wärmeschrank</b>	Modell 300, Memmert, Schwabach
<b>Wärmetopf</b>	PSI, HOT POT 1.411.80/l Modell W13, Haake, Karlsruhe
<b>Wasserbäder</b>	1083, GFL, Burgwedel
<b>Zentrifugen</b>	Labofuge 400, Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Auslaufpipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht

## Material und Methoden

---

Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Hochsalzfutter 4% NaCl	Ssniff, Soest
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Niedrigsalzfutter 0,02% NaCl	Ssniff, Soest
Normalsalzfutter 0,4% NaCl	Ssniff, Soest
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

---

### 2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Biozym, Oldendorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100bp DANN	New England, Biolabs, Frankfurt am
Ladder	Main
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt

---



## Material und Methoden

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/ $\mu$ l	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green	Promega, Mannheim
HCl 1N	
Heparin Liquemin®25000 5 ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase 200 U/ $\mu$ l	Invitrogen, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nuclease freies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT)15 Primer, 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Roti®-Safe GelStain	Roth, Karlsruhe
SYBR® Green PCR Kit	Roche, Mannheim
TRIzol®-Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

### 2.1.4 Primer

Die Primer (Oligonukleotide) wurden von der Firma Biomers.net in der gewünschten Nukleotid-abfolge synthetisiert und lyophilisiert. Mit Hilfe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Verdünnung der Konzentration 100pmol/μl hergestellt.

GAPDH	5´-ATG CCA TCA CTG CCA CCC AGA AG-3´
	5´-ACT TGG CAG GTT TCT CCA GGC GG-3
Renin	5´-ATG AAG GGG GTG TCT GTG GGG TC-3´
	5´-ATG CGG GGA GGG TGG GCA CCT G-3´

### 2.1.5 Antikörper

Antikörper	Art	Klonalität	Hersteller	Verdünnung	
<b>Chicken</b>	<b>anti-</b>	Primärantikörper	polyklonal	Davids Biotech, Regensburg	1:400
<b>Renin-IgG</b>					
<b>Mouse anti-</b>		Primärantikörper	polyklonal	Beckman Coulter	1:50
<b>Glattmuskelaktin-</b>				Immunotech., Marseille, Frankreich	
<b>IgG</b>					
<b>Donkey-Anti-</b>		Sekundärantikörper	Rhodamin	Dianova, Hamburg	1:400
<b>Chicken-IgY</b>			(TRITC)		
<b>Donkey</b>	<b>anti-</b>	Sekundärantikörper	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400
<b>mouse-IgY</b>					

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Immunhistochemie	
Fixierlösung für Perfusion	PBS

## Material und Methoden

		Paraformaldehyd	3%
<b>PBS-(Phosphate Saline) Puffer, pH 7,4</b>	<b>Buffered</b>	NaCl	136 mM
		KCl	2,7 mM
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10,1 mM
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
<b>PBS-Otto-Puffer, pH 7,4</b>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	10 mM
		NaCl	140 mM
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
<b>Waschpuffer</b>		PBS-Otto-Puffer	
		BSA	1%
<b>Blockierlösung</b>		PBS-Otto-Puffer	
		BSA	1%
		HS	10%

### Molekularbiologie

<b>Agarosegel</b>		TAE	1,5%
		Agarose	
<b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b>		1/1000 V DEPC in H <sub>2</sub> O bidest., schütteln, über Nacht geöffnet unter Abzug stehen lassen, dann autoklavieren	
<b>NaOH für gDNA-Extraktion</b>		NaOH	25 mM
<b>Tris HCl für gDNA-Extraktion</b>		Tris HCl	1 M, pH 8
<b>10x TAE (Tris-Acetat-EDTA)</b>		Tris Base	0,4 M
<b>Puffer</b>		Essigsäure	0,2 M
		EDTA	10 mM

#### 2.1.7 Software und Internetdienste

Die Mikroskopischen Aufnahmen wurden mit AxioVision 4.7 von Zeiss erstellt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden dann mit Adobe Photoshop CS4 und ImageJ (Wayne Rasband NIH. USA) weiter

bearbeitet. Mit Amira 5.4.1 visualization software (Mercury Computer Systems, Inc., USA) erfolgte die Anfertigung der 3D-Rekonstruktionen.

Für die Literaturrecherche wurde PubMed von NCBI- The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nih.gov> verwendet. Geschrieben wurde die Arbeit mit Microsoft Office 2007.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden C57Bl6-Wildtyp-Mäuse (WT) verwendet. Die Nager wurden in vier Gruppen unterteilt und jeweils unterschiedlich behandelt. Eine Gruppe (Normal Salt, NS), bestehend aus vier Tieren, wurde unter physiologischer Salzzufuhr von 0,4% NaCl gehalten. Eine Gruppe (Low Salt Enalapril, LS/Ena) von vier Tieren wurde über sieben Tage mit Niedrigsalzfutter (0,02% NaCl) und ab dem 3 Tag mit dem ACE-Inhibitor Enalapril (0,1 mg/ml) in Trinkwasser behandelt. Eine weitere Gruppe (NS/SC-236) aus fünf Tieren wurde entsprechend der NS-Gruppe ernährt und zusätzlich mit dem selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmer (SC-236 mit 1,2 mg/d) behandelt. Die vierte Gruppe von fünf weiblichen und fünf männlichen Tieren wurde die LS-Ena-Gruppe ernährt und ebenfalls mit 1,2 mg/d SC-236 behandelt.

Sämtliche Versuchstiere wurden gemäß dem ARVO Statement fort he Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research behandelt. Die Tiere wurden bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung in einem 12 h Tag- und 12 h Nachtintervall gehalten. Die Umgebungstemperatur wurde auf  $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , die Luftfeuchtigkeit auf  $55\% \pm 5\%$  eingestellt, was den optimalen Haltungsbedingungen von Labormäusen entspricht.

### 2.2.2 Histologische Methoden

#### 2.2.2.1 Fixation des Nierengewebes

Ziel der Fixation ist die Unterbindung autokatalytischer Vorgänge innerhalb des Nierengewebes. Auf diese Weise soll die Zellstruktur möglichst in ihrem natürlichen Zustand erhalten bleiben. Des Weiteren bewirkt die Fixation eine Härtung des Gewebes, was erhebliche Vorteile beim Schneiden der Nieren mit sich bringt.

Retrograde arterielle Perfusion:

Die Fixierung erfolgte mittels retrograder arterieller Perfusion mit 3% Paraformaldehyd in PBS. Zu Beginn wurden die Mäuse mit einer Kombination aus Ketamin (80mg/kg KG i.p.) und Xylazin anästhesiert. Nach Verabreichen des Anästhetikums wurde das Abdomen eröffnet und die Aorta abdominalis dargestellt. Um die Perfusion der Nieren nicht zu beeinträchtigen wurde die Aorta abdominalis unterhalb der Abgänge der Arteriae renales mittels einer Klemme unterbunden. Distal der Klemme wurde der Perfusionskatheter eingeführt und fixiert. Im Anschluss wurde zur Erlangung eines Druckausgleichs die Vena cava inferior eröffnet. Zu Beginn der Perfusion wurde die Klemme oberhalb des Perfusionskatheters geöffnet und über den Katheter 10 ml isotone NaCl-Lösung und 10 I.E./ml Heparin retrograd perfundiert. Anhand rascher Entfärbung der Abdominalorgane konnte die erfolgreiche Perfusion festgestellt werden. Im Anschluss erfolgte die Fixierung mit frisch angesetztem 3 % Paraformaldehyd in PBS mit konstantem Fluss von 40ml/3min. Die entnommenen, perfundierten Nieren wurden bis zur Paraffineinbettung in 70% Methanol bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.2.2.2 Einbettung in Paraffin

Nach abgeschlossener Fixierung, zur Vorbereitung der Paraffineinbettung, wurde das Nierengewebe schrittweise dehydriert. Dies erfolgte mit Hilfe von Gewebe-Einbettkassetten durch eine Reihe aufsteigenden Alkohols.

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

Im Anschluss an die Dehydrierung, wurden die Nieren zweimal für mindestens 24 Stunden in flüssiges, auf 60°C erwärmtes Paraffin eingebettet. Nachdem das Gewebe vollständig durchtränkt war, wurden die Präparate in Silikon-Kautschuk-Einbettformen gegeben, welche mit 60°C warmem Paraffin gefüllt wurden. Die Aushärtung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

### 2.2.2.3 Anfertigung der Paraffinschnitte und Entparaffinierung

Zur besseren Befestigung im Rotationsmikrotom und zur Erleichterung des Schneidens, wurden die Paraffinblöcke mit Hilfe eines erhitzten Metallspatels geformt und auf Holzblöcken fixiert. Am Rotationsmikrotom wurden Schnittserien von ca. 70-90 Schnitten mit einer Schnittdicke von 5 µm hergestellt. Jeder Einzelschnitt wurde auf ein 40°C warmes Wasserbad gelegt um sich zu entfalten. Anschließend wurden die Objektträger auf superfrost plus Objektträger aufgezogen und im Wärmeschrank bei 40°C für mindestens 12 Stunden getrocknet. Für die anschließende Färbung wurden die Schnitte in einer Reihe absteigenden Alkohols entparaffiniert.

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

### 2.2.2.4 Immunhistochemische Färbung

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis und die Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind (Romeis, 1989). Die indirekte Immunfluoreszenz erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird das Gewebe mit primären, unkonjugierten Antikörpern inkubiert. Diese epitopspezifischen Antikörper binden an das gesuchte Antigen im Gewebeschnitt. Anschließend werden die Schnitte gewaschen und mit einem sekundären Antikörper inkubiert. Die sekundären Antikörper tragen ein Fluorochrom und sind gegen den F<sub>c</sub>-Teil des primären, unmarkierten Antikörpers gerichtet. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops und Licht entsprechender

Wellenlänge, können dann die Fluorophore angeregt werden und so die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht werden.

### **Protokoll:**

#### **Primäre Antikörper:**

Chicken-Anti-Renin-IgG 1:400 verdünnt mit 10% HS in PBS-Otto/1% BSA

Mouse-Anti-Glattmuskel-IgG, 1:50 verdünnt mit 10% HS in PBS-Otto/1% BSA

#### **Sekundäre Antikörper:**

Cy2-konjugierter Donkey-Anti-Chicken-IgY, 1:400 verdünnt mit PBS-Otto/1% BSA

Rhodamin-TRITC-konjugierter Donkey-Anti-Mouse-IgG, 1:400 verdünnt mit PBS-Otto/1% BSA

#### **Tag 1:**

- Waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer auf dem Schüttler: 3 x 5 min
- Herstellen der Stammlösung PBS-Otto/1% BSA
- Herstellung der Blockierlösung: 10% HS in PBS-Otto/1% BSA
- Auftragen der Blockierlösung und 20 min auf dem Rüttler bei RT inkubieren
- Absaugen der Blockierlösung
- Aufpipettieren der Primäantikörper und Inkubation über Nacht bei 4°C

#### **Tag 2:**

- Absaugen des primären Antikörpers
- Waschen der Präparate mit der Stammlösung PBS-Otto/1% BSA auf dem Schüttler 3 x 5 min
- Absaugen der Stammlösung
- Vortexen und 10 min Zentrifugation der sekundären Antikörper um das Aufbringen von Kristallen zu vermeiden.
- Aufpipettieren der Sekundäantikörper und Inkubation bei Raumtemperatur für 90 min (Die mit der Fluoreszenzeigenschaft verbundene Lichtempfindlichkeit der sekundären Antikörper erfordert einen größtmöglichen Lichtausschluss.)
- Waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer auf dem Schüttler 3 x 10 min
- Eindeckeln der Objektträger mit Dako Glycergel Mounting Medium

- Gekühlte Lagerung unter Lichtausschluss

### 2.2.3 Dreidimensionale Rekonstruktion

#### 2.2.3.1 Mikroskopie und Digitalisierung

Zur Anfertigung der 3D-Rekonstruktionen wurden die vorbehandelten histologischen Serienschnitte verwendet. Aufnahme und Digitalisierung erfolgten mit Hilfe eines Axiovert 200M Mikroskops mit motorisierter Objektaufgabe und angeschlossener Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCamMRm) sowie der Software AxioVision LE Rel.4.5. von Zeiss.

Die histologischen Schnitte wurden mit 100facher Vergrößerung aufgenommen. Dabei wurden jeweils mehrere Aufnahmen angefertigt und mittels AxioVision LE Rel.4.5. mit einer Überlappung von 15% zusammengefügt (Stitching). Die Fluorophore der Sekundären Antikörper sind bei unterschiedlicher Wellenlänge anregbar. Für das Glattmuskelaktin wurde ein Cy2 Filter verwendet, mit einer Wellenlänge von 450-490nm was eine Emission von 533-558nm bewirkt und das Glattmuskelaktin in grün sichtbar macht. Das Renin erscheint rot bei einer Emission von 570-640nm unter Anregung mit einer Wellenlänge von 533-558nm mittels eines TRITC-Filters. Um aus beiden Kanälen eine einzige Bilddatei (Overlay-Bild) zu erzeugen wurde dem Renin-Bild ein roter, dem Glattmuskelaktin-Bild ein grüner Farbanteil zugewiesen. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Bilddateien auf 8 Bit konvertiert und als TIFF-Format gespeichert.

#### 2.2.3.2 Datenaufbereitung mittels ImageJ

Ergebnis des Sticking der einzelnen Bilder sind Mosaikaufnahmen unterschiedlicher Länge und Breite. Um Dateien in das Rekonstruktionsprogramm Amira überführen zu können ist jedoch eine einheitliche Größe erforderlich. Auf Grund dessen wurde mittels Photo Shop CS4 ein Bild größten Formats erstellt und als TIF-Datei zu den Serienbildern gespeichert. Diesem wurden nachfolgend sämtliche Serienbilder durch das Anfügen schwarzer Ränder angeglichen. Diese wurden dann mit Hilfe des Bildanalyseprogramms ImageJ zu einem Bildstapel (Stack) vereinigt:



- Öffnen aller Einzelbilder
- Plugins
- Stacks
- Stack Builder
- Anschließend wurde die nicht weiter benötigte Formatvorlage entfernt und der Stack als Image Sequence gespeichert.

### 2.2.3.3 3D-Rekonstruktionen

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Daten in die Amira 5.4.1 Visualization Software auf eine Grafik-Workstation importiert. Um eine korrekte Skalierung der Daten zu erreichen, musste zunächst das Verhältnis von Pixelgröße zu  $\mu\text{m}$  berücksichtigt werden. Dabei handelt es sich um einen Objektiv und Kamera- abhängigen Wert (bei einer Verwendung des 10 x Objektivs: 1 Pixel = 1 x 1  $\mu\text{m}$ ). Bezogen auf die maximalen Abmessungen des Bildstapels (Länge x und Breite y), die Gesamtzahl der Schnitte und der Schnittdicke (z) wurde die Boundingbox definiert, die die maximalen Abmessungen des Datensatzes in jeder Ebene beschreibt. Im dreidimensionalen Raum wird der Begriff Pixel durch den Begriff Voxel ersetzt, der eine quaderförmige Zelle darstellt. Die dritte Dimension entspricht der Schnittdicke. Ein Voxel entspricht somit 1 x 1 x 5 $\mu\text{m}$ . Der RGB-Bildstapel, welcher den roten, grünen und blauen Kanal enthält, wurde wieder in seine einzelnen monochromen Kanäle aufgetrennt.

#### Farbkanaltrennung

- COMPUTE
- CHANNEL WORKS
- INPUT 1 CHANNEL 1, speichern als Aktin-Stapel
- INPUT 2 CHANNEL 2, speichern als Renin-Stapel

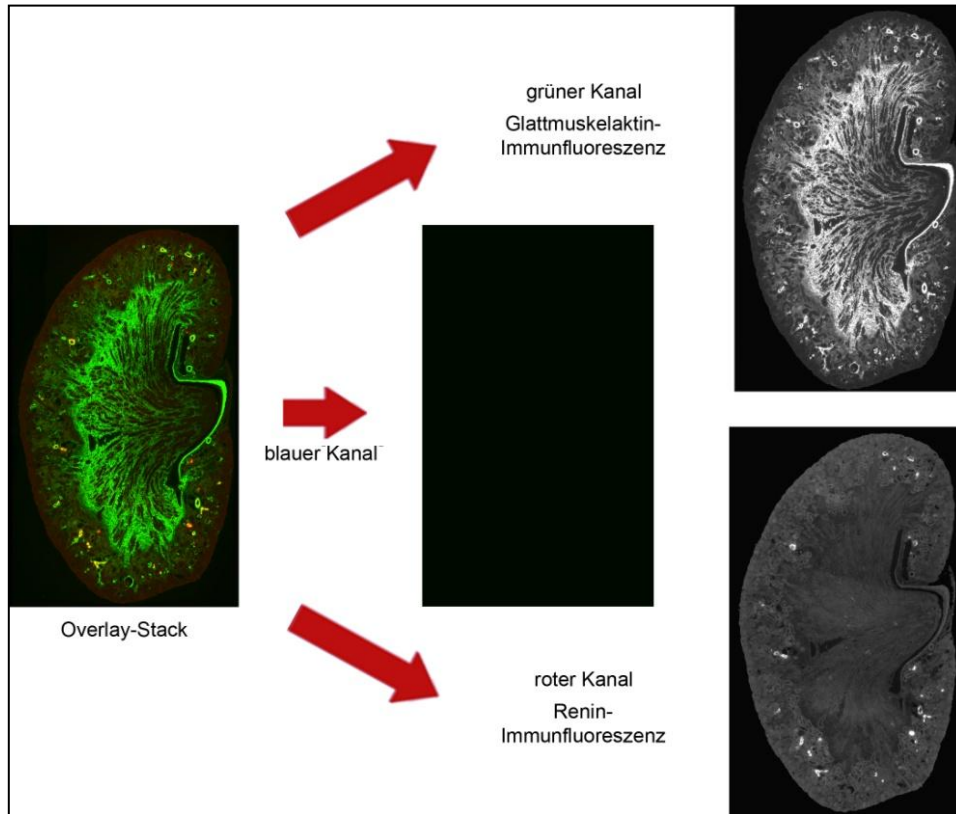


Abbildung 2.1: Farbkantentrennung (Abbildung nach Machura, 2008)

Dies ist erforderlich damit die Rekonstruktionssoftware die Fluoreszenzmarkierungen, eines jeden Bildes, anhand der Grauwerte der Voxel erkennt und um später eine separate Datensegmentierung vornehmen zu können.

### Aligning

Die in unterschiedlicher Ausrichtung aufgenommenen Serienschritte müssen deckungsgleich ausgerichtet werden um eine vollständig ausgerichtete Niere zu erhalten. Dies geschah über Verschiebe- und Rotationsbewegungen, womit jeweils zwei Schnitte, bzw. ein Schnitt und der bereits ausgerichtete Stapel, möglichst exakt übereinander gelegt wurden. Als Leitstruktur dafür dienten die Immunreaktionen des Glattmuskelaktins, da diese regelmäßig und als zusammenhängendes Gebilde vorliegen. Anhand des fertigen Aktin-Stapels wurden anschließend die Renin-Serienschritte auf dieselbe Position gedreht. Dies führt zu einer höheren Deckungsgleichheit der Renin-Schnitte und ist erforderlich um ein späteres zusammenfügen der Daten zu ermöglichen.

- COMPUTE
- ALIGN SLICES
- EDIT

- ALIGNING (automatisch und manuell)
- RESAMPLE

### Datensegmentierung

Innerhalb der Datensegmentierung werden die darzustellenden Strukturen, arterielle Gefäße und Renin-Signale, durch verschiedene Verfahren markiert. Die Markierungen müssen einem definierten Material zugeordnet werden. Anhand aller Markierungen eines Materials, kann dann die Oberfläche dieser dreidimensionalen Struktur berechnet werden.

Einleitung der Datensegmentation:

- LABELLING
- LABEL FIELD

Für das Labeling werden folgende Segmentierungstools verwendet. Zusammenstellung der wichtigsten Werkzeuge:

- BRUSH: Fluoreszenzsignale können von Hand markiert werden.
- MAGIC WAND: Markierung von Fluoreszenzsignalen mittels Festlegung einer Grauwert-Schwelle. Es werden nur die Signale markiert, die mit dem markierten Voxel in Verbindung stehen. Die Grauwerte liegen auf einer Skala von 0 = schwarz bis 255 = weiß.
- FILL HOLES: Nicht markierte Areale innerhalb von Materialien werden gefüllt.
- REMOVE ISLAND: Kleine Anteile von Materialien, die in Kontakt zum übrigen Material stehen, werden automatisch entfernt.
- SMOOTH LABELS: Kantige Ränder des ausgewählten Materials werden entfernt.
- THRESHOLD: Alle Grauwerte eines definierten Grauwertes werden markiert. THRESHOLD markiert dabei alle Grauwerte des ausgewählten Schnitts.
- INTERPOLATE: Ermöglicht das Berechnen einer fehlenden Struktur. Durch das Markieren der Struktur auf dem vorhergehenden sowie auf dem nachfolgenden Schnitt kann sie auf der gewünschten Ebene berechnet werden.
- WRAP: Durch Markierung von Anfang, Mitte und Ende einer Zielstruktur können Zwischenschnitte zu einer annähernd kugelförmigen Gestalt ergänzt werden.

Die Segmentierungsfunktionen können sowohl auf einen aktuellen (current slice) wie auch auf alle Schnitte (all slices) gemeinsam angewendet werden. Anhand der Markierung der Aktin-Immunsignale

wurde die Oberfläche eines Teils des Gefäßsystems berechnet. Mit Hilfe des Renin-Materials, konnte die Menge der Renin bildenden Zellen sowie deren räumliche Lokalisation dargestellt werden. Die Kapsel und Glomeruli konnten auf Grund der Eigenfluoreszenz der Präparate markiert werden. Die Darstellung der Kapsel und Glomeruli hat exemplarischen Charakter, sie vermittelt lediglich räumliche Lokalisation und annäherungsweise die Größe der Strukturen.

### Oberflächengenerierung

Die 3D-Modelle wurden mit Hilfe der Label-Dateien erstellt. Dabei wurde aus jedem Material eine Oberfläche berechnet. Aus den einzelnen Oberflächen kann dann ein gemeinsames 3D-Modell erstellt werden.

- SURFACE GEN: Berechnung der jeweiligen Oberfläche.
- SURFACE VIEW: Visualisieren der berechneten Oberfläche.

Mit folgenden Werkzeugen kann das 3D-Modell unter PROPERTIES bearbeitet werden:

- SURFACE-EDITOR: Entfernung nicht benötigter Ausschnitte.
- SIMPLIFIER: Reduktion der Polygonzahl um die Datenmenge zu reduzieren.
- PARAMETER-EDITOR: Bestimmung der Farbe für die jeweilige Oberfläche.
- COMPUTE -> SMOOTH SURFACE: Glättung der ausgewählten Oberfläche.

Im Ergebnis können alle Oberflächen einzeln oder als Gesamtmodell betrachtet werden. Die Oberflächen können rotiert und räumlich analysiert werden. Der Datensatz enthält außerdem die Schnittbilder, welche ebenfalls angezeigt werden können. Darüber hinaus können Strecken und Winkel vermessen, sowie Oberflächen und Volumina des Modells berechnet werden.

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 Isolierung der Total-RNA

Die Isolierung der Total-RNA erfolgte mit TRIzol-Reagenz gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Bei sämtlichen Arbeitsschritten wurden Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet, um Verunreinigungen mit RNasen zu vermeiden. Die verwendeten gläsernen Hilfsmittel wurden bei 180°C sterilisiert. Sämtliche Puffer und Lösungen

wurden mit Diethylen-pyrocyanat (DEPC)-behandeltem Wasser hergestellt. Während aller im Folgenden genannten Arbeitsschritte wurden mit Eis gekühlt.

Protokoll zur RNA-Isolation mittels TRIzol-Reagenz:

- 1 ml TRIzol-Reagenz für ½ Mäuseniere in Sarstedt-Tubes auf Eis vorlegen.
- Überführen der Nieren aus dem flüssigen Stickstoff in das Röhrchen und ca. 30s homogenisieren.
- Mix in 2 ml Eppendorf-Tubes umfüllen und 5 min bei RT stehen lassen. Die Proteine denaturieren in Phenol.
- 200 µl Chloroform zugeben und schütteln.
- 20 min bei 4°C bei 12000 rpm zentrifugieren. Das Homogenisat trennt sich in 3 Phasen.
- Ca. 500µl wässrigen Überstand in 1,5 ml Eppendorf-Tube überführen, ohne Interphase (unten rote Phenolphase, dazwischen Interphase mit hydrophilen Proteinen)
- Wässrige Phase 1:1 (500µl) mit Isopropanol mischen und kräftig schütteln.
- 10 min bei RT inkubieren zum Ausfällen der RNA.
- 10 min bei 4°C bei 12000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Pellet in 1 ml 75% Ethanol aufnehmen.
- 5 min bei 4°C bei 7500 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Pellet 10 min bei RT trocknen und je nach Größe in 50-300 µl RNase-freiem Wasser lösen.
- Resuspendieren im Schüttler bei 65°C für max. 2 min.
- Lagerung bei -80°C.

Quantifiziert wurde die isolierte RNA mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bis 280 nm. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm wurde die Qualität der isolierten RNA ermittelt. Für die Versuche wurde RNA mit einem Quotienten zwischen 1,2 und 2 verwendet.

### 2.2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Mit Hilfe reverser Transkription (RT) kann die isolierte RNA in copy RNA (cDNA) übersetzt werden. In dieser Form kann die ursprünglich auf der RNA vorhandene Information stabiler konserviert werden. Als Primer wurden Oligo(dT)<sub>15</sub>-Ketten verwendet, um hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren. Die gewonnene cDNA wurde später als Template für die quantitative PCR verwendet.

<b>10 µl Ansatz</b>	
<b>1 µg</b>	Gesamt RNA
<b>1 µl</b>	Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer (0,5 µg/µl)
<b>Add</b>	DEPEC-H <sub>2</sub> O

Das Reaktionsgemisch (10 µl) wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und danach auf Eis gestellt. Anschließend wurde folgender Mix hinzugegeben:

<b>Mix</b>	
<b>1 µg</b>	M-MLV Reverse Transkriptase (100 U)
<b>4 µl</b>	dNTPs (2,5 mM)
<b>4 µl</b>	Puffer (5 x first strand buffer)
<b>3 µl</b>	DEPEC-H <sub>2</sub> O

Die cDNA-Synthese erfolgte über 1 h bei 37°C. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz für 2 min auf 94°C erhitzt um die Inaktivierung des Enzyms zu erreichen. Für die quantitative PCR wurde die erhaltene cDNA mit 20 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

### 2.2.4.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) mit dem Lightcycler 480 SYBR GREEN Master PCR Kit von Roche an einem Roche Lightcycler 480 durchgeführt. Bei Durchführung einer quantitativen

## Material und Methoden

Polymerasekettenreaktion wird nach jedem PCR-Zyklus die DNA-Menge photometrisch ermittelt. Dadurch lässt sich der exponentielle Verlauf der Reaktion in Echtzeit verfolgen. Die Messung der DNA-Menge erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green. SYBR Green besitzt eine hohe Affinität gegenüber der kleinen Furche doppelsträngiger DNA auf. Dort gebunden fluoresziert es 1000-fach stärker als ungebundenes SYBR Green. Die Intensität der emittierten Signale ist dabei proportional zur entstandenen DNA-Menge.

---

<b>10 µl Reaktionsansatz</b>			
<b>5 µl</b>		Lightcycler 480® Green Master	
<b>0,5 µl</b>		sense Primer (10 pmol/µl)	
<b>0,5 µl</b>		antisens Primer (10 pmol/µl)	
<b>3 µl</b>		dd H <sub>2</sub> O	
<b>1 µl</b>		cDNA	

---

<b>Amplifizierungsprotokoll</b>			
<b>Zyklen</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Phase</b>
<b>1</b>	15 min	95°C	Aktivierung
<b>40</b>	15 s	95°C	Denaturierung
<b>40</b>	20 s	58°C	Annealing
<b>40</b>	20 s	72°C	Elongation

---

Nach Beendigung des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der DNA analysiert. Dabei wurde die DNA um 0,1°C/s von 60°C auf 95°C erhitzt. Über die Zeit des Erhitzens wurde die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Housekeeper wurde GAPDH verwendet. Den Renin-mRNA-Gehalt der Niere konnte durch die Gesamtausbeute an extrahierter RNA und durch den Renin-mRNA-Level berechnet werden.

### 3. Ergebnisse

Es wurden die Nieren von vier unterschiedlich behandelten Gruppen von jeweils vier adulten Wild-Typ Mäusen untersucht, wobei zwischen weiblichen und männlichen Tieren unterschieden wurde. Eine Vergleichsgruppe blieb unbehandelt. Die Nieren folgender Versuchsgruppen wurden unterschieden:

<b>Geschlecht</b>	<b>Behandlung</b>
Männlich	physiologische Ernährung, 0,4 % NaCl (normal Salt (NS))
Männlich	physiologische Ernährung und Behandlung mit dem selektiven COX-2-Blocker SC-236
Männlich	Ernährung mit Nidrigsalzfutter, 0,02% NaCl und Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril (RAAS-Stimulaton)
Männlich	Ernährung mit Nidrigsalzfutter und Behandlung mit Enalapril und SC-236 (RAAS-Stimulation und COX-2-Blockade)
Weiblich	Ernährung mit Nidrigsalzfutter und Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril (RAAS-Stimulation)
Weiblich	Ernährung mit Nidrigsalzfutter und Behandlung mit Enalapril und SC-236 (RAAS-Stimulation und COX-2-Blockade)

Anhand der folgenden Abbildungen soll die Verteilung der Renin bildenden Zellen innerhalb des renalen arteriellen Gefäßsystems der jeweils unterschiedlich behandelten Tiere gezeigt werden. Dies erfolgt anhand von histologisch-mikroskopischen Aufnahmen und 3D-Rekonstruktionen, welche aus histologischen Serienschritten gewonnen und mit dem 3D-Rekonstruktionsprogramm Amira hergestellt wurden. Außerdem wird die quantitative Reninexpression anhand der mRNA- und Plasmareninkonzentration dargestellt.



## Ergebnisse

Die histologisch-mikroskopischen Abbildungen zeigen je eine Übersichtsaufnahme und eine Detailaufnahme, welche ein Glomerulus mit afferenter und efferenter Arteriole zeigt. Jede Aufnahme zeigt die Expression des Glattmuskelaktin und Renin sowie ein überlagertes Bild (Overlay). Die Renin- und Aktinsignale wurden mittels Antikörperfärbung gegen Glattmuskelaktin und Renin erreicht. Die Aufnahmen der beiden Kanäle sind in schwarz-weiß gehalten zur besseren Abgrenzbarkeit der jeweiligen Signale. Die Detailaufnahmen lassen eine genauere Zuordnung der Reninexpression innerhalb der afferenten und efferenten Arteriolen sowie im Bereich des Glomerulus zu.

Die 3D-Rekonstruktionen zeigen jeweils einen Teil eines arcuaten Seitenastes mit Aa. Interlobulares, afferenten Arteriolen und exemplarischen efferenten Arteriolen. Dies ermöglicht eine genauere räumliche Lagebestimmung, der ebenfalls abgebildeten reninbildenden Zellen, innerhalb des Gefäßsystems. Bei der Nierenkapsel wie auch den Glomeruli handelt es sich um eine schematische Darstellungen.

### 3.1. Reninexpressionsmuster der adulten Wildtyp-Maus

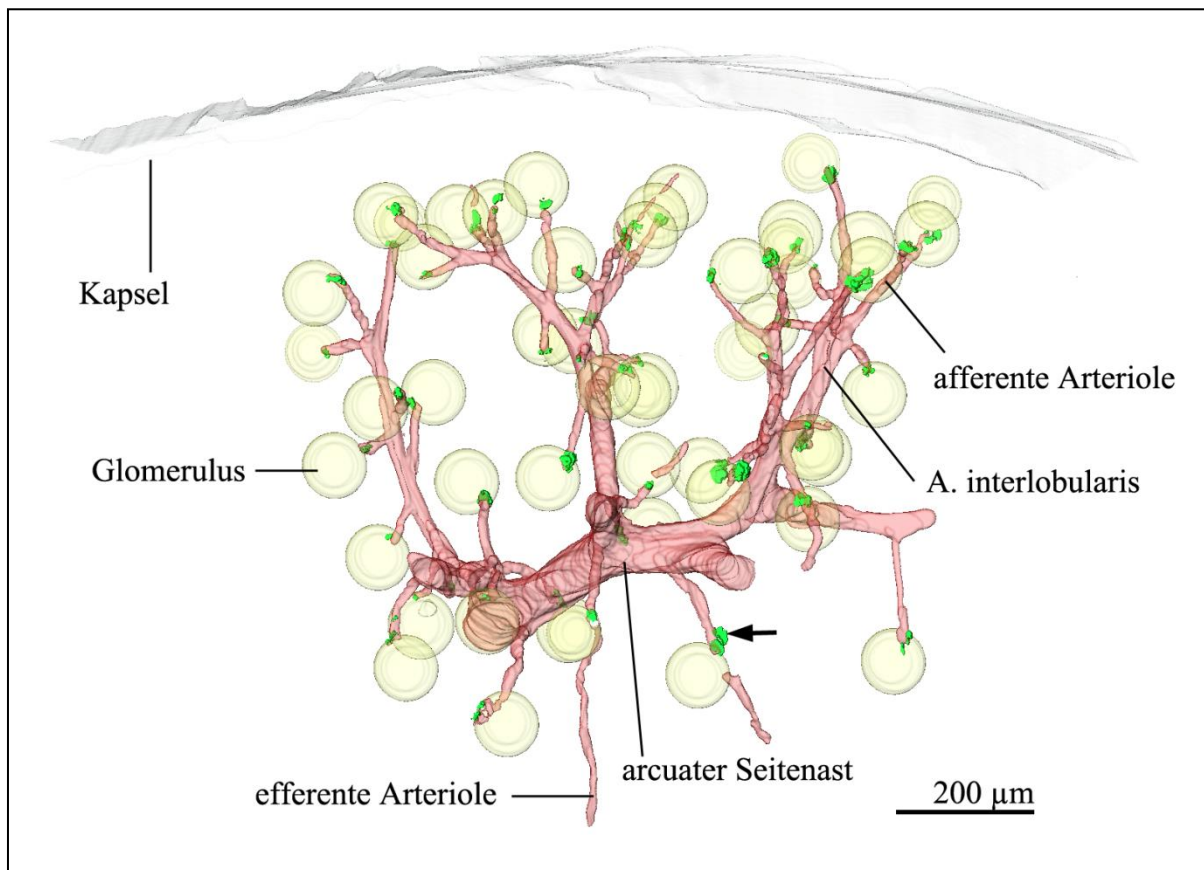


Abbildung 3.1: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von einem Teilstück eines arcuaten Seitenastes einer unbehandelten Wildtyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel (gelb). Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol.

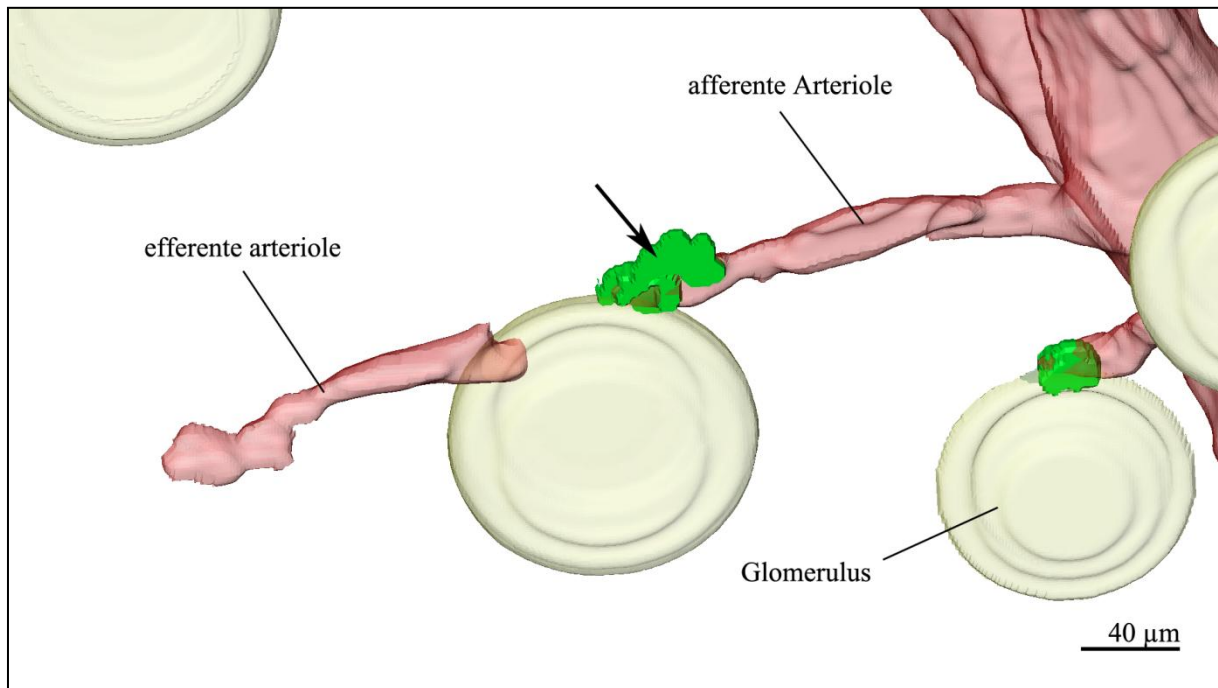
Bei Abbildung 3.1 handelt es sich um die Rekonstruktion eines Gefäßbaums einer unbehandelten Wildtyp-Maus bei normaler Salzzufuhr von 0,4 % NaCl. Die Rekonstruktion des Gefäßbaums der unbehandelten Wild-Typ-Maus erfolgte, um einen Referenzbaum zur vergleichenden Beurteilung der Gefäßbäume von Mäusen mit stimuliertem RAAS durch Nidrigsalzdiät und Verabreichung des ACE-Hemmers Enalapril, sowie der mit dem selektiven Cyclooxygenase 2 (COX-2) Blocker SC-236 behandelten Tiere zu erhalten. Sie zeigt die physiologisch typische Anordnung der Gefäße sowie Quantität und Lokalisation der Renin exprimierenden Zellen.

Im rekonstruierten Gefäßbaum finden sich am Gefäßpol aller Glomeruli Renin bildende Zellen (Abb. 3.1). Sie sind in den terminalen Segmenten der afferenten Arteriolen in unmittelbarer Nähe zum glomerulären Gefäßpol lokalisiert (in juxtaglomerulärer Position). Innerhalb des arcuaten Seitenastes,

## Ergebnisse

der interlobulären Arterien, der efferenten Arteriolen sowie in den Ursprüngen der afferenten Arteriolen sind keinerlei Reninsignale erkennbar.

Die typische Reninverteilung wird nochmals beispielhaft vergrößert in Abbildung 3.2 veranschaulicht.



**Abbildung 3.2:** 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität von zwei afferenten Arteriolen der unbehandelten Wildtyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol.

Die histologischen Übersichtsaufnahmen (Abb. 3.3) zeigen Reninsignale im terminalen Bereich afferenter Arteriolen sowie an den Gefäßpolen der Glomeruli. Auf den histologischen 2D-Aufnahmen ist nicht jedes Glomerulus mit einem Reninsignal vergesellschaftet. Ursächlich dafür ist, dass auf einem einzelnen histologischen Schnitt die terminalen Enden der afferenten Arteriolen am Gefäßpol nicht immer getroffen werden. Sie liegen eine Ebene höher oder tiefer und sind nur auf diesen Folgeschnitten nachweisbar. Das Glomerulus nimmt mehr Platz im dreidimensionalen Raum ein und ist somit auf mehr Schnitten als die Renin bildenden Zellen zu erkennen. Die arcuaten Seitenäste, die interlobularen Arterien sowie die efferenten Arteriolen weisen ausnahmslos keine Reninsignale auf (Abb. 3.3).

Die genaue Lage der Renin exprimierenden Zellen kann man anhand der histologischen Detailaufnahme (Abb. 3.4) beobachten. Die Media der afferenten Arteriole wird von Muskelzellen,

## Ergebnisse

welche Glattmuskelaktin exprimieren, gebildet. Am Gefäßpol werden die Glattmuskelzellen von Reninzellen abgelöst. Sie sind ebenfalls in der Media der terminalen afferenten Arteriole lokalisiert. Man kann sie anhand ihrer kubischen Form von den Glattmuskelzellen unterscheiden und sie exprimieren neben Glattmuskelaktin eindeutig Renin (Abb. 3.4).

## Ergebnisse

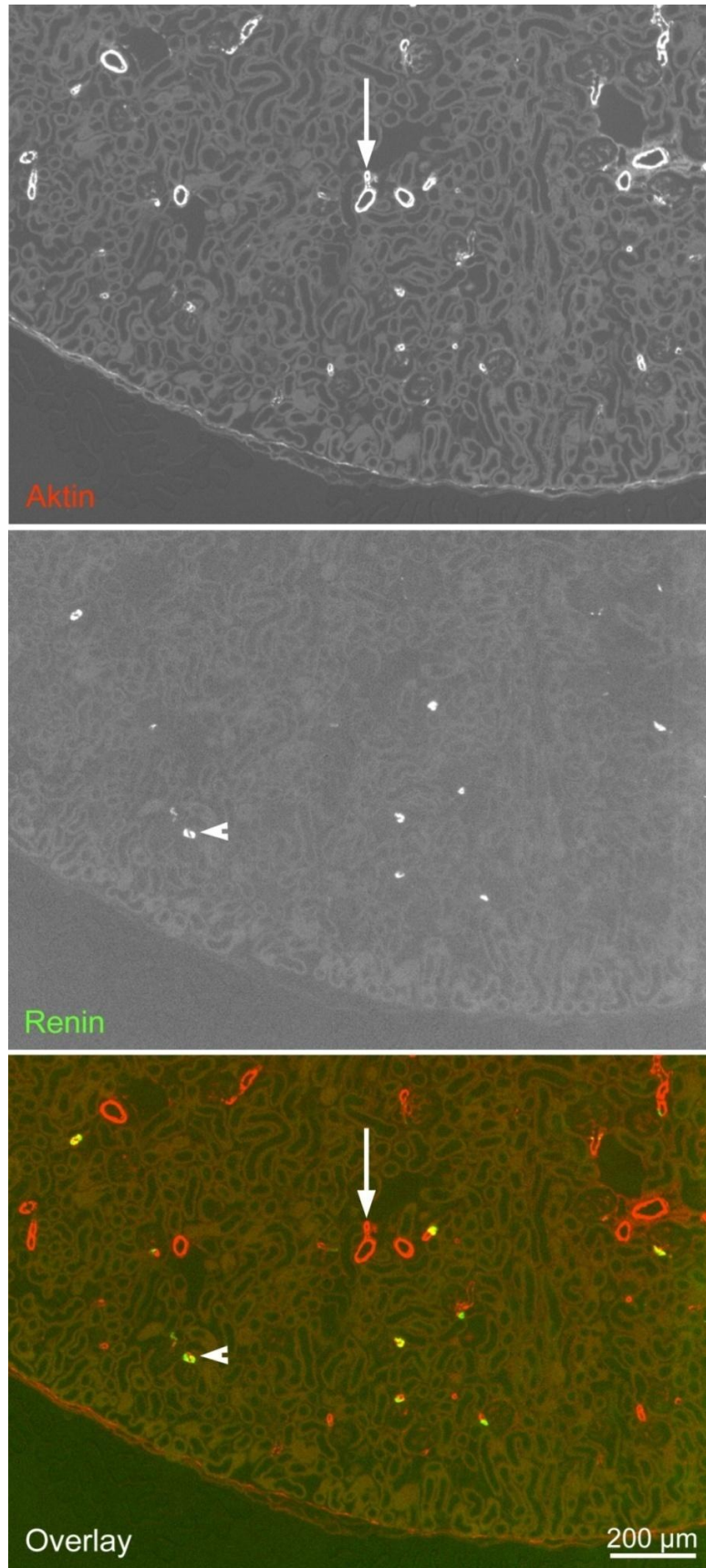


Abbildung 3.3: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unbehandelten Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün (kleiner Pfeil), die der Glattmuskelaktinzellen rot (großer Pfeil) dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem Vorliegen beider Proteine (Pfeilspitze).

## Ergebnisse

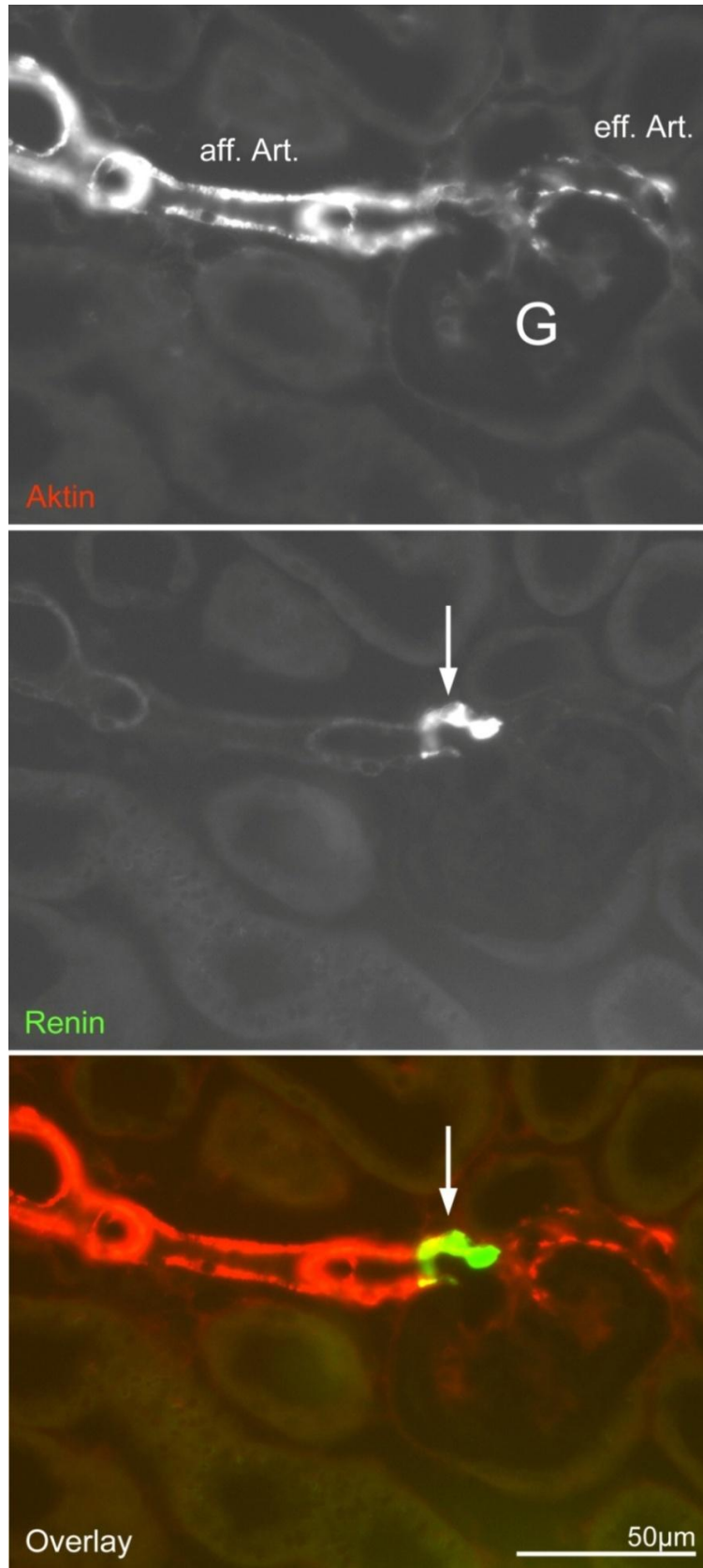


Abbildung 3.4: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unbehandelten Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün, die der Glattmuskelaktinzellen rot dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus der gleichzeitigen Expression beider Proteine. Pfeil: Reninsignal im Bereich des Gefäßpols. G: Glomerulus



### 3.2. Reninexpressionsmuster der adulten Wild-Typ Maus unter Behandlung mit dem COX-2 Inhibitor SC-236

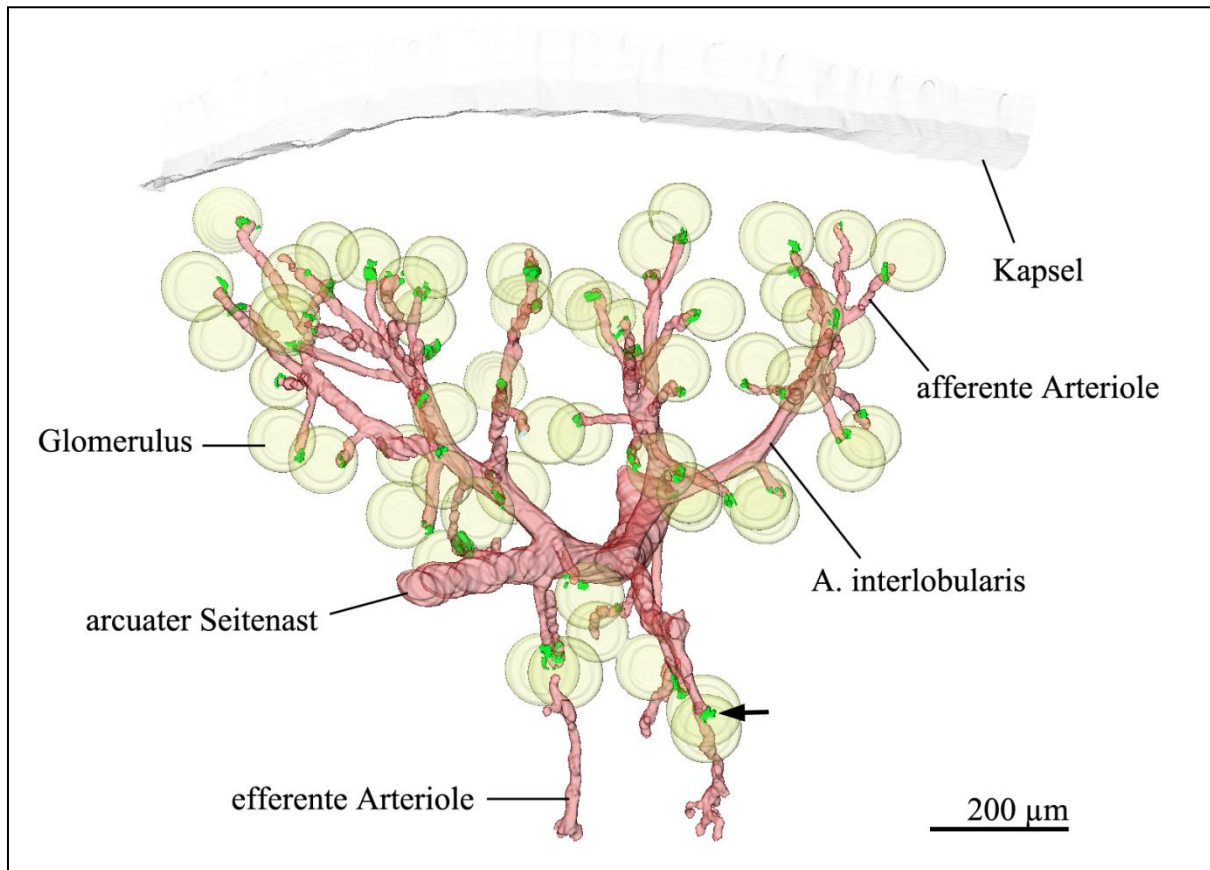


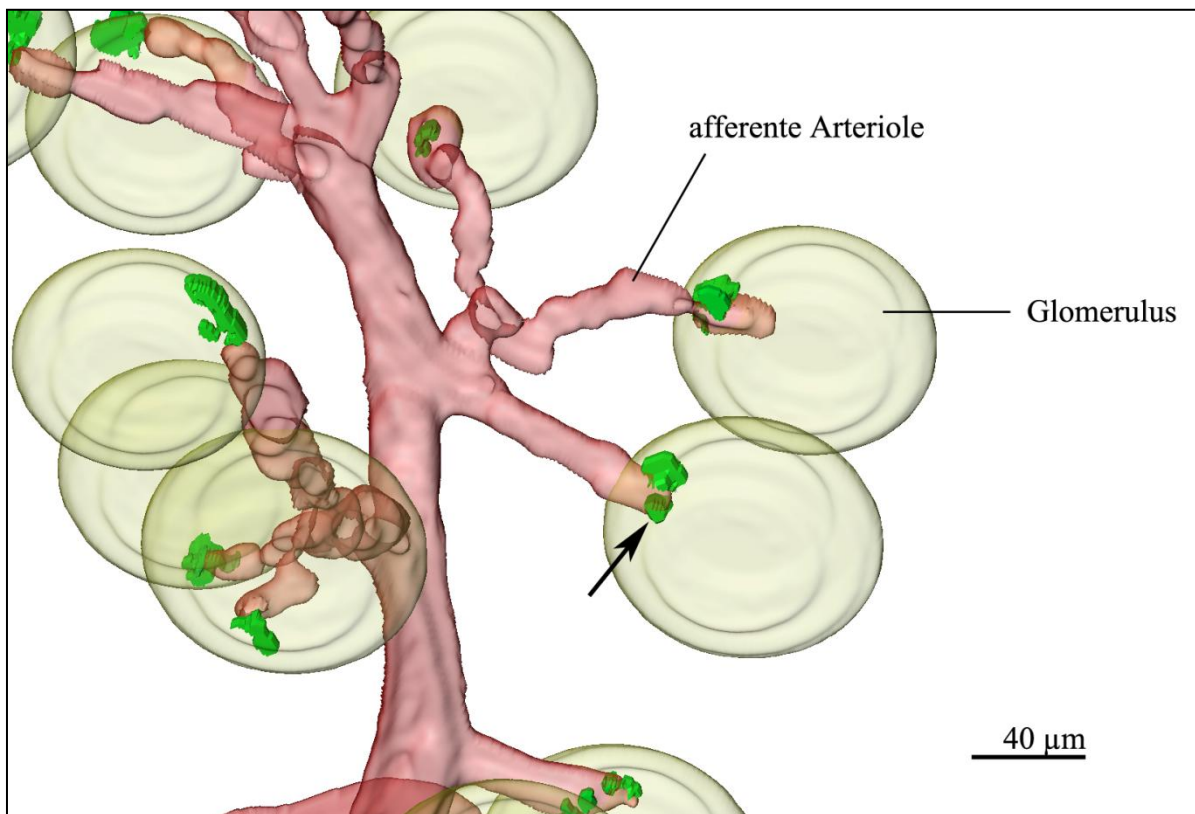
Abbildung 3.5: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer mit SC-236 behandelten Wild-Typ-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol.

Abbildung 3.5 zeigt die Rekonstruktion eines Gefäßbaums einer mit dem COX-2-Inhibitor SC-236 behandelten Wildtyp-Maus bei normaler Salzzufuhr von 0,4%.

Der Gefäßbaum der mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.5) stellt sich in jeweiligem Kaliber und Verzweigungen gleich dem der unbehandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.1) dar. Es finden sich im Bereich eines jeden Glomerulus Reninsignale. Anhand der Detailaufnahme in Abb. 3.6 kann man die Genaue Lage der Renin bildenden Zellen erkennen. Sie befinden sich innerhalb der terminalen afferenten Arteriole in juxtaglomerulärer Position. Der arcuate Seitenast, die interlobularen Arterien sowie die efferenten Arteriolen weisen keine Reninsignale auf. Die Verteilung und Quantität der

## Ergebnisse

Reninsignale der mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus entsprechen denen der unbehandelten Wildtyp-Maus.



**Abbildung 3.6:** 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von afferenten Arteriolen der mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol.

Bei Betrachtung der histologischen Übersichtsaufnahme der mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.7) zeigt sich ein mit dem unbehandelten Wildtyp (Abb. 3.3) vergleichbares Bild. Es kommen ein arcuater Seitenast sowie interlobuläre Arterien, afferente und efferente Arteriolen zur Darstellung. Reninsignale sind lediglich in den terminalen afferenten Arteriolen am Gefäßpol einiger Glomeruli zu erkennen. Dass nicht jedes Glomerulus mit einem Reninsignal vergesellschaftet ist, ist wiederum der Schnittführung geschuldet. Wie man anhand der 3D-Rekonstruktion erkennt (Abb. 3.5.), befinden sich in juxtaglomerulärer Position eines jeden Glomerulus Renin exprimierende Zellen. Diese sind jedoch auf den 2D-Aufnahmen nicht zu erkennen, da sie sich in einer Schicht über oder unterhalb der dargestellten Ebene befinden.



## Ergebnisse

Die histologische Detailaufnahme (Abb. 3.8) zeigt die exakte Lage der Renin exprimierenden Zellen. Diese finden sich wie bei der unbehandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.4) am terminalen Ende der afferenten Arteriole in juxtaglomerulärer Position. Anzahl, Form und Verteilung entsprechen der, des unbehandelten Wildtyps.

Anhand der histologisch-mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.7 und 3.8) sowie der 3D-Rekonstruktion (Abb. 3.5 und 3.6) lassen sich keine Unterschiede der Reninexpression der unbehandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.1-3.4) und der Reninexpression der mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus beobachten.

## Ergebnisse

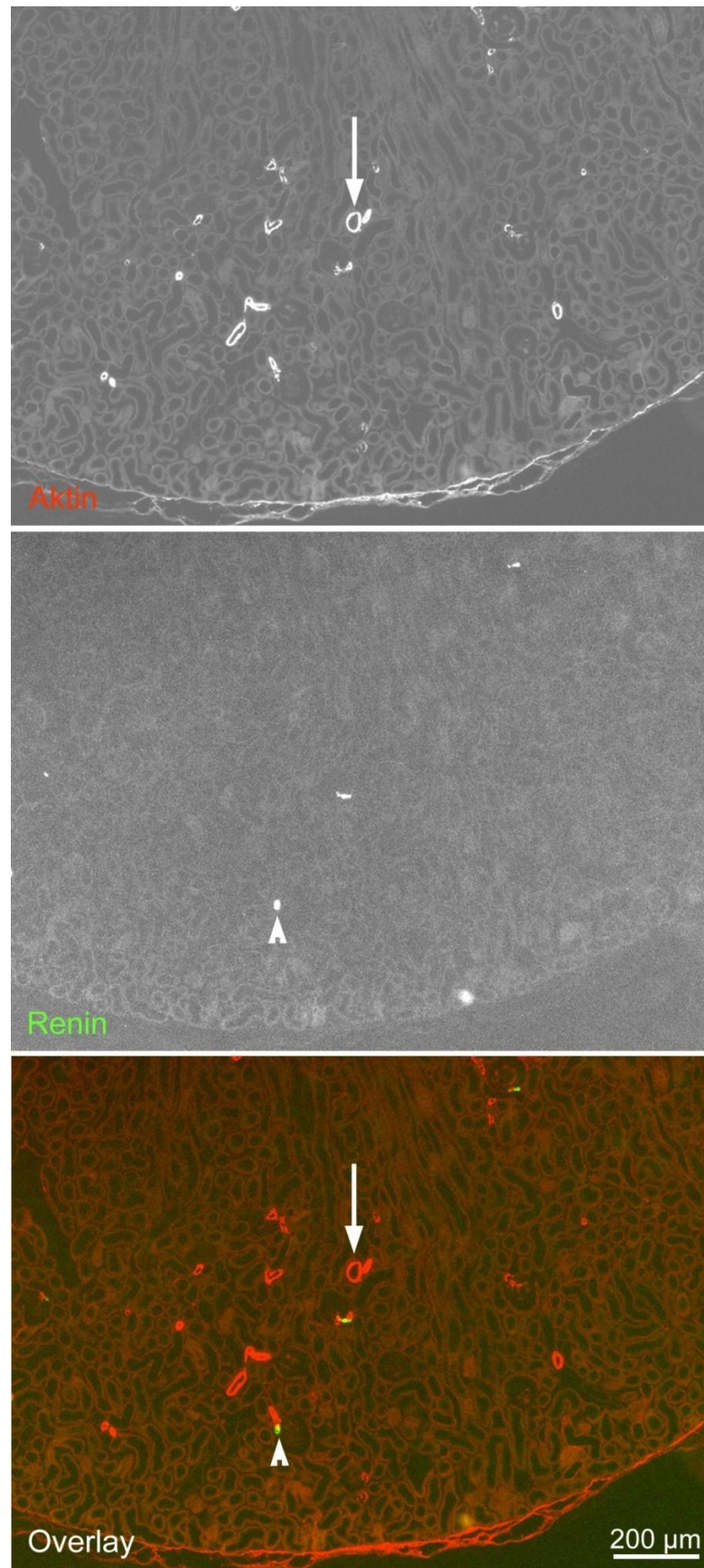


Abbildung 3.7: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün (kleiner Pfeil), die der Glattmuskelaktinzellen rot (großer Pfeil) dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine (Pfeilspitze).

## Ergebnisse

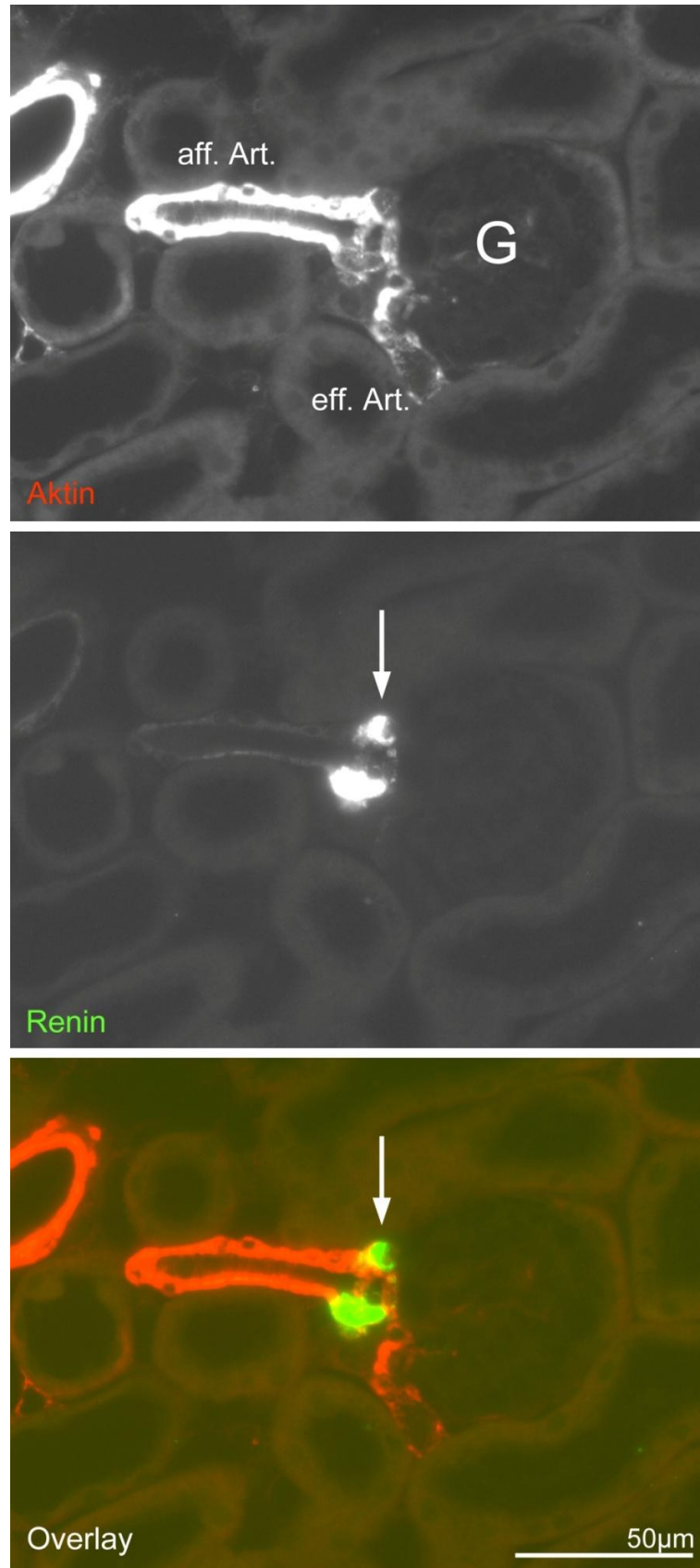


Abbildung 3.8: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün, die der Glattmuskelaktinzellen rot dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine. Pfeil: Reninsignal im Bereich des Gefäßpols. G: Glomerulus.

### 3.3. Reninexpressionsmuster der adulten Wildtyp-Maus nach Stimulation des RAAS mittels Nidrigsalzdiät und Gabe von Enalapril

Bei den Untersuchungen unter Stimulation des RAAS mittels Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe zeigten sich Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren. Daher wurde zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterschieden. Die weiblichen Tiere schienen eine deutlich stärkere Rekrutierung Renin bildender Zellen aufzuweisen als ihre männlichen Artgenossen.

#### 3.3.1. Reninexpressionsmuster der weiblichen adulten Wildtyp-Maus nach Stimulation des RAAS mittels Nidrigsalzdiät und Gabe von Enalapril

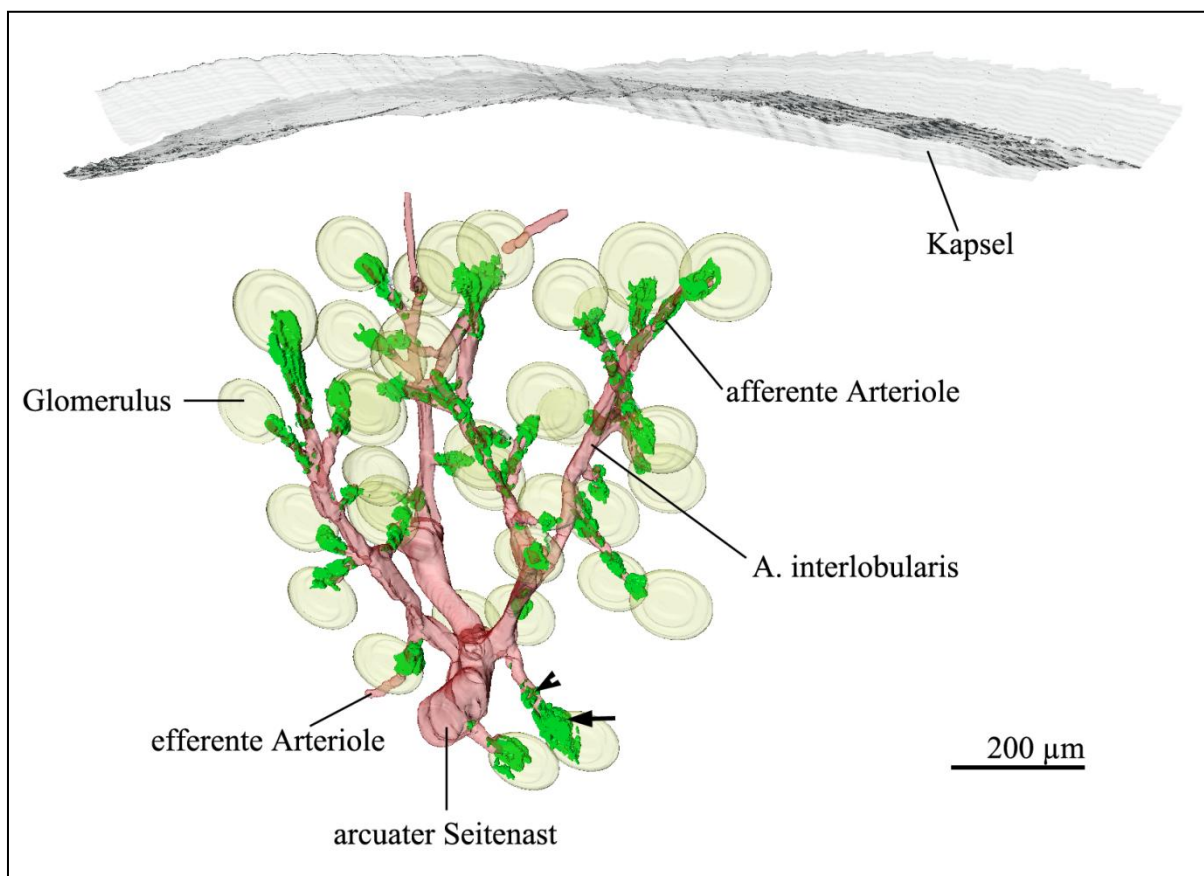


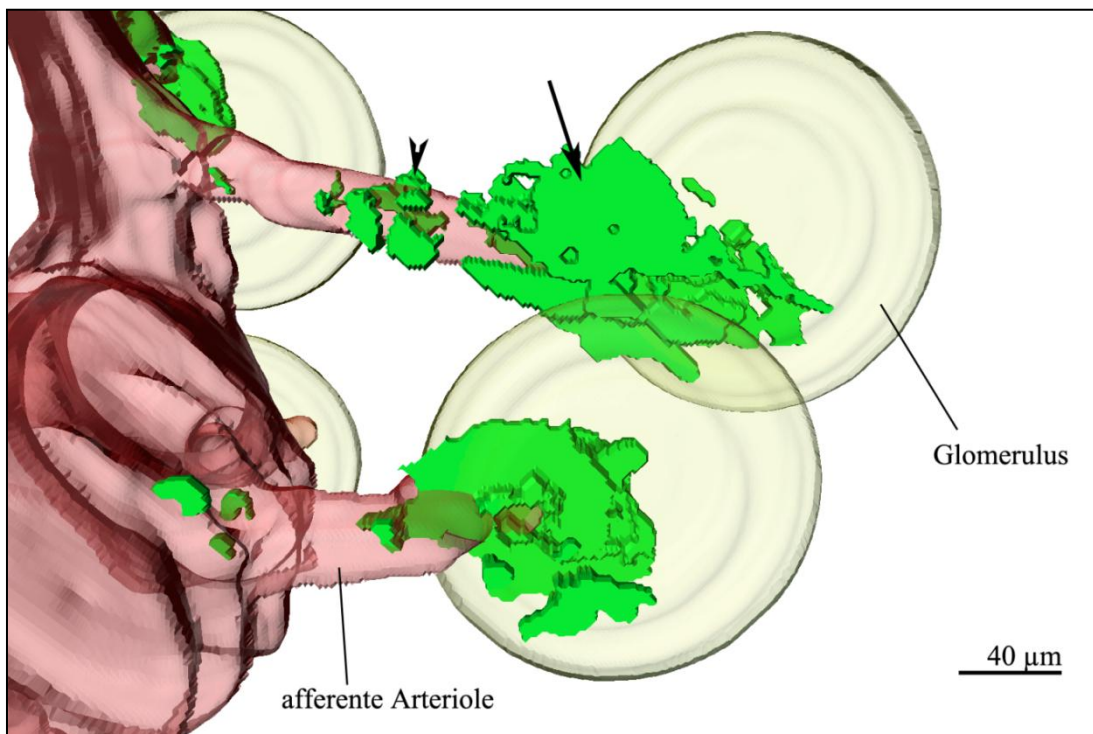
Abbildung 3.9: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel. Pfeilspitze: Reninsignal innerhalb einer afferenten Arteriole. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol.

## Ergebnisse

Abbildung 3.9 zeigt eine 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaums einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril behandelten weiblichen, adulten Wildtyp-Maus.

Betrachtet man die terminalen Enden der Arteriolen und den Gefäßpol der Glomeruli zeigt sich eine deutliche Zunahme Renin exprimierender Zellen (Pfeil). Es imponiert eine retrograde Rekrutierung sowie eine Mehrschichtigkeit der Renin exprimierenden Zellen in juxtaglomerulärer Position. Des Weiteren ist eine Rekrutierung Renin bildender Zellen entlang des kompletten Verlaufs der afferenten Arteriolen zu erkennen (Pfeilspitze). Innerhalb des arcuaten Seitenastes, der interlobularen Arterien sowie der efferenten Arteriolen sind keine Reninsignale auszumachen.

Der Gefäßbaum der Abbildung 3.9 stellt sich in jeweiligem Kaliber und Verzweigungen gleich dem der unbehandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.1) dar. Es findet sich im Vergleich zu der unbehandelten Wildtyp-Maus eine vermehrte Rekrutierung Renin exprimierender Zellen. Auffällig ist deren Vorliegen im kompletten Verlauf der afferenten Arteriolen (Pfeilspitze Abb.3.10) sowie deren Mehrschichtigkeit, Clusterbildung, an den Gefäßpolen (Pfeil Abb. 3.10).



**Abbildung 3.10: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von afferenten Arteriolen einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli. Pfeilspitze: Reninsignal entlang einer afferenten Arteriole. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol mit Clusterbildung.**

## Ergebnisse

Schon in der histologische Übersichtsaufnahme (Abb. 3.11) erkennt man eine vermehrte Reninexpression und die Renin bildenden Zellen nehmen eine größere Strecke entlang der afferenten Arteriolen ein. Innerhalb des arcuaten Seitenastes, der interlobuaren Arterien und der efferenten Arteriolen sind keine Reninsignale zu erkennen. Die genaue Lage der Renin exprimierenden Zellen zeigt die histologische Detailaufnahme (Abb. 3.12). Es finden sich Reninsignale im kompletten Verlauf der afferenten Arteriole. Besonders in absoluter Nähe zum Gefäßpol kann man eine retrograde Rekrutierung sowie Mehrschichtigkeit (Cluster: CLS: Hypertrophie am juxtaglomerulären Apparat) der Renin exprimierenden Zellen erkennen. Es lassen sich somit zwei Formen der Rekrutierung Renin bildender Zellen beobachten. Zum Einen entlang des Verlaufs der afferenten Arteriole, zum Anderen als Hypertrophie am juxtaglomerulären Apparat (CLS).

In Zusammenschau der histologisch-mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.11 und 3.12) und der 3D-Rekonstruktion (Abb. 3.9 und 3.10) kann eine vermehrte Rekrutierung Renin exprimierender Zellen im Vergleich mit der unbehandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.1-3.4) beobachtet werden.



## Ergebnisse

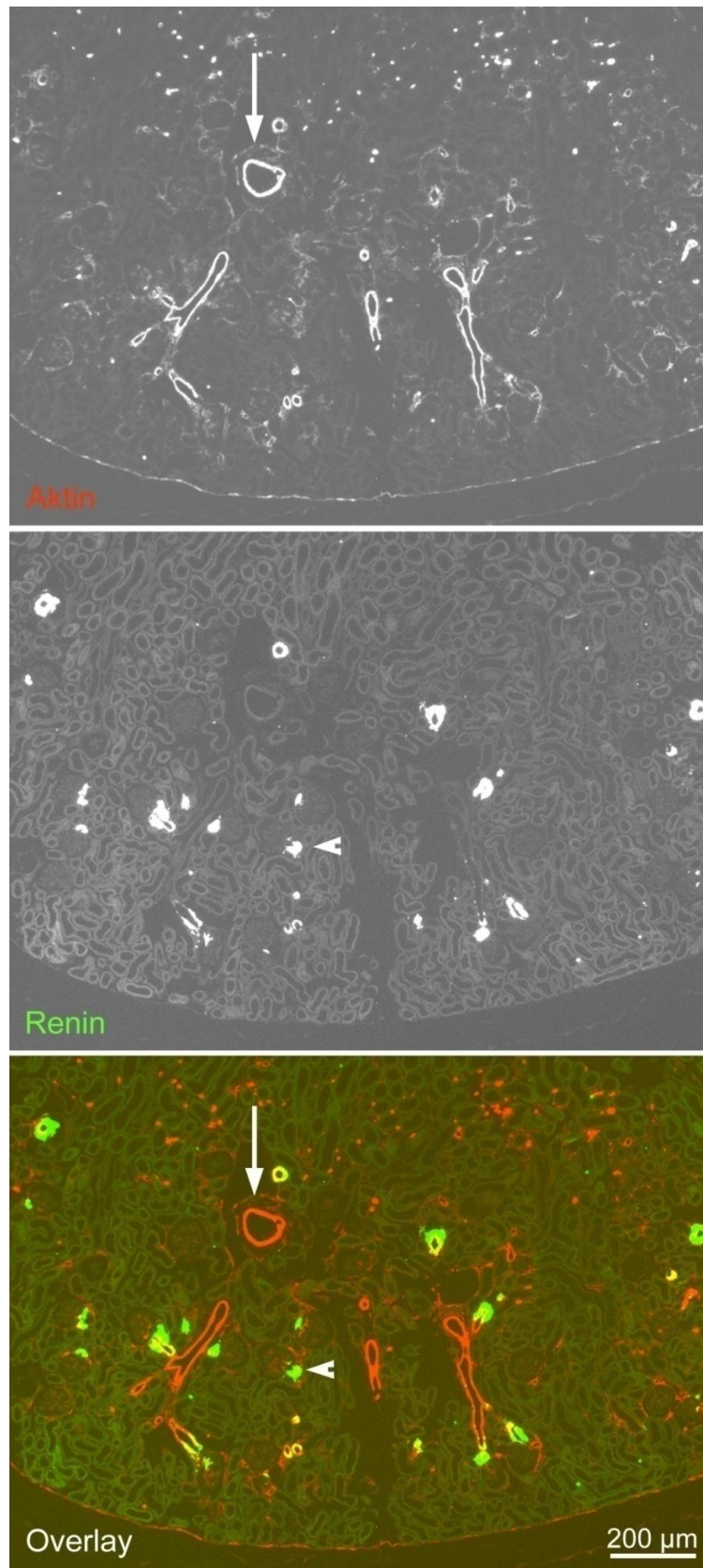


Abbildung 3.11: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün (Pfeilspitze), die der Glattmuskelaktinzellen rot (Pfeil) dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine.

## Ergebnisse

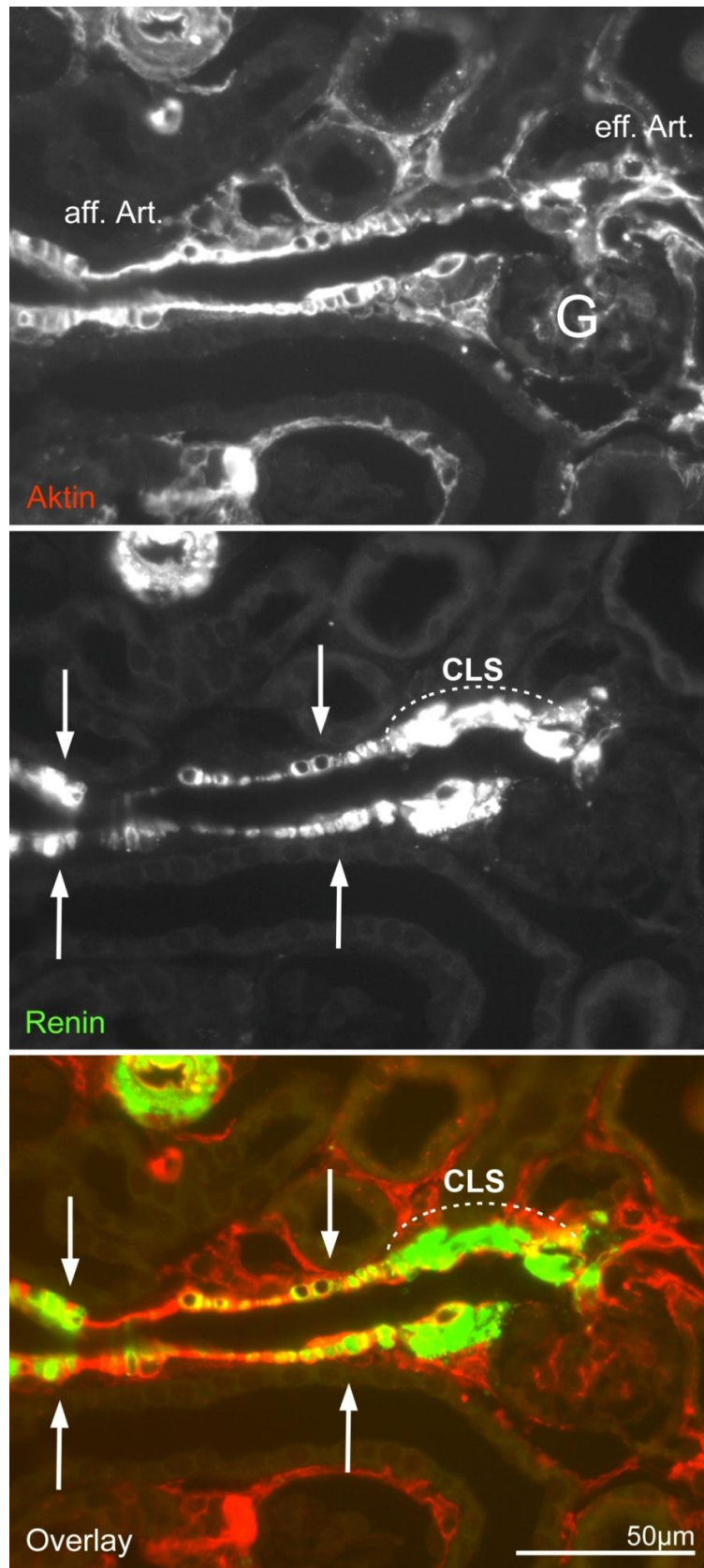
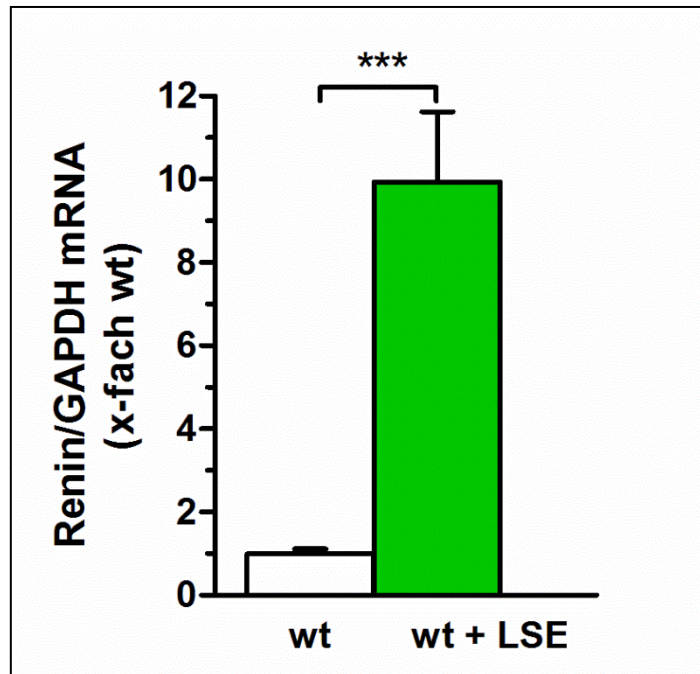


Abbildung 3.12: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün, die der Glattemkelaktinzellen rot dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine. Pfeil: Reninsignale entlang der afferenten Arteriole. CLS: Cluster am juxtaglomerulären Apparat



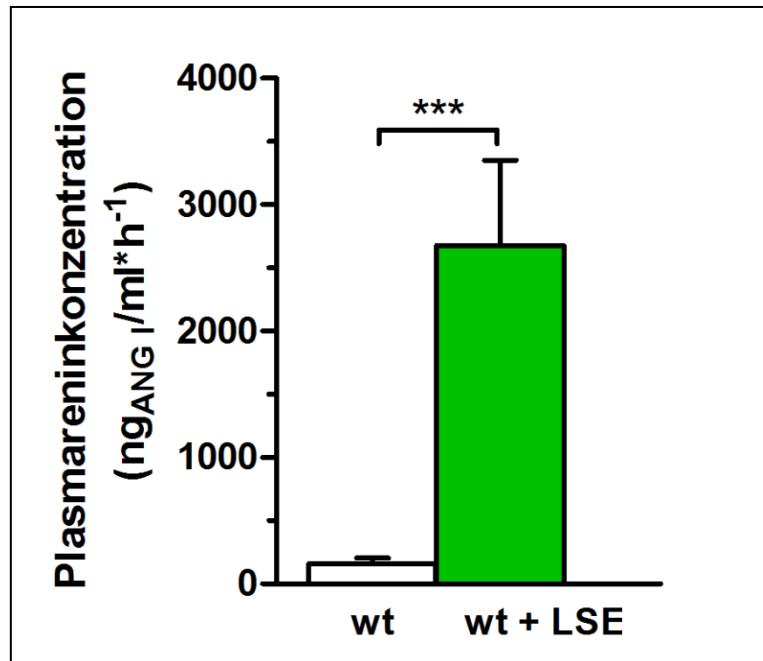
## Ergebnisse



3.13: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Level des Wildtyps und der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus; Normierung des Wildtyp-Werts auf eins.

Die erfassten mRNA-Level erlauben eine quantitative Aussage über die Reninexpression. Die in Abb. 3.13 gezeigten Werte stellen das x-fache des Wildtyps dar. Für die weibliche Wildtyp-Maus wurde der Wert 1 definiert. Die Reninexpression in der Niere der adulten mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten weiblichen Wildtyp-Maus ist im Vergleich zu einer unbehandelten Maus um das 10 fache erhöht.

## Ergebnisse



3.14: Graphische Gegenüberstellung der Plasmareninkonzentrationen des Wildtyps und der unter Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus.

Die erfassten Plasmareninkonzentrationen erlauben eine quantitative Aussage über die Reninausschüttung. Die Plasmareninkonzentration der adulten mit Niedrigsalzdiät und Enalapril behandelten weiblichen Wildtyp-Maus ist im Vergleich zu der weiblichen Wildtyp-Maus um das 17 fache erhöht.

### 3.3.2. Reninexpressionsmuster der männlichen adulten Wildtyp Maus nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Gabe von Enalapril

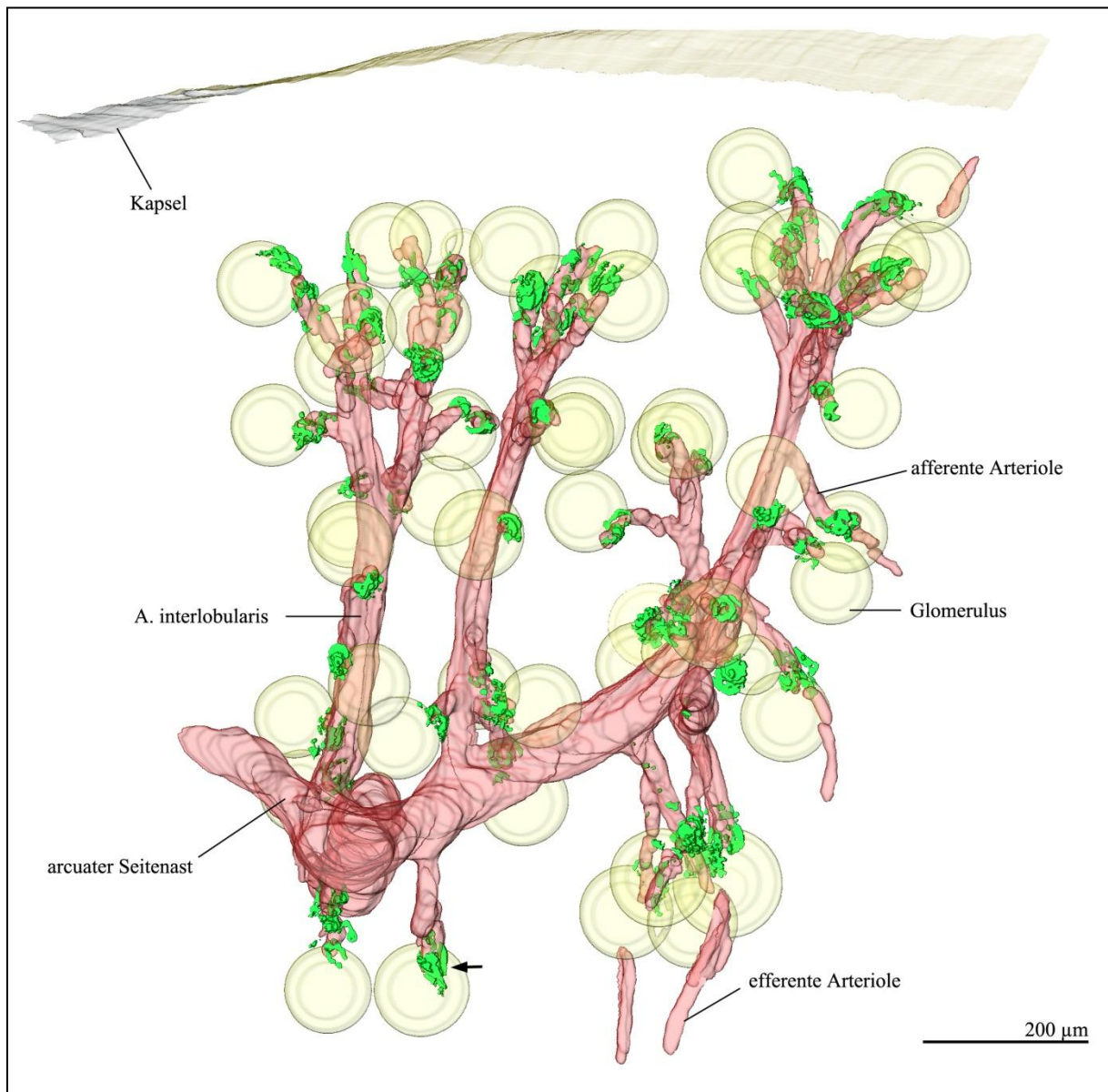


Abbildung 3.15: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wild-Typ-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol.

Abbildung 3.15 zeigt eine 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaums einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril behandelten männlichen Wildtyp-Maus. Der Gefäßbaum stellt sich in jeweiligem Kaliber und Verzweigungen gleich dem der unbehandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.1) dar.

## Ergebnisse

Die Verteilung der Reninsignale lässt eine vermehrte Expression im Bereich der Glomeruli in juxtaglomerulärer Position erkennen. Vereinzelt lassen sich Reninsignale innerhalb der afferenten Arteriolen im Sinne einer retrograden Rekrutierung erkennen. Diese treten im Vergleich mit der unbehandelten Wildtyp-Maus (Abb.3.1) vermehrt auf. Im Vergleich mit der weiblichen unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden Wildtyp-Maus (Abb. 3.9) lässt sich eine deutliche geringere retrograde Rekrutierung erkennen. Innerhalb des arcuaten Seitenastes, der interlobulären Arterien sowie der efferenten Arteriolen sind keine Reninsignale auszumachen. Auch in der Übersichtsaufnahme Abb. 3.16, kann man die vermehrte Rekrutierung in juxtaglomerulärer Position gut erkennen und es lässt sich eine Mehrschichtigkeit der Renin bildenden Zellen feststellen. Es lässt sich somit eine geringradige retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriolen sowie eine schwach ausgebildete Clusterbildung in juxtaglomerulärer Position feststellen.

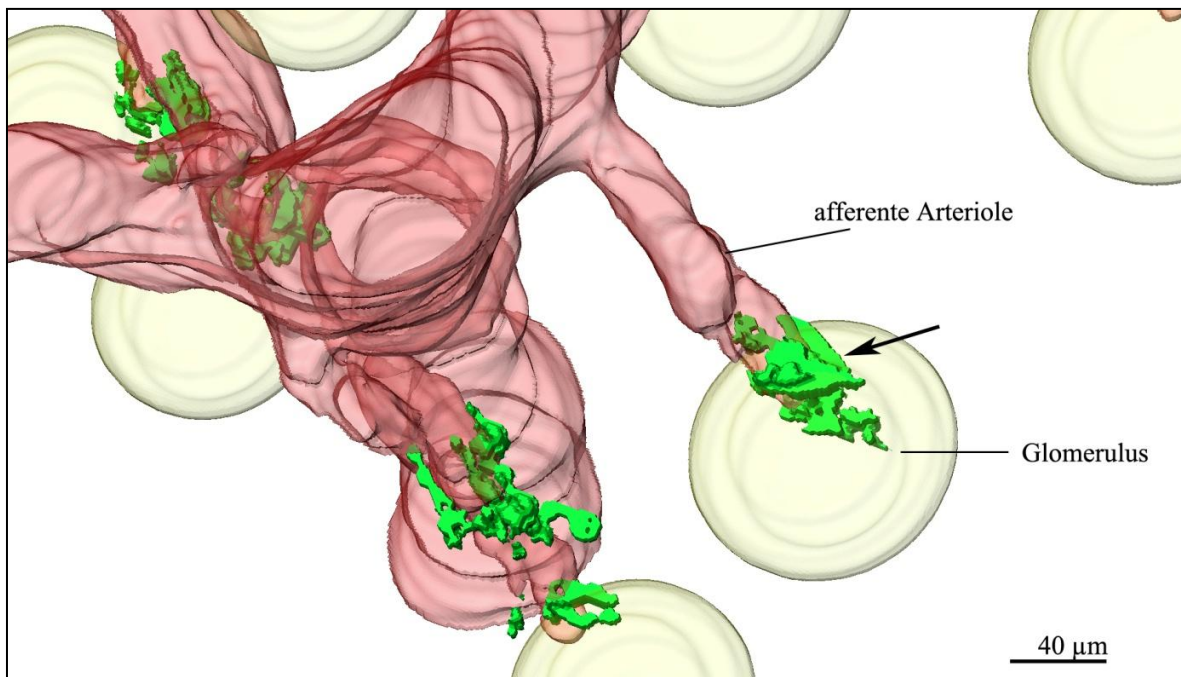


Abbildung 3.16: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von afferenten Arteriolen einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol.

## Ergebnisse

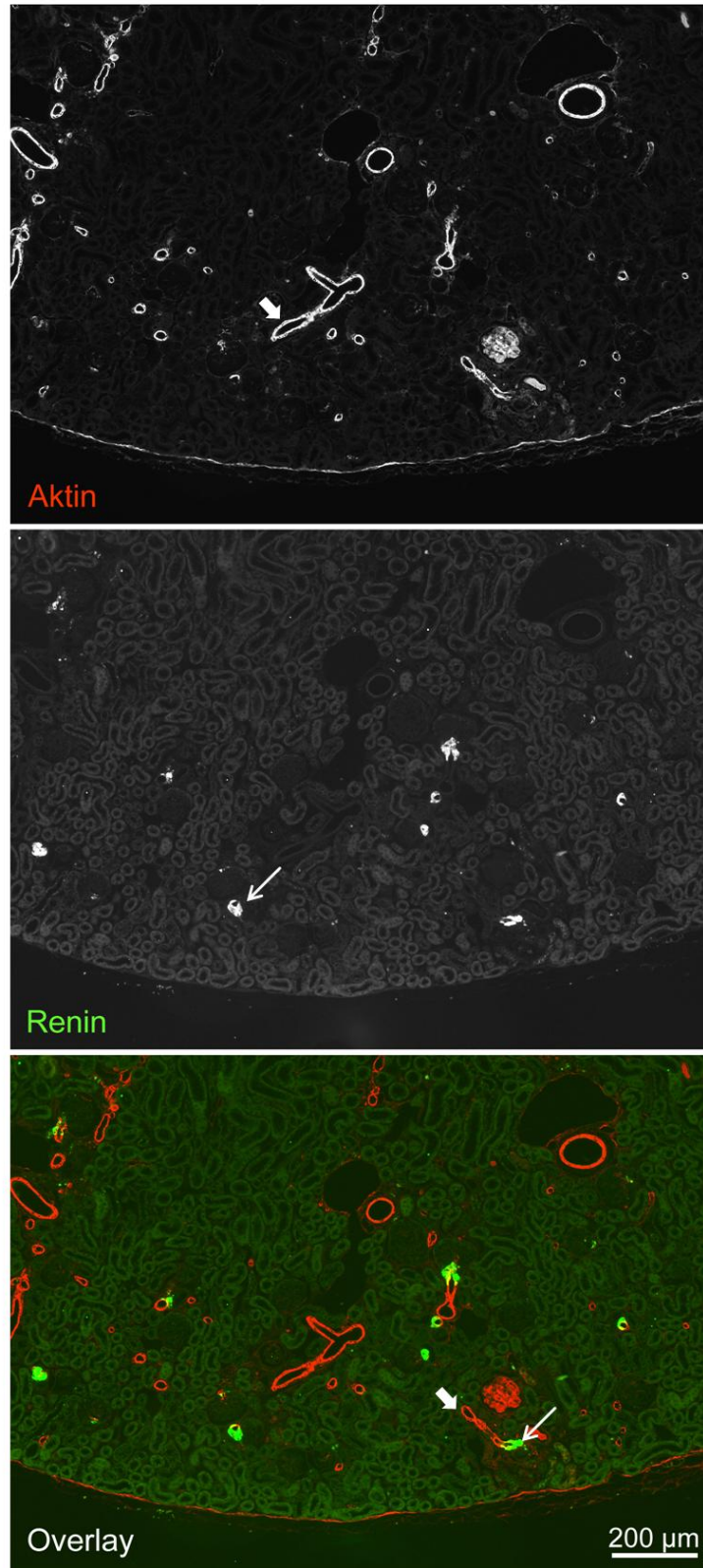


Abbildung 3.17: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Natriumrestriktion und mit Enalapril behandelten männlichen Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün (Pfeil), die der Glattmuskelaktinzellen rot (dicker Pfeil) dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine.



## Ergebnisse

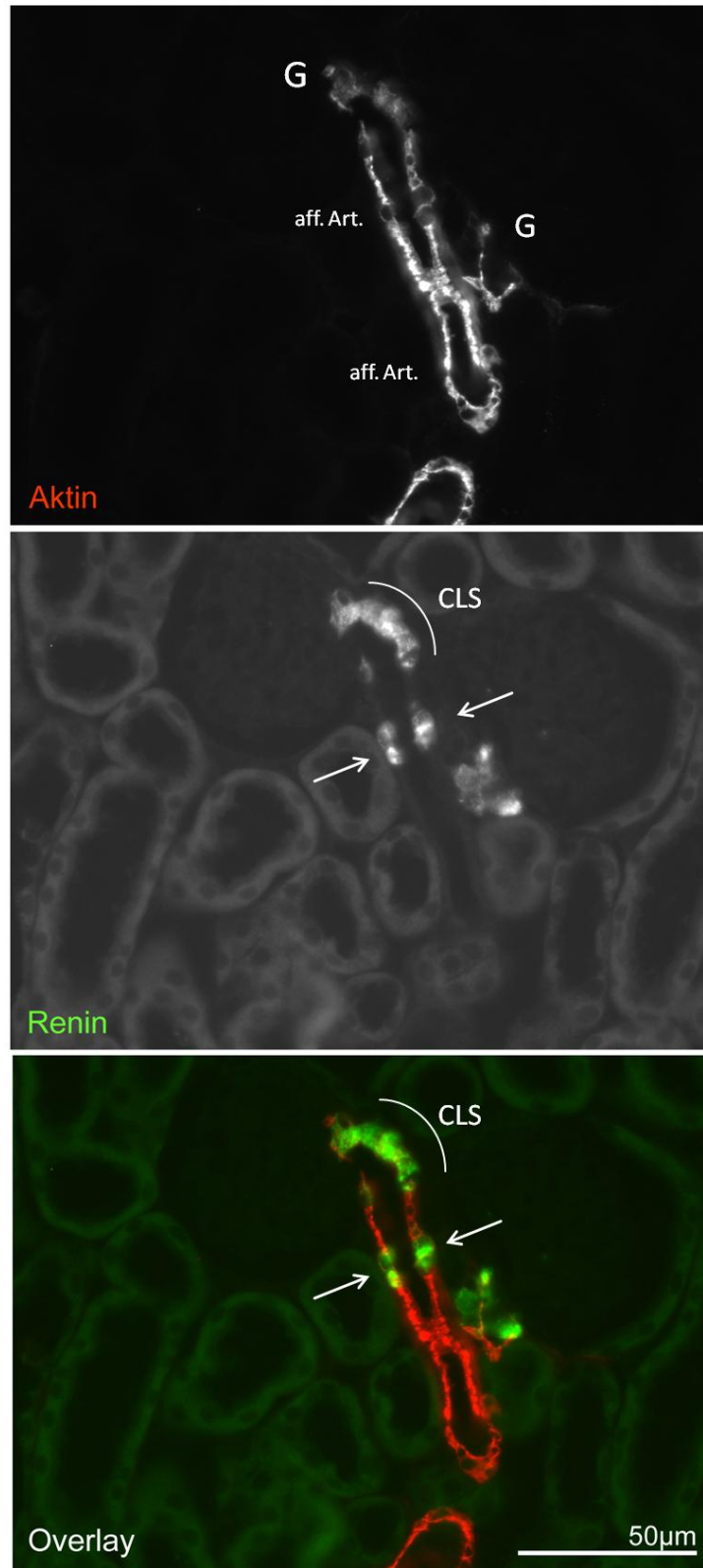
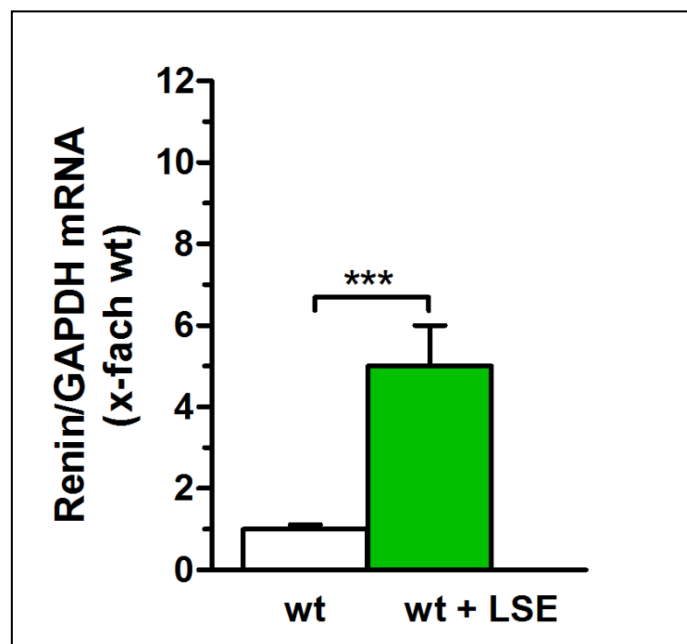


Abbildung 3.18: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nierensalzdiät stehenden und mit Enalapril behandelten männlichen Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün, die der Glattmuskelaktinzellen rot dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine. Pfeil: Reninsignale entlang der afferenten Arteriole. CLS: Cluster am juxtaglomerulären Apparat

## Ergebnisse

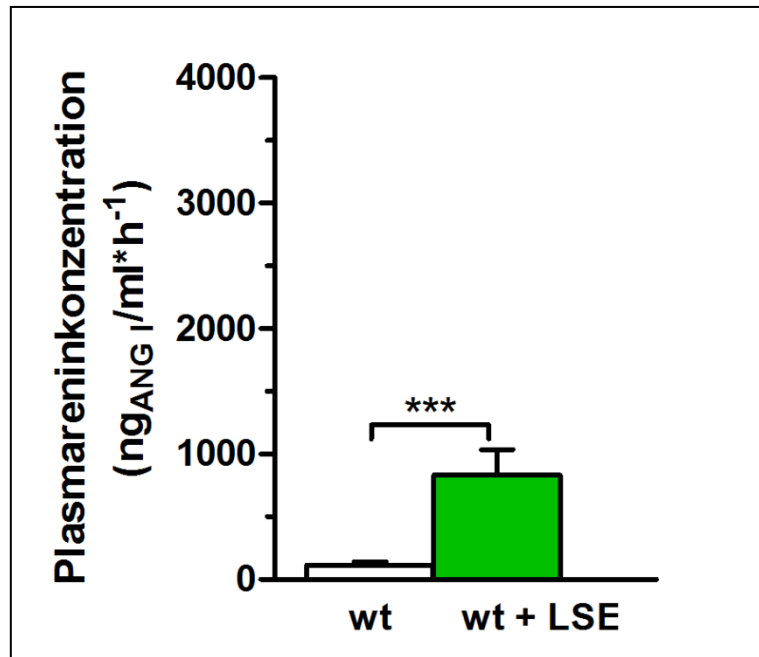
Anhand der histologischen Übersichtsaufnahme (Abb. 3.17) kann man eine mäßiggradige vermehrte Rekrutierung erahnen. In der histologischen Detailaufnahme zeigt sich die retrograde Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole und in juxtaglomerulärer Position (3.18). Dies steht mit den 3-D-Rekonstruktionen in Einklang. In Zusammenschau zeigt sich eine im Vergleich mit dem Wildtyp (Abb. 3.1-3.4) vermehrte rekrutierung Renin bildender Zellen im Verlauf der afferenten Arteriole und in juxtaglomerulärer Position (CSL). Die Rekrutierung ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den entsprechend vorbehandelten weiblichen Tieren.



3.179: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Level des Wildtyps und der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus; Normierung des Wildtyp-Werts auf eins.

Die erfassten mRNA-Level erlauben eine quantitative Aussage über die Reninexpression. Die in Abb. 3.19 gezeigten Werte stellen das x-fache des Wildtyps dar. Für die männliche Wildtyp-Maus wurde der Wert 1 definiert. Die Reninexpression in der Niere der adulten mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten männlichen Wildtyp-Maus ist im Vergleich mit der Wildtyp-Maus um das 5 fache erhöht.

## Ergebnisse



3.20: Graphische Gegenüberstellung der Plasmareninkonzentrationen des Wildtyps und der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus.

Die erfassten Plasmareninkonzentrationen erlauben eine quantitative Aussage über die Reninausschüttung. Die Plasmareninkonzentration der adulten mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten männlichen Wildtyp-Maus ist im Vergleich mit der unbehandelten Wildtyp-Maus um den Faktor 8 erhöht.



### 3.4. Reninexpressionsmuster der adulten Wildtyp-Maus unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe

Es wurde wie unter 3.3., zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterschieden, da die weiblichen Tiere eine stärkere Rekrutierung Renin bildender Zellen aufzuweisen schienen als ihre männlichen Artgenossen.

#### 3.4.1. Reninexpressionsmuster der weiblichen adulten Wildtyp- Maus unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe

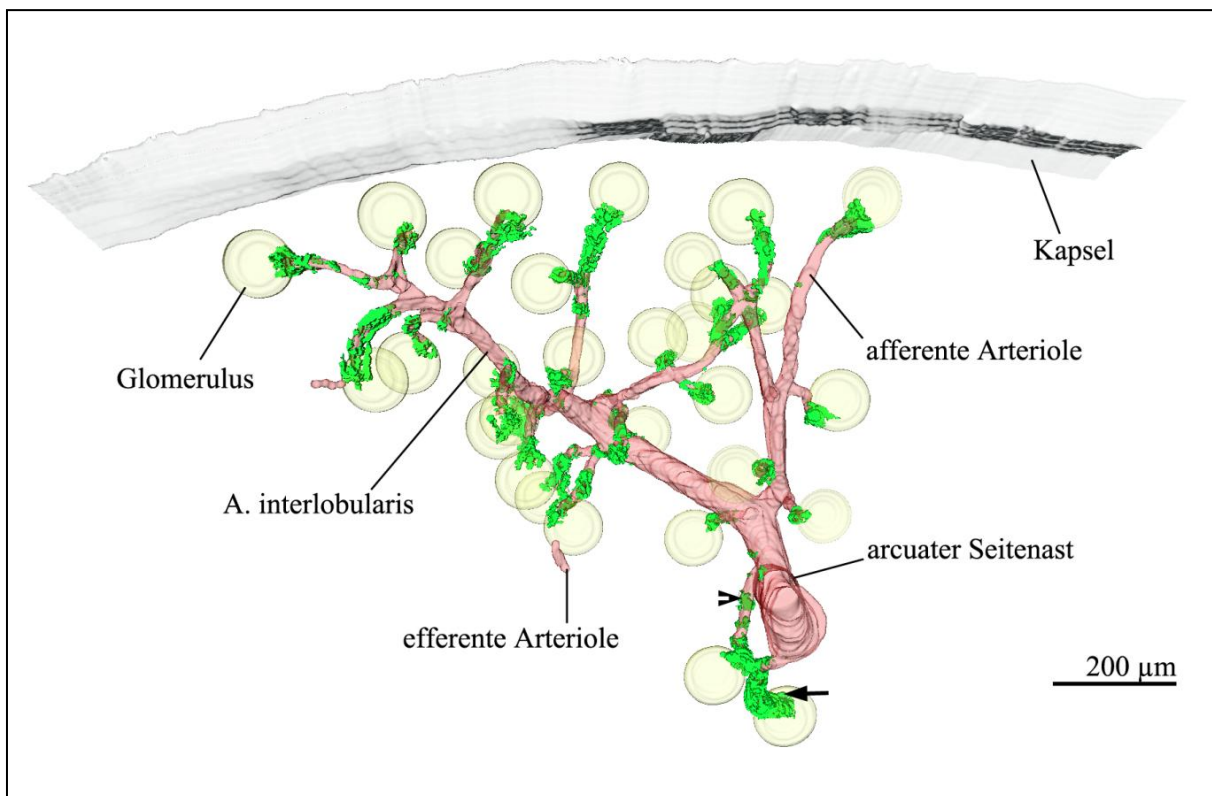


Abbildung 3.21: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten weiblichen Wild-Typ-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel. Pfeilspitze: Reninsignal entlang einer afferenten Arteriole. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol mit Clusterbildung.

## Ergebnisse

Bei Abbildung 3.21 handelt es sich um die 3D-Rekonstruktion des Gefäßbaums einer weiblichen, adulten Wildtyp-Maus deren RAAS mittels Nidrigsalzdiät und Enalapril stimuliert wurde und welche darüber hinaus mit dem selektiven COX-2 Inhibitor SC-236 behandelt wurde.

Es zeigt sich eine deutliche Zunahme Renin exprimierender Zellen innerhalb der terminalen Arteriolen an den Gefäßpolen der Glomeruli (Pfeil Abb. 3.21) sowie eine retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen im gesamten Verlauf der afferenten Arteriolen (Pfeilspitze Abb. 3.21). In juxtaglomerulärer Position erscheinen die Renin exprimierenden Zellen mehrschichtig vorzuliegen (Pfeil Abb. 3.21). In der vergrößerten Aufnahme (Abb. 3.22) ist diese Verteilung nochmals im Detail zu beobachten.

Die 3D-Rekonstruktion der unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.21) zeigt somit eine im Vergleich zur unbehandelten Wildtyp-Maus vermehrte Rekrutierung Renin bildender Zellen (Abb. 3.1). Die Reninverteilung gleicht der der unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril behandelten weiblichen Wildtyp-Maus (Abb. 3.9), zu der keine Unterschiede feststellbar sind. Das Kaliber und die Aufzweigungen des Gefäßbaums zeigen keine Unterschiede zur unbehandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.1).

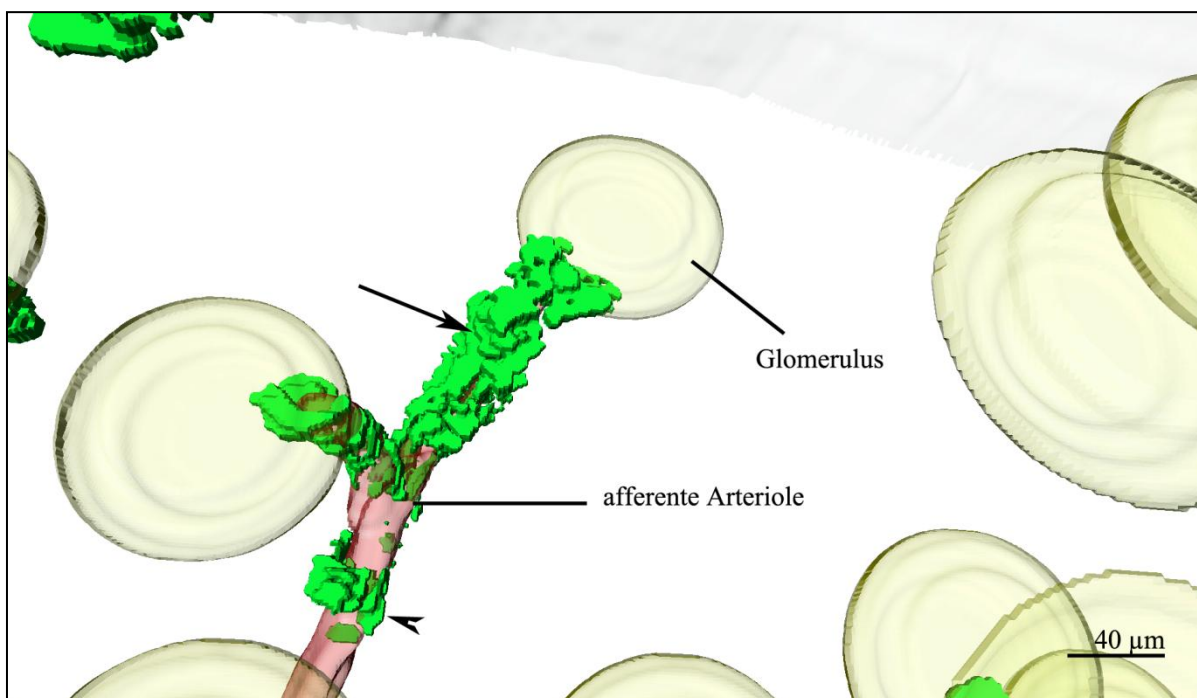


Abbildung 3.22: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von afferenten Arteriolen einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten weiblichen Wildtyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli. Pfeilspitze: Reninsignal entlang einer afferenten Arteriole. Pfeil: Reninsignal in juxtaglomerulärer Position mit Clusterbildung.

## Ergebnisse

Bei der Betrachtung der histologischen Übersichtsaufnahme (Abb. 3.23) fallen die Reninsignale am Gefäßpol als verbreitert und entlang der afferenten Arteriole vermehrt auf. Innerhalb des arcuaten Seitenastes, der interlobaren Arterien und der efferenten Arteriolen sind keine Reninsignale zu erkennen. Genauer lässt sich die Verteilung der Renin exprimierenden Zellen in der Detailaufnahme beobachten (Abb. 3.24). Es fällt eine retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen auf. Sie finden sich mit Unterbrechungen im gesamten Verlauf der afferenten Arteriole (Pfeil Abb. 3.24). In juxtaglomerulärer Position erscheint eine vermehrte Rekrutierung und Mehrschichtigkeit der Renin bildenden Zellen (Abb. 3.24). Es lassen sich somit zwei Formen der Rekrutierung Renin bildender Zellen beobachten. Zum einen entlang des Verlaufs der afferenten Arteriole, zum anderen als Hypertrophie am juxtaglomerulären Apparat (CLS).

Vergleicht man die histologisch-mikroskopischen Aufnahmen und die 3D-Rekonstruktion mit denen der unbehandelten Wildp-Maus (Abb. 3.1-3.4) fällt eine vermehrte Rekrutierung der Renin exprimierenden Zellen auf. Es zeigt sich eine mit der unter Nidrisalzdät stehenden und mit Enalapril behandelten weiblichen Wildtyp-Maus (Abb. 3.9-3.12) übereinstimmende Verteilung der Renin bildenden Zellen.

## Ergebnisse

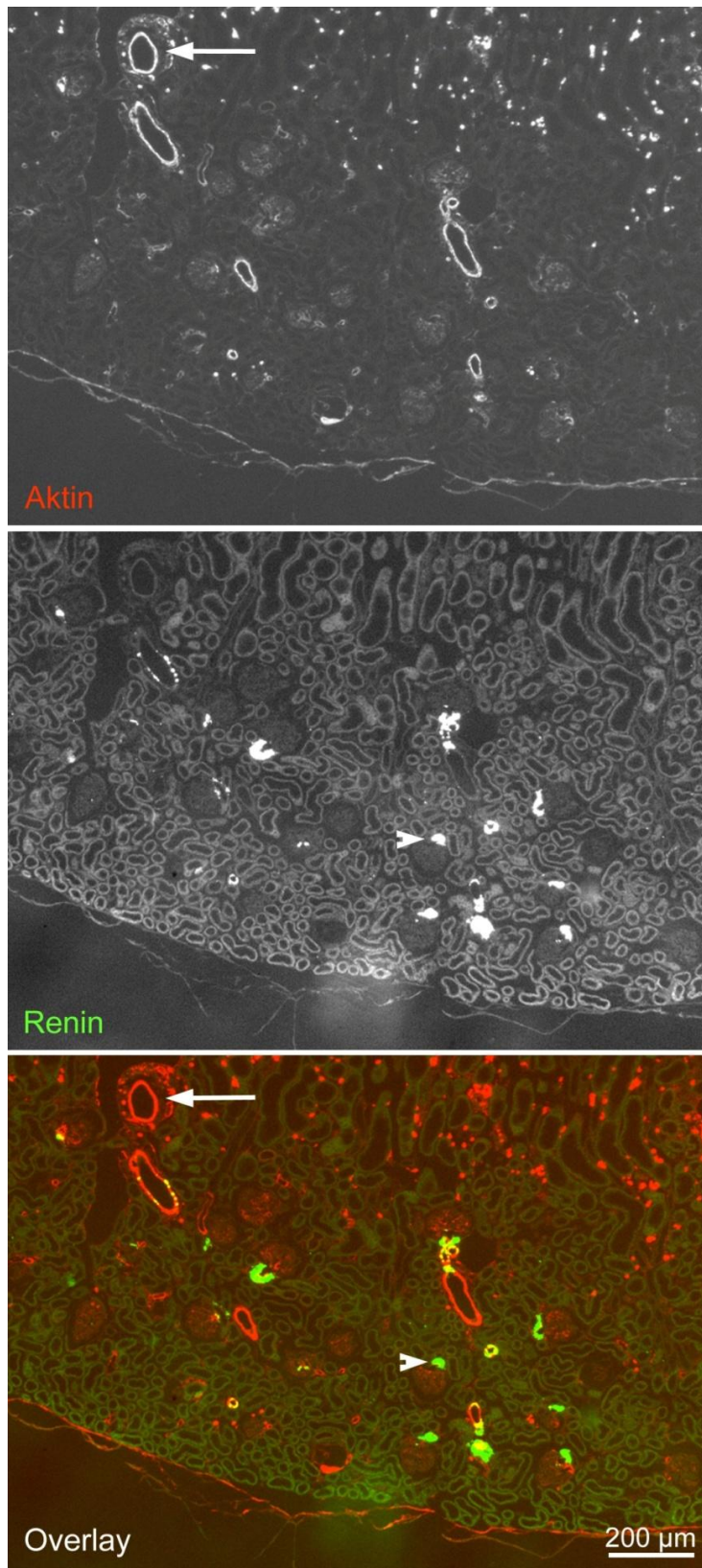


Abbildung 3.23: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten weiblichen Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün (Pfeilspitze), die der Glattmuskelaktinzellen rot (Pfeil) dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine.

## Ergebnisse

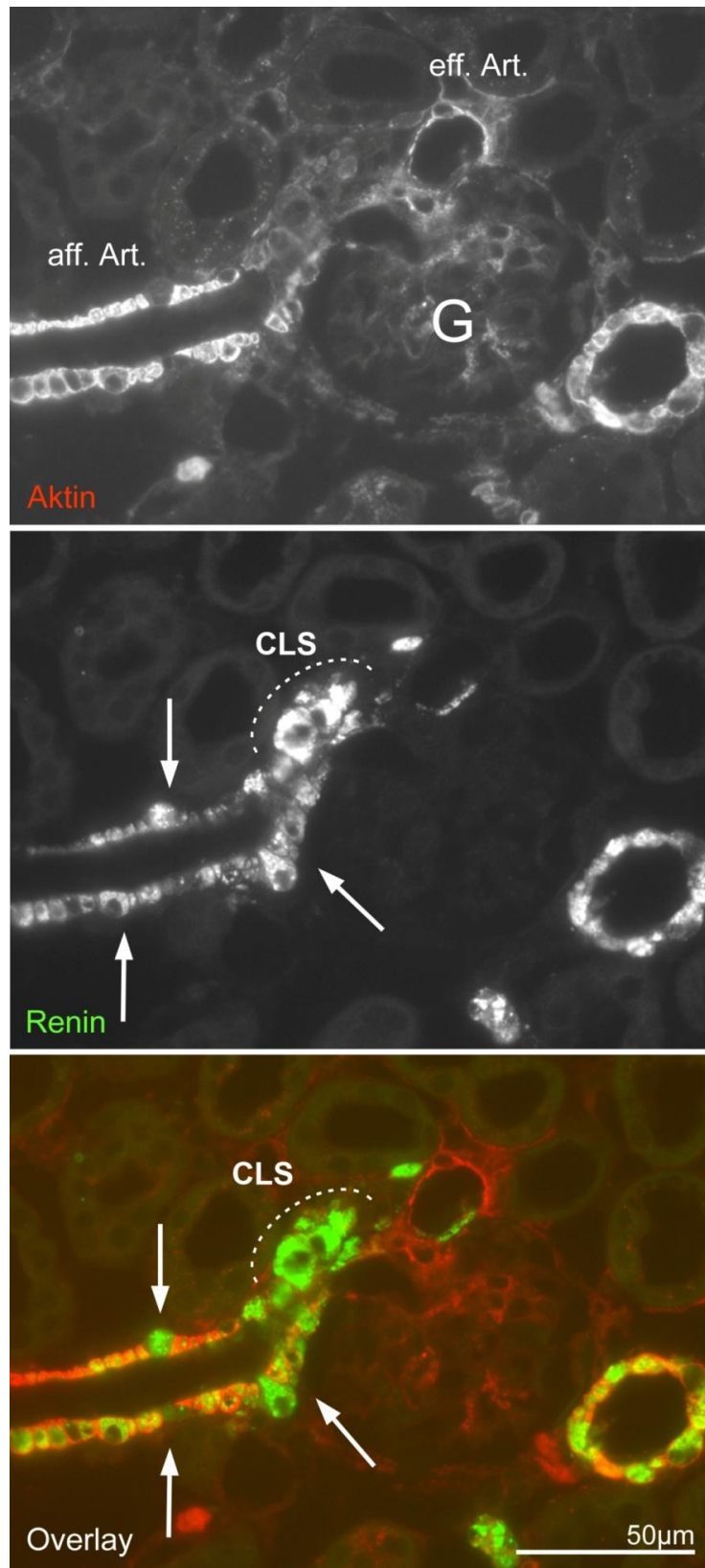
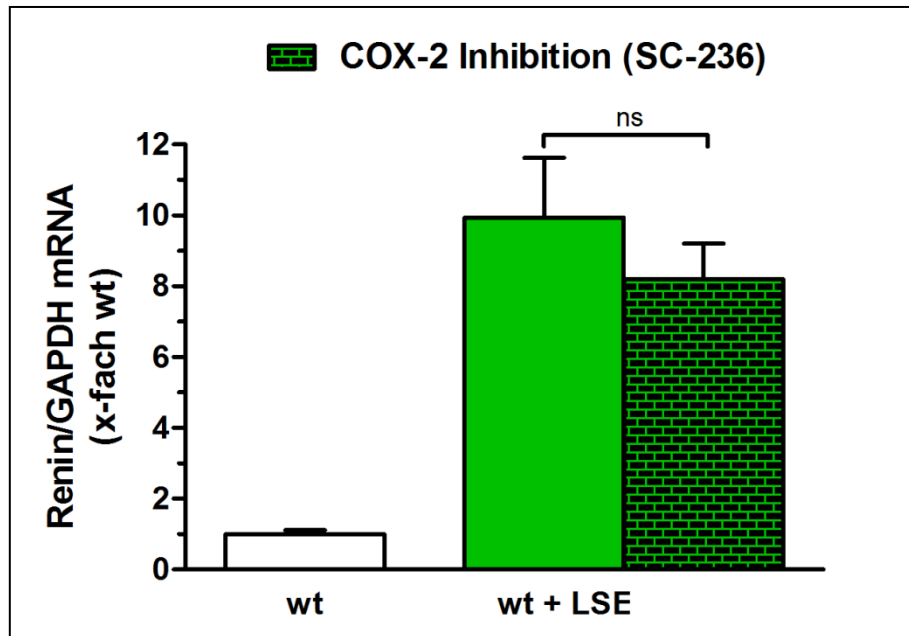


Abbildung 3.24: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Niedrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten weiblichen Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün, die der Glattmuskelaktinzellen rot dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine. Pfeil: Reninsignale entlang der afferenten Arteriole. CLS: Cluster am juxtaglomerulären Apparat

## Ergebnisse

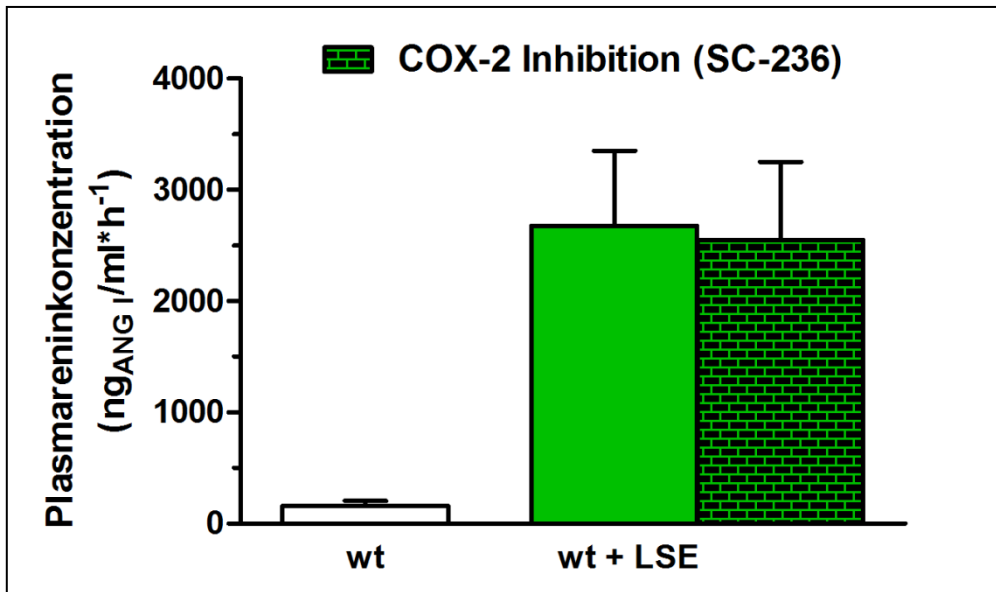


3.25: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Level des weiblichen Wildtyps der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus und der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus; Normierung des Wildtyp-Werts auf eins.

Abb. 3.25. zeigt die Renin-mRNA-Level des Wildtyps, der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Wildtyp-Maus sowie der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden Wildtyp-Maus. Es handelt sich jeweils um weibliche Tiere. Der Renin-mRNA-Level der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Wildtyp-Maus ist um das 10 fache höher als der der Wildtyp-Maus. Der Renin-mRNA-Level der Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden Wildtyp-Maus ist um das 8 fache im Vergleich mit der Wildtyp-Maus erhöht. Im Vergleich mit der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden Wildyp-Maus ist er um ein Fünftel verringert.



## Ergebnisse



3.26: Graphische Gegenüberstellung der Plasmareninkonzentration des weiblichen Wildtyps der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus und der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus.

Abb. 3.26. zeigt die Plasmareninkonzentrationen des Wildtyps, der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Wildtyp-Maus sowie der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden Wildtyp-Maus. Es handelt sich jeweils um weibliche Tiere. Der Renin-mRNA-Level der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Wildtyp-Maus ist um das 17 fache höher als der der Wildtyp-Maus. Die Plasmareninkonzentrationen der Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden Wildtyp-Maus ist um das 16 fache im Vergleich mit der Wildtyp-Maus erhöht. Im Vergleich mit der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden Wildyp-Maus lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

### 3.4.2. Reninexpressionsmuster der männlichen adulten Wildtyp Maus unter Niedrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe

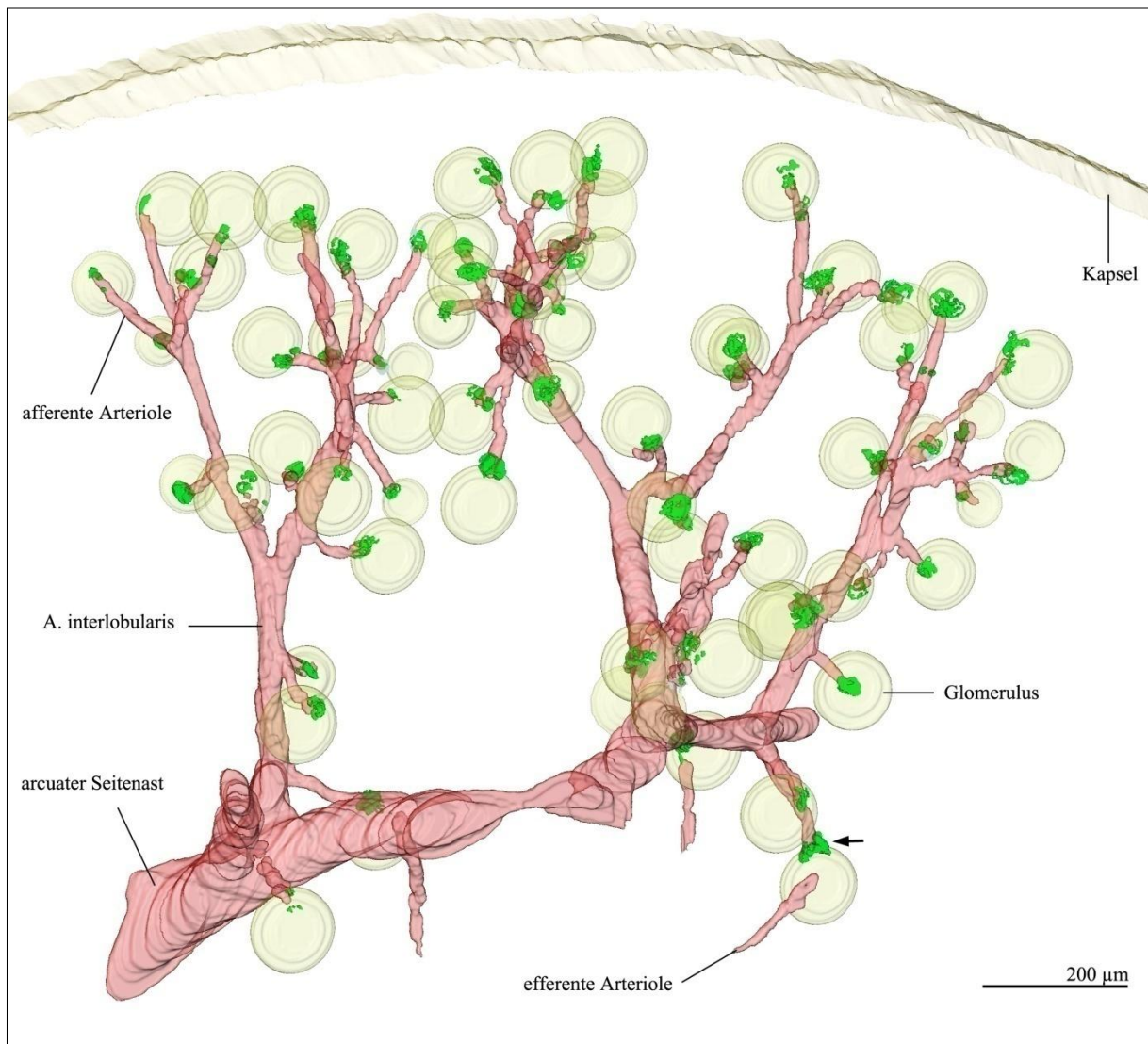


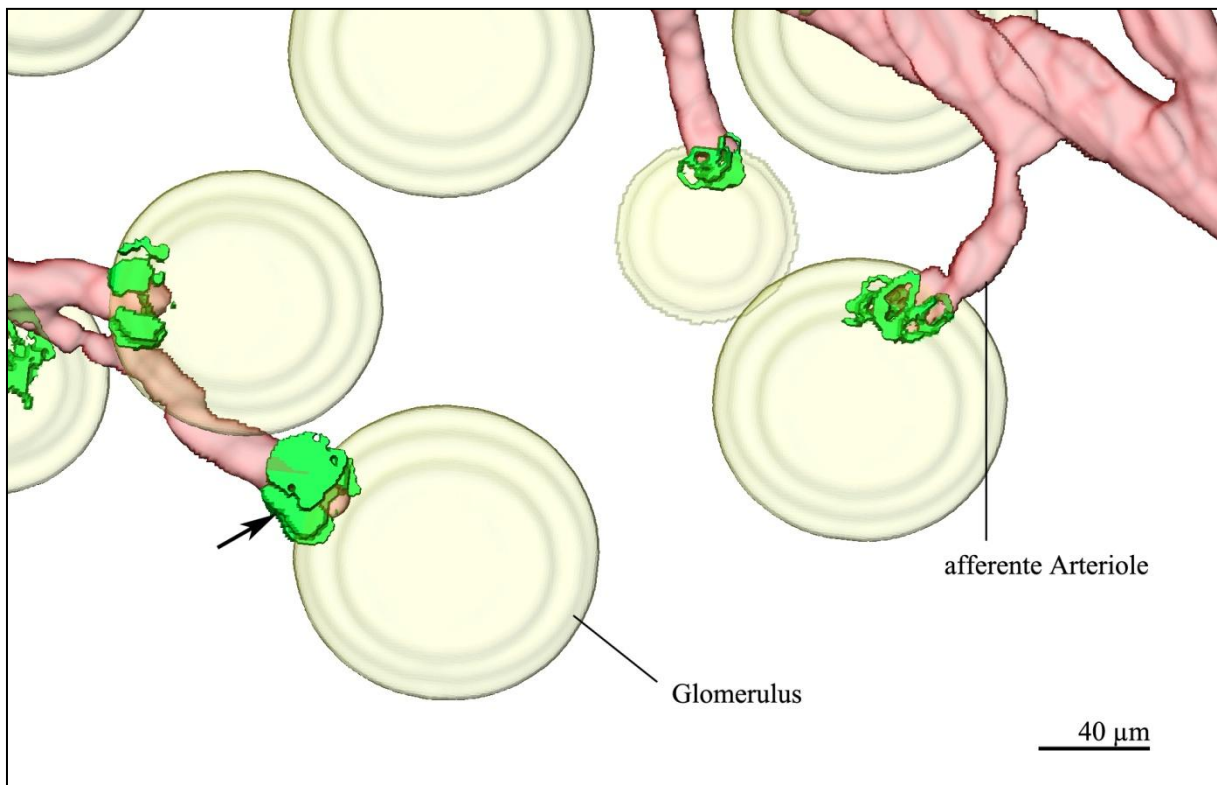
Abbildung 3.27: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer unter Niedrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten männlichen WildTyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli und Nierenkapsel. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol.

Abb. 3.27 zeigt eine 3 D-Rekonstruktion eines Gefäßbaums einer unter Niedrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten männlichen Wildtyp-Maus. Der Gefäßbaum stellt sich im jeweiligen Kaliber und Verzweigungen gleich dem der unbehandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.1) dar. Bei der Betrachtung der Reninsignale lässt sich eine vermehrte Expression im Bereich der Glomeruli in juxtaglomerulärer Position erkennen. Im Verlauf der afferenten Arteriolen sind wenige



## Ergebnisse

Reninsignale im Sinne einer retrograden Rekrutierung zu erkennen. Im Vergleich mit der Wildtyp-Maus (Abb. 3.1) finden sich vermehrt Reninsignale im Bereich der Glomeruli sowie eine leichte retrograde Rekrutierung. Im Vergleich mit der weiblichen unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten Wildtyp-Maus (Abb. 3.21) kann man eine deutlich geringere retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen beobachten. Innerhalb des arcuaten Seitenastes, der interlobulären Arterien sowie der efferenten Arteriolen sind keine Reninsignale zu erkennen. In der Übersichtsaufnahme Abb. 3.28 kann man die im Vergleich mit der Wildtyp-Maus vermehrte Rekrutierung in juxtaglomerulärer Position erkennen und eine Mehrschichtigkeit der Reninbildenden Zellen scheint vorzuliegen. Es lässt sich somit eine geringgradige retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriolen sowie eine schwach ausgebildete Clusterbildung in juxtaglomerulärer Position feststellen.



**Abbildung 3.28: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von afferenten Arteriolen einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten männlichen Wildtyp-Maus mit Darstellung der Glomeruli. Pfeil: Reninsignal im Bereich einer afferenten Arteriole unmittelbar am Gefäßpol.**

## Ergebnisse

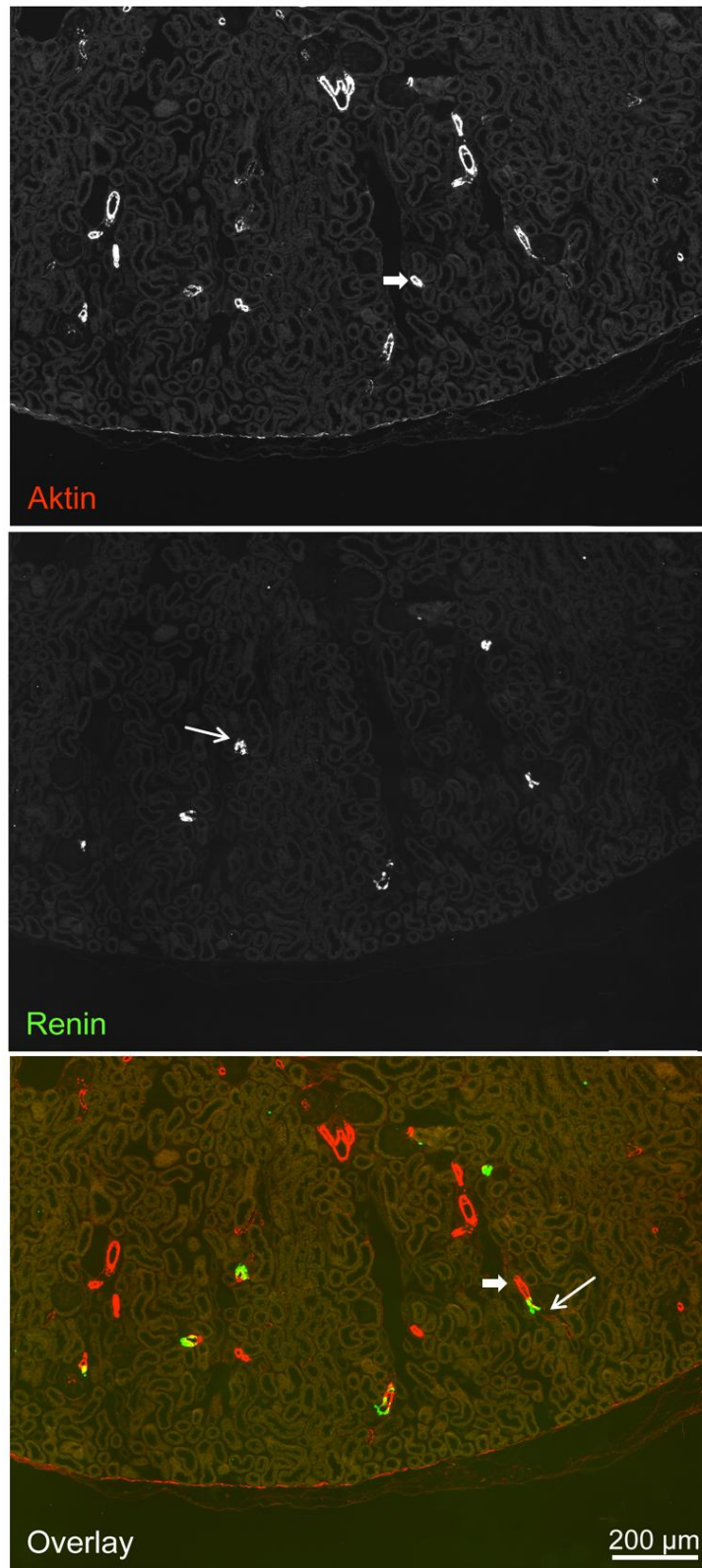


Abbildung 3.29: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Niedrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten männlichen Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninzellen ist grün (Pfeil), die der Glattmuskelaktinzellen rot (dicker Pfeil) dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine.

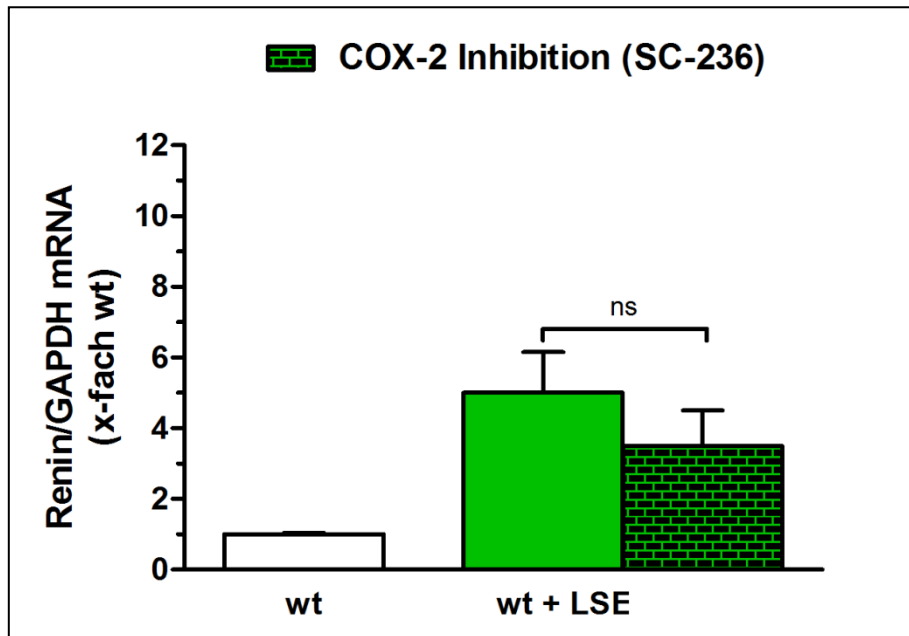
## Ergebnisse



Abbildung 3.3018: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nierensalzdiet stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten männlichen Wildtyp-Maus. Die Immunreaktion der Reninsekretorischen Zellen ist grün, die der Glattmuskulaturaktin rot dargestellt. Gelbe Signale resultieren aus dem gleichzeitigen Vorliegen beider Proteine. Pfeil: Reninsekretorische Zellen entlang der afferenten Arteriole. CLS: Cluster am juxtaglomerulären Apparat

## Ergebnisse

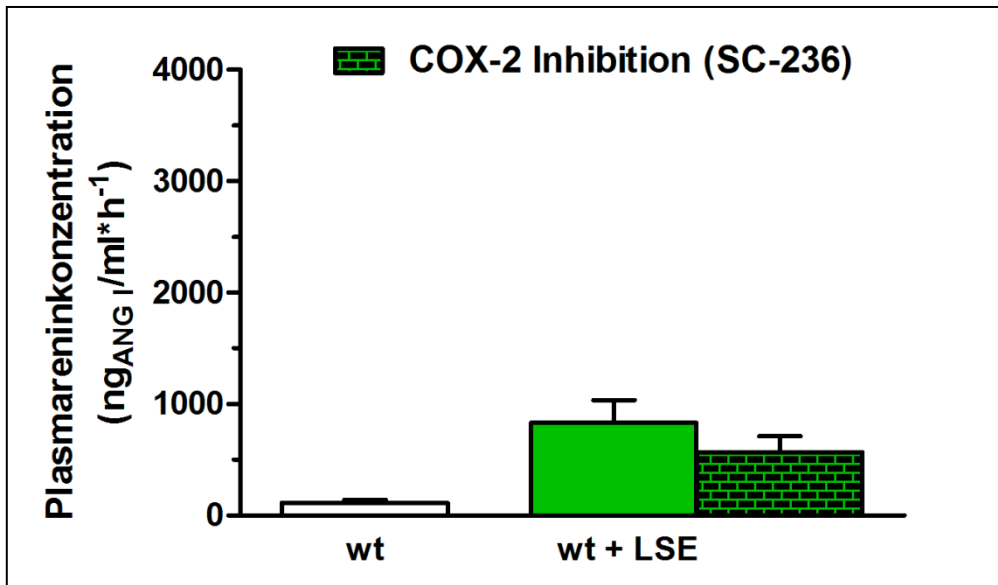
Die histologische Übersichtsaufnahme (Abb.3.29) lässt eine moderate vermehrte Rekrutierung vermuten. Diese wird in der Detailaufnahme (Abb. 3.30) bestätigt, welche eine vermehrte Rekrutierung Renin bildender Zellen in juxtaglomerulärer Position (CLS) und im Verlauf der afferenten Arteriole zeigt (Pfeil).



3.31: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Level des männlichen Wildtyps der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus und der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus; Normierung des Wildtyp-Werts auf eins.

Abb. 3.31. zeigt die Renin-mRNA-Level des Wildtyps, der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Wildtyp-Maus sowie der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden Wildtyp-Maus. Es handelt sich jeweils um männliche Tiere. Der Renin-mRNA-Level der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Wildtyp-Maus ist um das 5 fache höher als der der Wildtyp-Maus. Der Renin-mRNA-Level der Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden Wildtyp-Maus ist um das 3,5 fache im Vergleich zu der Wildtyp-Maus erhöht. Im Vergleich zu der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden Wildtyp-Maus ist er um den Faktor 1,4 verringert.

## Ergebnisse



3.32: Graphische Gegenüberstellung der Plasmareninkonzentration des männlichen Wildtyps der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus und der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus.

Abb. 3.32. zeigt die Plasmareninkonzentrationen des Wildtyps, der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Wildtyp-Maus sowie der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden Wildtyp-Maus. Es handelt sich jeweils um männliche Tiere. Der Renin-mRNA-Level der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Wildtyp-Maus ist um das 8 fache höher als der der Wildtyp-Maus. Die Plasmareninkonzentrationen der Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden Wildtyp-Maus ist um das 5 fache im Vergleich zu der Wildtyp-Maus erhöht. Im Vergleich zu der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden Wildtyp-Maus ist die Plasmareninkonzentration um ein Fünftel verringert.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss eines Cox-Inhibitors auf unterschiedlich behandelte Wildtyp-Mäuse untersucht. Folgende Gruppen wurden unterschieden: unbehandelte Wildtyp-Mäuse, Wildtyp-Mäuse die mit dem selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitor SC-236 behandelt wurden und Wildtyp-Mäuse mit durch Enalapril und Nidrigsalzdiät stimuliertem RAAS mit und ohne Gabe von SC-236. Zudem wurden geschlechtsspezifische Unterschiede berücksichtigt.

Mittelpunkt dieser Arbeit ist die Frage, welche Faktoren Einfluss auf die Rekrutierung Renin bildender Zellen, bei stimuliertem RAAS, nehmen. Als wesentlichen Faktor für die Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole wurde, in einer vorausgegangenen Studie, bereits Stickstoffmonoxid (NO) ausgemacht (Neubauer et al., 2013). Für die Rekrutierung in juxtaglomerulärer Position (Clusterbildung) könnten die COX-2 abhängigen Prostaglandine eine wesentliche Rolle spielen. In diese Richtung weist eine Untersuchung, an Ratten, welche die COX-2 Expression innerhalb der Macula densa, unter verschiedenen Bedingungen, gemessen hat. Es konnte bei Tieren deren RAAS mittels Nidrigsalzdiät und einem ACE-Hemmer stimuliert wurde, eine Erhöhung der COX-2 Expression festgestellt werden (Castrop et al., 2003). Des Weiteren wurden Untersuchungen der Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentrationen durchgeführt. Während manche Studien eine Stimulation unter COX-2 Hemmung verneinen, kommen andere zu dem Ergebnis, dass die Hemmung der COX-2 zu verminderten basalen Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentrationen führt, die Stimulierbarkeit jedoch eingeschränkt erhalten bleibt (Cheng et al., 2001; Yang et al., 2000; Kim et al., 2007; Matzdorf et al., 2007). Es bleibt somit weiter Forschungsbedarf.

Innerhalb dieser Arbeit werden verschieden vorbehandelte Tiere untersucht (s.o.). Um eine Rekrutierung Renin bildender Zellen zu erreichen, wurde das RAAS mittels Enalapril und Nidrigsalzdiät stimuliert. Zudem wurde die Hälfte der unstimulierten sowie stimulierten Tiere, gleichzeitig mit dem COX-2 Inhibitor SC-236 behandelt, um mögliche Veränderungen innerhalb der Rekrutierung Renin bildender Zellen durch, Hemmung der COX-2, ausmachen zu können. Ferner wurde bei den stimulierten Tieren zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterschieden, da diese Unterschiede bezüglich der Rekrutierung Renin bildender Zellen aufwiesen. Abgesehen von der gezielten Behandlung wurden die Tiere unter gleichen Bedingungen gehalten um äußere Einflussfaktoren auszuschließen. Des Weiteren wurden gleich alte Tiere verwendet um alters-physiologische Faktoren auszuschließen. Die Untersuchung des Reninsystems der verschiedenen Tiere erfolgte mittels Quantifizierung der Renin-mRNA, der Plasmareninkonzentration sowie durch die Auswertung der

histologischen Aufnahmen und der 3D-Rekonstruktionen. Innerhalb der histologischen Aufnahmen und der 3D-Rekonstruktionen wurden die Renin bildenden Zelle gesondert dargestellt, was Aussagen bezüglich der Quantität und Lokalisation der Reninzellen ermöglicht.

### **4.1 Analyse der 3D-Rekonstruktionen und der histologischen Aufnahmen in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Renin-mRNA- und Plasmanreninkonzentrationen**

#### **4.1.1 Die adulte Wildtyp-Maus mit und ohne Behandlung mit dem selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitor SC-236**

Anhand der 3D-Rekonstruktion sowie der mikroskopischen Aufnahmen der unbehandelten Wildtyp-Maus kann die physiologische Reninverteilung einer gesunden adulten Wildtyp-Maus beobachtet werden (Abb.3.1-3.4). Während die Gefäßwand der afferenten Arteriole von Glattmuskelzellen gebildet wird, gehen diese am terminalen Ende der afferenten Arteriole in Renin bildende Zellen über. Die Renin bildenden Zellen haben eine kubische Form und bilden die Media der Gefäßwand. Die Anordnung innerhalb der Gefäßwand ist stets einreihig und das Vorliegen Renin bildender Zellen endet am Übergang in das Kapillarknäuel des Glomerulus. Der arcuate Seitenast, die interlobularen Arterien, die efferenten Arteriolen sowie die Ursprünge der afferenten Arteriolen sind frei von Renin bildenden Zellen. Die Renin bildenden Zellen finden sich somit ausschließlich in juxtaglomerulärer Position. Das beschriebene Verteilungsmuster wurde bereits mittels Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie und Hybridisierungstechniken nachgewiesen und war Bestandteil mehrerer Studien (Hackenthal et al., 1990; Barajas, 1979; Taugner et al., 1984; Sauter et al., 2008).

In dieser Arbeit wurden keine Unterschiede der Reninexpression unstimulierter Tiere gefunden. Die Hemmung der COX-2 durch den selektiven COX-2 Inhibitor SC-236 hat sich nicht in einer Änderung der Reninexpression niedergeschlagen (Abb. 3.5-3.8). Es wurde nicht zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterschieden, da keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auftraten. SC-236 (4-[5-(4-chloro-phenyl)-3-(trifluoromethyl)-1-pyrazol-1-]benzenesulfonamide), ist ein hochpotenter und hoch selektiver Blocker der COX-2. SC-236 ist nur für Forschungszwecke zugelassen. Die COX-2 katalysiert die Konversion der Arachidonsäure zum Prostaglandin  $H_2$  (Needleman et al., 1986). Dieses wird weiter zu  $PGE_2$  und  $PGI_2$  umgewandelt.  $PGE_2$  und  $PGI_2$  aktivieren den  $EP_2$ -,  $EP_4$  – und den IP-



Rezeptor, was zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration und Reninsekretion in juxtaglomerulären Zellen führt (Friis et al., 2005; Green et al., 2011). Eine ausgedehnte Steigerung der Reninfreisetzung geht wiederum mit der retrograden Rekrutierung Renin bildender Zellen einher (Wagner and Kurtz, 1999). Es wäre demnach, durch Hemmung der COX-2, mit einer verminderten Anzahl Renin bildender Zellen zu rechnen. Die Untersuchungen der Reninverteilung stellten sich wie folgt dar. Die Renin bildenden Zellen finden sich sowohl in der 3D-Rekonstruktion wie auf den histologischen Schnitten ausschließlich in juxtaglomerulärer Position. Anhand der histologischen Schnitte erkennt man das einreihige Vorliegen der Renin bildenden Zellen. Der Gefäßbaum stellt sich in jeweiligem Kaliber und Verzweigungen gleich dem der unbehandelten Wildtyp-Maus dar. Anhand der histologisch-mikroskopischen Aufnahmen sowie der 3D-Rekonstruktion lassen sich keine Unterschiede der Reninexpression der unbehandelten Wildtyp-Maus und der Reninexpression der mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus ausmachen (Abb.3.1-3.4 und Abb. 3.5-3.8). Es konnte somit gezeigt werden, dass die Hemmung der COX-2 zu keiner Veränderung der Lokalisation der Renin bildenden Zellen führt. Insbesondere wurde keine Abnahme in juxtaglomerulärer Position festgestellt. Die Möglichkeit, dass die Inhibierung der Cyclooxygenase-2 zu einer verminderten Exkretion von Renin führt, ohne sich auf die Rekrutierung Renin bildender Zellen auszuwirken, kann anhand der 3D-Rekonstruktion und der histologischen Aufnahmen nicht ausgeschlossen werden. Die Arbeitsgruppe von Höcherl, 2007, hat die Auswirkung der Blockade der COX-2 an Wildtyp-Ratten untersucht. Die Tiere wurden mit dem selektiven COX-2-Inhibitor SC-58136 behandelt. Die Plasmareninaktivität sowie die Renin-mRNA-Level sanken nach 3 Tagen und erreichten nach 5 Tagen ein konstantes Level, das sich um 60% unter dem unbehandelten Tiere befand (Matzdorf et al., 2007). Es handelt sich jedoch um Untersuchungen an Ratten, welche nicht eins zu eins auf Mäuse übertragen werden können. Eine Untersuchung der COX-2-Expression an unbehandelten Mäusen weist Unterschiede im Vergleich zu Ratten auf. Es konnte bei Mäusen keine signifikante mRNA Menge mittels Western Blot und in situ Hybridisierung festgestellt werden. Im RNase Protection Assay wurden mRNA Mengen festgestellt, die lediglich 5% der von Ratten entsprachen. Es wurden ungefähr  $10^5$  Gentranskripte auf Grund des RNase Protection Assays im Cortex einer Maus kalkuliert. Es kämen demnach 10 Transkripte auf eine Macula densa, was keine relevante COX-2-Proteinsynthese erwarten lässt, was auch das Ergebnis des durchgeführten Western Blots erklären würde (Wagner et al., 2003). Des Weiteren wurde in einer Studie an Mäusen, die mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 behandelt wurden, keine Veränderungen der Plasmareninaktivität ( $5.1 \pm 1.3$  ng Ang I/ml per h) unter physiologischer Kochsalzzufuhr festgestellt (Harding et al., 2000). Neuere Studien an Mäusen kommen hingegen zu Ergebnissen, die vereinbar mit denen der Arbeitsgruppe um Höcherl sind. So konnte Kim et al., 2007, an COX-2 Knockout Mäusen zeigen, dass diese unter



physiologischer Kochsalzzufuhr und unabhängig vom genetischen Hintergrund um ca. 26% verminderte Plasmanreninkonzentrationen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hatten. Es besteht die Möglichkeit, dass die beschriebenen Veränderungen unter Mitwirken der COX-1 zustande kamen. Die selektiven COX-2-Inhibitoren könnten möglicherweise eine Restwirkung auf die COX-1 gehabt haben. Ein Mitwirken der COX-1 erscheint jedoch unwahrscheinlich betrachtet man die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Harris, 2002. Diese führte unter anderem Untersuchungen an COX-1 Knockout Mäusen durch. Der Vergleich der basalen Plasmanreninaktivität von COX-1 Knockout Mäusen und Wildtyp-Mäusen ergab keinen signifikanten Unterschied, was Interferenzen durch die COX-1 unwahrscheinlich macht (Cheng et al., 2002). Zudem wurde die Reninsekretion auf zellulärer Ebene untersucht. Friis et al., 2005, führten Untersuchungen an isolierten juxtaglomerulären Zellen durch. Sie konnten zeigen, dass die Gabe des COX abhängigen Gewebehormons PGE<sub>2</sub> (10 µl/l) zu einem vorübergehenden, signifikanten Anstieg der Reninsekretion, 150s nach PGE<sub>2</sub>-Gabe, führt. Ferner konnte die Arbeitsgruppe um Jensen, 2005, mittels Immunfluoreszenz zeigen, dass sich die Reninsignale nach PGE<sub>2</sub>-Gabe deutlich verringerten (Friis et al., 2005). Es lässt sich feststellen, dass die Inhibierung der COX-2 einer unstimulierten Wildtyp-Maus keine Auswirkung auf die Quantität und Lokalisation Renin bildenden Zellen hat. Die COX-2 scheint jedoch Einfluss auf die Basale Reninsekretionsrate der bestehenden Renin bildenden Zellen zu haben, was sich in verminderten basalen Plasmanreninleveln unter COX-2-Inhibierung äußert. Dies würde bedeuten, dass Veränderungen der Reninsekretion nicht zwingend mit einer Rekrutierung oder Abnahme Renin bildender Zellen einhergehen.

### **4.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Reninexpression nach Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems-Systems**

Die Gabe des Nidrigsalzfutters und des Medikaments Enalapril erfolgte um eine Stimulation des Reninsystems zu erreichen. Bei Enalapril handelt es sich um einen Hemmstoff des Angiotensin-Konverting-Enzyms (ACE). Enalapril wird oral verabreicht. Durch hydrolytische Abspaltung der Ethylgruppe entsteht die eigentliche Wirksubstanz, das Enalaprilat (Harald Schmidt, 2007). ACE ist Bestandteil des RAAS und wird für die Aktivierung von ANG I zu ANG II verantwortlich gemacht (Ferrão et al., 2014). Durch die Hemmung des ACE entsteht folglich weniger ANG II. Daraus resultiert eine geringere direkte Wirkung von ANG II sowie eine verminderte Freisetzung von Vasopressin und Aldosteron, was insgesamt eine Herabsetzung des Blutdrucks zur Folge hat (Klinke et al., 2005; Ardaillou et al., 1999; Fitzsimons et al., 1998). Anhand einer Studie an normotensiven wie

hypertensiven Hunden, konnte gezeigt werden, dass der verminderte Blutdruck über den Barorezeptor reaktiv zu einer Stimulation der Reninfreisetzung führt (Skinner et al., 1964). Die niedrige Kochsalzkonzentration der Nahrung wirkt sich über den Mechanismus der Macula densa auf die Reninsekretion aus. So wurde anhand isolierter juxtaglomerulärer Apparate gezeigt, dass verminderte Kochsalzkonzentrationen an der Macula densa mit einer gesteigerten Reninfreisetzung vergesellschaftet sind (Skott and Briggs, 1987). Es wäre demnach mit dem Bild einer retrograden Rekrutierung Renin bildender Zellen durch die Stimulation des RAAS zu rechnen (Wagner and Kurtz, 1998; Gomez and Norwood; 1995; Taugner et al., 1984). Betrachtet man die 3D-Rekonstruktionen und histologischen Aufnahmen der weiblichen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Wildtyp-Maus, fällt tatsächlich eine deutliche retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen auf (Abb. 3.9). Es finden sich 2 Arten von Reninzellen. Zum einen treten Renin bildende Zellen diskontinuierlich entlang des gesamten Verlaufs der afferenten Arteriole auf. Zum andern liegen die Renin bildenden Zellen in juxtaglomerulärer Position mehrschichtig vor und sie haben eine deutlich kubische Form, hervorgerufen durch die Bepackung mit Reningranula (Abb. 3.11). Es hat folglich eine deutliche Stimulierung des RAAS stattgefunden. Die Ergebnisse der 3D-Rekonstruktion und histologischen Aufnahmen der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten männlichen Wildtyp-Maus wichen von denen der weiblichen Tiere deutlich ab (Abb. 3.15-3.16). Zwar hat eine Rekrutierung Renin bildender Zellen stattgefunden, diese fiel jedoch unerwartet gering aus. Im Verlauf der afferenten Arteriolen zeigten sich nur sehr vereinzelt Renin bildende Zellen und die Hypertrophie in juxtaglomerulärer Position fand zwar statt, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als bei den weiblichen Tieren (Abb. 3.18). Vergleicht man unstimulierte Tiere mit den stimulierten männlichen Tieren und diese mit stimulierten Weibchen, kommt man zu dem Ergebnis, dass die Stimulation der Männchen um ca. 60% geringer als die der Weibchen ausfällt. Eine Studie an Ratten, die mit einem ACE-Inhibitor behandelt wurden zeigte mittels Immunhistochemie, dass die behandelten Tiere 50% Renin bildende Zellen entlang der afferenten Arteriole aufwiesen, unbehandelte Tiere wiesen dagegen nur 30% Renin bildende Zellen auf (Gomez et al., 1988). Des Weiteren konnte an minderperfundierten Rattennieren mittels Elektronen- und Lichtmikroskopie eine retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen sowie deren vermehrte Bepackung mit Granula, um den Faktor 3, dargestellt werden (Cantin et al., 1977). Untersuchungen an Mäusen mit ausgeschaltetem Angiotensin-I-Gen zur Stimulation des RAAS haben gezeigt, dass diese eine um den Faktor 10 erhöhte Anzahl Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriole aufwiesen (Lopez et al., 2004). Ferner wurden Mäuse mit deletiertem Angiotensin II-Typ 1a-Rezeptor ( $AT_{1A}$ ) untersucht. Wildtyp-Mäuse unter Nidrigsalzdiät zeigten eine vermehrte Rekrutierung Reninbildender Zellen um den Faktor 2 während  $AT_{1A}$ -Knockout-Mäuse unter Nidrigsalzdiät eine vermehrte Rekrutierung Renin bildender Zellen um den Faktor 12

aufwiesen (Machura et al., 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die Weibchen lassen sich gut mit den dargestellten Studien vereinbaren. Es hat eine mit der vollständigen ANG II-Blockade vergleichbare Rekrutierung Renin bildender Zellen stattgefunden. Überraschend ist das Ergebnis der Männchen, die eine deutlich geringere Rekrutierung aufwiesen. In Zusammenschau mit der Studie von Machura et al., 2012, lassen sie sich am ehesten mit Mäusen vergleichen, die nur mit einer Nidrigsalzdiät behandelt wurden. Die festgestellten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Rekrutierung Renin bildender Zellen bei stimuliertem RAAS werfen neue Fragen auf und wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Die Analyse der Renin mRNA Level und der Plasmareninkonzentration kam zu folgendem Ergebnis. Die Reninexpression in der Niere der adulten mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten weiblichen Widtyp-Maus ist im Vergleich zu der Wildtyp-Maus um das 10 fache erhöht; die Plasmareninkonzentration der adulten mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten weiblichen Widtyp-Maus ist im Vergleich zu der weiblichen Wildtyp-Maus um das 17 fache erhöht (abb. 3.13-3.14). Die Renin mRNA-Level der adulten mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten männlichen Widtyp-Maus sind im Vergleich zu der Wildtyp-Maus um das 5 fache erhöht; die Plasmareninkonzentration der adulten mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten männlichen Widtyp-Maus ist im Vergleich zu der männlichen Wildtyp-Maus um den Faktor 8 erhöht (Abb. 3.19-3.20). Es lässt sich wiederum eine deutlich geringere Stimulatin des RAAS der Männchen im Vergleich zu den Weibchen, anhand der geringeren Renin mRNA Level und Plasmareninkonzentrationen, feststellen. Die vorausgegangenen Untersuchungen bezüglich der Auswirkung eines stimulierten RAAS auf die Plasmarenin-konzentration und Renin-mRNA-Level kamen zu folgenden Ergebnissen. Cheng et al., 2001, haben Mäuse untersucht, welche mit dem ACE-Hemmer Captopril behandelt wurden. Die mit Captopril behandelten Wildtyp-Mäuse wiesen einen im Vergleich zu unbehandelten Tieren um das fünffache erhöhte Renin-mRNA-Level und eine verdreifachte Plasmareninaktivität auf (Cheng et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um Schnermann, 2007, hat die Auswirkung der Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit einer Nidrigsalzdiät und dem ACE-Hemmer Enalapril über eine Woche untersucht. Die behandelten Tiere wiesen verdreifachte Renin-mRNA-Level und verzwanzigfache Plasmareninkonzentrationen auf. Die Behandlung mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker Candesartan führte zu einer Steigerung der Plasmareninkonzentration um das 30fache (Kim et al., 2007b). Die Arbeitsgruppe um Höcherl, 2007, untersuchte die Wirkung der ACE-Inhibitoren Captopril und Ramipril sowie die Ernährung mit Nidrigsalzfutter auf Wildtyp-Ratten. Die Gabe von Captopril führte zu einer Steigerung der Plasmareninkonzentration um das 5,4fache und die Renin-mRNA-Level um das 1,9fache. Die Gabe von Ramipril führte zu einer Steigerung der Plasmareninkonzentration um das 8fache und des Renin-mRNA-Levels um das 3,8fache. Die Ernährung mit Nidrigsalzfutter

bewirkte eine Verdoppelung der Plasmaninkonzentration und des Renin-mRNA-Niveaus (Matzdorf et al., 2007). Die Untersuchungen an Ratten zeigen ein vergleichbares Bild mit denen von Mäusen, können jedoch nicht eins zu eins auf diese übertragen werden (Wagner et al., 2003). Eine weitere Studie an Mäusen, welche mit dem ACE-Inhibitor Captopril behandelt wurden, hat Renin-mRNA-Niveau, die um das 5fache im Vergleich zu unbehandelten Tieren gesteigert waren und um das 3fache erhöhte Plasmaninaktivitäten gemessen (Cheng et al., 2001). Die vorausgegangenen Studien kommen zu ähnlichen Ergebnissen, wobei die Stimulation des RAAS über  $AT_1$ -Blocker stärker als die mit ACE-Hemmern ausfällt. Die Ergebnisse der Renin-mRNA-Niveau gleichen denen, welche bei den männlichen Tieren gemessen wurden. Die Ergebnisse der Plasmaninkonzentrationen sind am ehesten mit den weiblichen Tieren vergleichbar. Eine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Tieren wurde in keiner der erwähnten Studien vorgenommen.

Die Ergebnisse der 3D-Rekonstruktionen, der histologischen Aufnahmen, der Renin-mRNA-Niveau und Plasmaninkonzentrationen sind schlüssig, wenn man die Männchen oder Weibchen getrennt voneinander betrachtet. Betrachtet man jedoch beide Geschlechter fällt sowohl in der 3D-Rekonstruktion, den histologischen Aufnahmen sowie in den Messungen der Renin-mRNA und Plasmaninkonzentration eine deutlich geringere Stimulation des RAAS bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen auf. Fraglich ist, was die Ursache der verminderten Stimulierbarkeit des RAAS der männlichen Tiere ist, insbesondere weshalb kaum eine retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriolen stattgefunden hat. Die Ernährung und Medikation kommen als Erklärung nicht in Betracht, da beide Geschlechter unter gleichen Bedingungen, Ernährung und Medikation gehalten wurden. Eine Akkumulation des Enalapriols wäre bei eingeschränkter Nierenfunktion möglich und könnte für die starke Stimulation des RAAS der Weibchen mit verantwortlich sein. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die Tiere uneingeschränkt die Möglichkeit der Flüssigkeitszufuhr hatten, einen gesunden Eindruck vermittelten und die eingeschränkte Nierenfunktion bei allen Tieren gleichzeitig vorgelegen haben müsste. Möglich wäre ein aufgrund der Genetik unterschiedlich ausgestattetes RAAS, insbesondere Unterschiede bezüglich der Ausstattung von Zellen die zur Transformation in Renin bildenden Zellen befähigt sind (Sequeira Lopez et al., 2004). Dies erscheint jedoch auch eher unwahrscheinlich, da Unterschiede der Reninexpression in der sich entwickelnden Mäuseniere nicht beschrieben werden, wobei geschlechtsspezifische Unterschiede noch nicht genauer beleuchtet wurden (Sauter et al., 2007). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die männlichen Tiere robuster sind und weniger sensibel auf Stress und die Ernährung mit Niedrigsalzfutter sowie auf die Behandlung mit Enalapril reagieren als die weiblichen Tiere. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Salzzufuhr den systemischen Blutdruck erhöht und dieser Einfluss auf das RAAS nimmt (Schweda et al., 2015). Es konnte gezeigt werden,

dass bis zu 30 % der Individuen einer Population als Reaktion auf Stress mit der Ausbildung einer Salz-sensitiven Hypertonie reagieren (Stewart et al., 2015; Franco and Oparil, 2006). Des Weiteren hat die Arbeitsgruppe um Schnermann, 2007, festgestellt, dass sich Plasmaninkonzentrationen mehr zwischen Individuen als innerhalb eines Individuums unterscheiden (Kim et al., 2007b). Es scheint somit wahrscheinlich, dass das RAAS individuell unterschiedlich sensibel auf eine Stimulation reagiert, möglicherweise auch geschlechtsabhängig. Zur abschließenden Klärung dieser neu aufgetretenen Fragen ist weitere Forschung nötig. Mit  $AT_1$ -Rezeptorblockern könnte man die geschlechtsspezifische Ausstattung mit Zellen, die zur Transformation in Renin bildenden Zellen befähigt sind, untersuchen, da hierdurch eine stärkere Stimulierung des RAAS möglich ist. Des Weiteren können Blutdruck- und Gewichtsbestimmung bei gleichem Versuchsaufbau deren individuellen Einfluss auf die Stimulation des RAAS zeigen. Sollte beispielsweise der Blutdruck der Männchen, unter Stimulation des RAAS, über dem der Weibchen liegen, wäre dies eine schlüssige Erklärung für die vorhandene aber unter dem Niveau der Weibchen liegende Stimulation. Ein generell, im Vergleich zu den Weibchen, erhöhter Blutdruck, könnte für die bessere Kompensation der Behandlung mit Nidrigsalzfutter und Enalapril verantwortlich sein. Dies würde Fragen bezüglich der Reninsekretion aufwerfen, da innerhalb der Untersuchungen unstimulierter Tiere in der 3D-Rekonstruktionen wie den histologischen Aufnahmen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Quantität und Lokalisation der Reninzellverteilung festgestellt wurden. Die festgestellte schwächere Stimulierbarkeit der Männchen im Vergleich zu den weiblichen Tieren, war nicht zu erwarten, wirft neue Fragen auf und bietet Raum für weitere Forschung. Besonderes Interesse gilt der Frage, was es den männlichen Tieren ermöglicht, die Ernährung mit Nidrigsalzfutter und Behandlung mit Enalapril zu kompensieren und ob hormonelle Faktoren, insbesondere die Sexualhormone, Einfluss auf die Reninsekretion haben.

### **4.1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Reninexpression unter Cyclooxygenase- 2-Blockade nach Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems**

Die Behandlung mit Nidrigsalzdiät und dem ACE-Hemmer Enalapril erfolgte wiederum um eine Stimulation des RAAS zu erreichen. Zur gleichen Zeit wurde den Tieren der selektive Cyclooxygenase-2-Hemmer SC-236 verabreicht, um die Bedeutung der COX-2 für die Stimulierbarkeit des RAAS zu erkennen. Die Stimulation des RAAS müsste sich wie im vorherigen Abschnitt festgestellt mit einer retrograden Rekrutierung Renin bildender Zellen sowie mit erhöhten Renin-mRNA-Leveln und Plasmaninkonzentrationen äußern (siehe 4.1.2). Fraglich ist in wie weit sich die Gabe von SC-236

auf die Stimulierbarkeit des RAAS auswirkt. Über die Hemmung der Prostaglandinsynthese ist, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, eine Abschwächung der Stimulierbarkeit des RAAS vorstellbar (siehe 4.1.2). Die Forschungsgruppe um Schnermann, 2000, hat COX-2-Knockout-Mäuse auf deren basale Reninexpression sowie deren Reninexpression unter Nierigsalzdät untersucht. Dafür wurden Mikroschnitte von Gefäßbaumästen photographiert, deren Gefäße und Renin bildenden Zellen mittels Immunhistochemie farbig makiert wurden. 66 % der afferenten Arteriolen von Wildtyp-Mäusen waren Renin positiv, während in COX-2-Knockout-Mäusen nur 36 % der afferenten Arteriolen Renin positiv waren. Unter Nierigsalzdät wurden nahezu alle afferenten Arteriolen der Wildtyp-Mäuse Renin positiv, während sich das Reninexpressionsmuster der COX-2-Knockout-Mäuse nicht veränderte. Die Messung der Reninaktivität an einzeln seziierten Glomeruli kam zu folgendem Ergebnis. Die Reninaktivität unbehauelter Wildtyp-Mäuse betrug 764 mGU(mGoldblatt units))/Glomerulus und stieg unter Nierigsalzdät auf 2214 mGU/Glomerulus. Die Reninaktivität unbehauelter COX-2-Knockout-Mäuse betrug 188 mGU/Glomerulus und stieg unter Nierigsalzdät auf 547 mGU/Glomerulus (Tianxin Yang et al., 2000). Der COX-2-Knockout hat demnach zu einer Hemmung der Rekrutierung Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriolen als auch in juxtaglomerulärer Position geführt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass auch bei unstimuliertem RAAS, COX-2-Knockout-Mäuse eine geringere Anzahl Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriolen sowie in juxtaglomerulärer Position aufweisen. Die Arbeitsgruppen um Armin Kurtz beschäftigen sich ebenfalls mit den Mechanismen der retrograden Rekrutierung Renin bildender Zellen unter stimuliertem RAAS. Ein Teil ihrer Forschung befasst sich mit der Frage in wie weit NO (Stickstoffmonoxid) eine Rolle innerhalb der Rekrutierung Renin bildender Zellen spielt. Es wurden Wildtyp-Mäuse und Mäuse mit einem Knockout der NO sensiblen Guanylat Cyclase untersucht. Das RAAS der Tiere wurde über drei Wochen durch Nierigsalzdät und Gabe eines ACE-Inhibitors stimuliert. Bei beiden Tierreihen war in der 3D-Rekonstruktion keine Rekrutierung entlang der afferenten Arteriolen sichtbar und die Hypertrophie in juxtaglomerulärer Position war vermindert. Endothelabhängiges NO scheint demnach für die Rekrutierung Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriolen notwendig zu sein, wobei mehr von einer sensitivierenden als von einer regulatorischen Funktion ausgegangen wird (Neubauer et al., 2013). Dies wirft die Frage auf, ob die Hypertrophie in juxtaglomerulärer Position bei stimuliertem RAAS möglicherweise über COX-2 abhängige Prostaglandine vermittelt wird. Dafür spricht, dass eine Nierigsalzdät kombiniert mit einem ACE-Hemmer zu einer zehnfachen Erhöhung der COX-2-Expression innerhalb der Macula densa führt, was eine erhöhte Prostaglandinproduktion in dieser Situation vermuten lässt (Castrop et al., 2003). Die Untersuchungen dieser Arbeit kamen zu folgendem Ergebnis. Betrachtet man die 3D-Rekonstruktionen und histologischen Aufnahmen, der mit Nierigsalzdät, Enalapril und SC-236

behandelten Tiere, stellt sich ein, mit den Ergebnissen der mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten Tiere, vergleichbares Bild dar und. Bei den weiblichen Tieren lässt sich eine deutliche retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen feststellen. Es zeigen sich zwei Arten Renin bildender Zellen, diese treten zum einen im Verlauf der afferenten Arteriolen deutlich vermehrt auf und zum andern zeigt sich in juxtaglomerulärer Position eine deutliche Clusterbildung (Abb. 3.21-3.24). Die Ergebnisse der Männchen weichen von denen der Weibchen ab. Wie bei der Behandlung mit Nidrigsalzdiät und Enalapril, fällt auch bei der zusätzlichen Behandlung mit SC-236 die Rekrutierung Renin bildender Zellen deutlich geringer als bei den Weibchen aus (Abb. 3.27-3.30). Betrachtet man die Geschlechter isoliert, kann man keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit, hervorgerufen durch SC-236, feststellen. Die Ergebnisse von Schnermann, 2000, konnten demnach nicht reproduziert werden, da eine Rekrutierung Renin bildender Zellen unter COX-2-Hemmung sowohl in juxtaglomerulärer Position als auch entlang der afferenten Arteriolen möglich war. Auch eine verminderte Anzahl Renin bildender Zellen bei unstimuliertem RAAS wurde innerhalb dieser Arbeit nicht festgestellt, siehe 4.1.1. Möglicherweise hat der COX-2-Knockout für Abweichungen, die über die Funktion der COX-2 hinausgehen bewirkt, was zu abweichenden Ergebnissen verglichen mit einer pharmakologischen Blockade der COX-2 führt. Eine mögliche Vermittlung der Hypertrophie in juxtaglomerulärer Position durch COX-2 abhängige Prostaglandine erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, da diese unter COX-2 Hemmung statt gefunden hat.

Neben den histologischen Auswertungen wurden auch die Renin-mRNA-Level und Plasareninkonzentrationen untersucht (Abb. 3.25-3.26 und 3.31-3.32). Die Arbeitsgruppe um Harris, 2001, hatte untersucht in wie weit sich das RAAS von COX-2-Knockout-Mäusen mittels des ACE-Inhibitors Captopril stimulieren lässt. Die Behandlung mit Captopril führte bei der Kontrollgruppe (Wildtyp-Mäuse) zu einer Verfünffachung der Renin-mRNA-Level und zu einer Verdreifachung der Plasareninaktivität. Die COX-2-Knockout-Mäuse zeigten hingegen keine signifikanten Änderungen der Renin-mRNA-Level und der Plasareninkonzentrationen. Die basalen Renin-mRNA-Level und Plasareninaktivität unterschieden sich nicht zwischen den beiden Tierreihen (Cheng et al., 2001). Yang et al., 2000, kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Es wurden wiederum COX-2-Knockout-Mäuse untersucht. Diese wiesen um 60 % verminderte Renin-mRNA-Level im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf. Unter Stimulation mit Nidrigsalzfutter verdoppelte sich der Renin-mRNA-Level der Wildtyp-Mäuse während der, der COX-2-Knockout-Mäuse nicht anstieg (Yang et al., 2000). Neuere Studien kommen zu Ergebnissen, welche von denen von Cheng et al., 2001, und Yang et al., 2000, abweichen. Die Arbeitsgruppe um Schnermann hat ebenfalls COX-2-Knockout-Mäuse untersucht, wobei das RAAS mittels einer Nidrigsalzdiät und Enalapril stimuliert wurde (Kim et al., 2007). Betrachtet man die Renin-mRNA-Level der unstimulierten Tierreihen, dann

fällt auf, dass der der COX-2-Knockout-Mäuse nur 20 % des Wildtyps betrug. Unter Stimulation stiegen die Renin-mRNA-Level beider Tierreihen um das jeweils Dreifache des Ausgangswertes. Die Plasmareninkonzentration der COX-2-Knockout-Mäuse betrug 17 % des Wildtyps. Unter Stimulaiton verzwanzigfachte sich die Plasmarenin-konzentration des Wildtyps während die der COX-2-Knockout-Mäuse um das Fünfzehnfache anstieg (Kim et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Höcherl hat an Ratten untersucht, wie sich der selektive Cylooxygenasehemmer SC-58236 auf ein unstimuliertes und ein stimuliertes RAAS auswirkt (Matzdorf et al., 2007). Die Untersuchungen bei unstimuliertem RAAS kamen zu dem Ergebnis, dass die Plasmareninaktivität nach 3 Tagen Behandlung mit SC-58236 unverändert war, jedoch nach 5 Tagen Behandlung nur noch 55 % des Ausgangswertes betrug. Die Renin-mRNA-Level waren ebenfalls bis zum dritten Tag unverändert, sanken jedoch am fünften Tag auf 60 % des Ausgangswertes. Des Weiteren wurde die Wirkung von SC-58236 auf ein stimuliertes RAAS untersucht. Die Stimulation erfolgte mittels den ACE-Hemmern Captopril und Ramipril sowie mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker Candesartan. Die Behandlung mit Captopril, Ramipril und Candesartan führte zu einem Anstieg der Plasmareninaktivität um das 5,4; 8 und 8,5 fache. Unter zusätzlicher Behandlung mit SC-58236 wurde ein verminderter Anstieg der Plasmareninaktivität um das 2,6; 4,6; und 4,8 fache festgestellt. Des Weiteren führte die Behandlung mit Captopril, Ramipril und Candesartan zu einem Anstieg des Renin-mRNA-Levels um das 1,9; 3,8 und 5,6 fache. Die zusätzliche Behandlung mit SC-58236 führte zu einem verminderten Anstieg der Renin-mRNA-Level um 1,1; 2,7 und 3,2 fache (Matzdorf et al., 2007). Auch wenn Untersuchungen an Ratten nicht eins zu eins auf Mäuse übertragen werden können (siehe 4.1.2) liefern sie einen guten Anhaltspunkt. Die Studien von Kim et al., 2007, und Matzdorf et al., 2007, deuten darauf hin, dass eine Hemmung der COX-2 zu verminderten basalen Renin-mRNA-Levels und Plasmareninkonzentrationen führt, eine Stimulation jedoch auch unter Hemmung der COX-2 möglich ist. Eine Einflussnahme der COX-1 auf die dargestellten Mechanismen wurde von der Arbeitsgruppe um Harris, 2002, untersucht und verneint. Es wurden COX-1-Knockout-Mäuse untersucht, welche mit dem ACE-Hemmer Captopril und mit Captopril und dem selektiven COX-2-Hemmer SC-58236 behandelt wurden. Die Behandlung mit Captopril resultierte sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den COX-1-Knockout-Mäusen in einer Verfünffachung der Plasmareninaktivität und zu einer Verdopplung der Renin-mRNA-Level. Die zusätzliche Behandlung der beiden Mausreihen mit SC-58236 führte zu unveränderten Renin-mRNA-Levels und Plasmareninaktivitäten (Cheng et al., 2002). Dies steht im Einklang mit den Studien von Traynor et al., 1999, welche isolierte juxtaglomeruläre Apparate von Hasen untersucht haben. Es erfolgte eine Stimulation der Reninsekretion mittels reduzierter luminaler Kochsalzkonzentration. Die zusätzliche Behandlung mit dem COX-1-Inhibitor Valerylsalicylate hatte keinen Einfluss auf die Reninsekretion. Die Applikation des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 hingegen hob den



stimulatorischen Einfluss der verminderten luminalen Kochsalzkonzentration auf die Reninsekretion auf (Traynor et al., 1999). Die COX-1 scheint daher im Gegensatz zur COX-2 nicht unabdingbar für eine Stimulation des RAAS zu sein.

Die Analysen der mRNA- und Plasmareninkonzentration, der vorliegenden Arbeit, kamen zu folgendem Ergebnis: der Renin-mRNA-Level der unter Niedrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus ist um das achtfache im Vergleich zu der Wildtyp-Maus erhöht. Im Vergleich zu der unter Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden Wildtyp-Maus ist er um ein Fünftel verringert. Die Plasmareninkonzentration der unter Niedrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus ist um das sechzehnfache im Vergleich zu der Wildtyp-Maus erhöht im Vergleich mit der unter Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden Wildtyp-Maus lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Der Renin-mRNA-Level der Niedrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus ist um das 3,5 fache im Vergleich mit der Wildtyp-Maus erhöht, im Vergleich mit der unter Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden Wildtyp-Maus ist er um den Faktor 1,4 verringert. Die Plasmareninkonzentrationen der unter Niedrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236-Gabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus ist um das 5 fache im Vergleich mit der Wildtyp-Maus erhöht. Im Vergleich mit der unter Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden Wildtyp-Maus ist die Plasmareninkonzentration um ein Fünftel verringert. Das Ergebnis der Plasmareninkonzentrationen und Renin-mRNA-Level steht in Einklang mit den bildgebenden Ergebnissen. Es fand eine Stimulation des RAAS statt, wobei diese bei den weiblichen Tieren deutlich stärker ausgeprägt ist. Die zusätzliche Gabe von SC-236 resultierte in einem geringeren Anstieg der Plasmareninkonzentration und Renin-mRNA-Level, wobei es sich um eine Tendenz und nicht um eine signifikante Hemmung handelt.

Es lässt sich festhalten, dass die medikamentöse Hemmung der COX-2 sich nicht auf die Rekrutierung Renin bildender Zellen auswirkt, insbesondere konnte keine Abnahme der Rekrutierung in juxtaglomerulärer Position festgestellt werden. Auch auf die Reninzellverteilung und Anzahl bei unstimuliertem RAAS hat die Hemmung der COX-2 keinen Einfluss. Fraglich ist, weshalb ein COX-2-Knockout zu einer wesentlich stärkeren Hemmung der Renin-mRNA-Level und Plasmareninkonzentration führt als eine medikamentöse Hemmung. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der COX-2-Knockout zu Veränderungen führt, die über eine bloße COX-2-Hemmung hinaus gehen. Ein weiterer Ansatz wäre, dass die medikamentöse Hemmung der COX-2 durch eine reaktiv erhöhte COX-2-Expression kompensiert wird. Dies erscheint wahrscheinlich, da eine Niedrigsalzdiät kombiniert mit einem ACE-Hemmer zu einer zehnfachen Erhöhung der COX-2-Expression innerhalb der Macula densa führt was eine erhöhte Prostaglandinproduktion in dieser Situation vermuten lässt

## Diskussion

(Castrop et al., 2003). Kim et al., 2007, und Matzdorf et al., 2007, haben festgestellt, dass die Hemmung der COX-2 zu verminderten basalen Renin-mRNA-Leveln und Plasmarenininkonzentrationen führt, bei erhaltener Stimulierbarkeit des RAAS. Das kann anhand dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, wobei eine stärker erhaltene Stimulierbarkeit unter COX-2-Hemmung festgestellt wurde. Die gemessenen Renin-mRNA- und Plasmarenininkonzentrationen der stimulierten Tiere mit und ohne SC-236-Behandlung wichen nur unsignifikant voneinander ab. Es wurde jedoch eine hemmende Tendenz durch die Gabe von SC-236 festgestellt, was in Einklang mit vorausgegangenen Arbeiten stehen würde (Cheng et al., 2001; Yang et al., 2000; Kim et al., 2007; Matzdorf et al., 2007). Es erscheint somit möglich, dass sich ein stimuliertes RAAS nicht nur durch die Rekrutierung Renin bildender Zellen äußert. Es könnte auch eine erhöhte Genexpression und erhöhte Sekretion, möglicherweise COX-2 vermittelt, in Betracht kommen.

## 5. Zusammenfassung

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Frage welche Faktoren bei der Stimulierbarkeit des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) eine Rolle spielen. Eine Stimulation des RAAS äußert sich zum einen durch ein vermehrtes Auftreten Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriolen, was als retrograde Rekrutierung Renin bildender Zellen bezeichnet wird. Zum anderen treten die Reninzellen der stimulierten Maus in unmittelbarer Nähe zum Gefäßpol mehrschichtig auf, dies wird als Clusterbildung bezeichnet. Vorausgegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass Stickstoffmonoxid (NO) ein wesentlicher Faktor für die Rekrutierung Renin bildender Zellen entlang der afferenten Arteriole ist. Die Clusterbildung besteht jedoch NO unabhängig. Da eine erhöhte Cyclooxygenase 2 (COX-2) Expression innerhalb der Macula densa bei stimuliertem RAAS nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage, in wie weit diese Einfluss auf die Clusterbildung nimmt. Zudem kommen neuere Studien zu dem Schluss, dass die Hemmung der COX-2 zu verminderten basalen Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentration führt, eine leicht eingeschränkte Stimulierbarkeit jedoch weiter besteht.

Innerhalb dieser Arbeit wurden sechs Gruppen unterschiedlich behandelte Tiere untersucht. Von jeder Gruppe wurden histologische Nierenserienschnitte angefertigt. Diese wurden gegen Renin und Glattmuskelaktin gefärbt. Anschließend erfolgte eine 3D-Rekonstruktion eines Gefäßastes der verschiedenen Tiere. Zudem wurden die Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentration gemessen.

Eine Referenzgruppe blieb unbehandelt. Eine weitere Gruppe wurde mit dem selektiven COX-2 Inhibitor SC-236 behandelt. Diese wies keine Unterschiede im Vergleich zu der Referenzgruppe auf. Die COX-2 nimmt somit keinen Einfluss auf die Anzahl und Lage der Renin bildenden Zellen, bei unstimuliertem RAAS. Wenn man dieses Ergebnis mit vorausgegangenen Studien in Einklang bringen will, welche verminderte basale Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentration festgestellt haben, müssen diese auf Zelluläre Mechanismen, wie eine verminderte Genexpression oder Sekretion zurückgeführt werden.

Des Weiteren wurde eine Gruppe mit Nidrigsalzfutter und dem ACE-Inhibitor Enalapril behandelt. Dies geschah um eine Stimulation der RAAS zu erzielen. Da weibliche Tiere eine deutlich stärkere Rekrutierung Renin bildender Zellen im Vergleich zu den männlichen Artgenossen aufwiesen, wurde zwischen den Geschlechtern unterschieden. Beide Geschlechter wiesen deutlich erhöhte Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentration im Vergleich zur Referenzgruppe auf. Die Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentration der Weibchen lagen jedoch deutlich über denen der Männchen. Dies

## Zusammenfassung

wurde bisher nicht beschrieben. Es scheint erwiesen, dass das RAAS, bei gleichen Umweltbedingungen, individuell unterschiedlich stark auf eine Stimulation reagiert. Möglich wären hormonelle Einflüsse oder Blutdruckunterschiede der beiden Geschlechter. Was es letztendlich den männlichen Tieren ermöglicht hat die Ernährung mit Niedrigsalzfutter und Behandlung mit Enalapril zu kompensieren konnte innerhalb dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden und bietet Raum für weitere Forschung.

Die vierte Gruppe wurde mit Niedrigsalzfutter ernährt und zusätzlich mit Enalapril und SC-236 behandelt. Die Gabe von SC-236 erfolgte um die Relevanz der COX-2 für die Rekrutierung Renin bildender Zellen zu erkennen. Besonderes Augenmerk lag auf der Rekrutierung in juxtaglomerulärer Position. Auch hier wurde zwischen den Geschlechtern unterschieden. Es zeigte sich eine, zu den nur mit Niedrigsalzdiät und Enalapril behandelten Tieren, vergleichbare Rekrutierung Renin bildender Zellen. Sowohl entlang der afferenten Arteriole als auch in juxtaglomerulärer Position fand eine Rekrutierung statt. Die Clusterbildung wurde demnach nicht durch Hemmung der COX-2 unterbunden. Die männlichen Tiere wiesen jedoch wieder eine deutlich verminderte Rekrutierung im Vergleich zu den Weibchen auf. Die Renin-mRNA- und Plasmarenin-konzentrationen fielen tendenziell unter SC-236-Gabe geringer aus als die der nur mit Niedrigsalzdiät und Enalapril behandelten Tiere. Im Vergleich zur Referenzgruppe jedoch immer noch deutlich erhöht und die Renin-mRNA- und Plasmarenin-konzentrationen der Weibchen lagen deutlich über denen der Männchen, was sich gut mit vorausgegangenen Studien vereinbaren lässt und auf eine verminderte Genexpression und Sekretion hindeutet.

Es lässt sich festhalten, dass die medikamentöse Hemmung der COX-2 sich nicht auf die Rekrutierung Renin bildender Zellen auswirkt, insbesondere konnte keine Abnahme der Rekrutierung in juxtaglomerulärer Position festgestellt werden. Es wurde jedoch eine hemmende Tendenz auf die Renin-mRNA- und Plasmareninkonzentration durch die Gabe von SC-236 festgestellt, was in Einklang mit vorausgegangenen Arbeiten steht. Somit lässt sich erkennen, dass sich ein stimuliertes RAAS nicht nur durch die Rekrutierung Renin bildender Zellen äußert. Es könnte auch eine erhöhte Genexpression und erhöhte Sekretion, möglicherweise COX-2 vermittelt, in Betracht kommen. Darüber hinaus konnten Geschlechtsunterschiede bezüglich der Rekrutierung Renin bildender Zellen, bei stimuliertem RAAS, festgestellt werden, was Raum für weitere Forschung eröffnet.

## 6. Literatur und Abbildungsverzeichnis:

### Abbildungsverzeichnis:

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2005). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, Auflage 3, S. 583-586.

Aldehni F, Tang T, Madsen K, Plattner M, Schreiber A, Friis UG, Hammond HK, Han PL, Schweda F. (2011). *Stimulation of renin secretion by catecholamines is dependent on adenylyl cyclases 5 and 6*. Hypertension 57:460–468.

Alund M. (1980). *Juxtaglomerular cell activity during hemorrhage and ischemia as revealed by quinacrine histofluorescence*. Acta Physiol Scand 110: 113–121.

Aoyagi T, Izumi Y, Hiroyama M, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Sanbe A, Miyazaki H, Fujiwara Y, Nakayama Y, Kohda Y, Yamauchi J, Inoue T, Kawahara K, Saito H, Tomita K, Nonoguchi H, Tanoue A. (2008). *Vasopressin regulates the renin-angiotensinaldosterone system via V1a receptors in macula densa cells*. Am J Physiol Renal Physiol 295: F100–F107.

Ardailou R. (1999). *Angiotensin II receptors*. J Am Soc Nephrol 10 Suppl 11.

Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. (1995). *Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney*. Am J Physiol 268:F885-98.

Barajas L, Liu L, Powers K. (1992). *Anatomy of the renal innervations: intrarenal aspects and ganglia of origin*. Can J Physiol Pharnaco 70:735-749.

Barajas, L. (1979). *Anatomy of the juxtaglomerular apparatus*. Am. J. Physiol. 236: F240–F246.

Baumann H, Wang Y, Richards CD, Jones CA, Black TA, Gross KW. (2000). *Endotoxin-induced renal inflammatory response. Oncostatin M as a major mediator of suppressed renin expression*. J Biol Chem 275: 22014-22019.

Beavo JA. (1995). *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms*. Physiol Rev 75:725-48.

Beierwaltes WH. (1997). *Macula densa stimulation of renin is reversed by selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physioö 272: R1359-R1364.

- Beierwaltes WH, Prada J, Carretero OA. (1985). *Effect of glandular kallikrein on renin release in isolated rat glomeruli*. Hypertension 7: 27-31.
- Bischoff A, Avramidis P, Erdbrugger W, Munter K, Michel MC. (1997). *Receptor subtypes Y1 and Y5 are involved in the renal effects of neuropeptide Y*. Br J Pharmacol 120: 1335-43.
- Bock HA, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. (1992). *Pressure dependent modulation of renin release in isolated perfused glomeruli*. Kidney Int 41:275-280.
- Bonventre JV. (1999). *The 85-kD cytosolic phospholipase A2 knockout mouse: a new tool for physiology and cell biology*. J Am Soc Nephrol, 10, pp. 404–412.
- Bosse HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S. (1995). *Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli*. Am J Physiol 269:F793–F805.
- Breyer MD, Breyer RM. (2000). *Prostaglandin E receptors and the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol 279:F12-23.
- Buhrle CP, Nobiling R, Mannek E, Schneider D, Hackenthal E, Taugner R. (1984). *The afferent glomerular arteriole: immunocytochemical and electrophysiological investigations*. J Cardiovasc Pharmacol 6, Suppl 2: S383–S393.
- Bunag RD, Page IH, McCubbin JW. (1967). *Inhibition of renin release by vasopressin and angiotensin*. Cardiovasc Res 1: 67-73.
- Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI, Cooper ME, Johnston CI. (2005). *Myocardial infarction increases ACE 2 expression in rat and humans*. Eur Heart J 26: 369-375.
- Burson JM, Aguilera G, Gross KW, Sigmund CD. (1994). *Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse*. Am. J. Physiol.; 267:260–267.
- Butt E, Nolte C, Schulz S, Beltman J, Beavo JA, Jastorff B, Walter U. (1992). *Butt E, Nolte C, Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-parachlorophenylthio-cGMP*. Biochem Pharmacol 43: 2591–2600.
- Cantin M, Araujo-Nascimento MD, Benchimol S, Desormeaux Y. (1977). *Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study*. Am J Pathol 87: 581–602.

- Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ. (1997). *Biomechanical coupling in renin-releasing cells*. J Clin Invest 100:1566–1574.
- Carey RM, Siragy HM. ((2003)). *Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation*. Endocr Rev; 24(3):261–7110.
- Casellas D, Dupont M, Bouriquet N,. (1994). *Anatomic pairing of afferent arterioles and renin cell distribution in rat kidneys*. Am J Physiol 267:F931-F936.
- Castrop H. (2007). *Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine*. Acta Physiol (Oxf) 189:3–14.
- Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. (2010). *Physiology of kidney renin*. Physiol Rev 90: 607-673.
- Castrop H, Kammerl M, Mann B, Jensen BL, Kramer BK, Kurtz A. (2000). *Cyclooxygenase-2 and neuronal nitric oxide synthase expression in the renal cortex are not interdependent in states of salt deficiency*. Pflugers Arch 441:235-240.
- Castrop H, Klar J, Wagner C, Hocherl K, Kurtz A. (2003). *General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system*. Am J Physiol Renal Physiol. 284:F518–F524.
- Castrop H, Lorenz JN, Hansen PB, Friis U, Mizel D, Oppermann M, Jensen BL, Briggs J, Skott O, Schnermann J. (2005). *Contribution of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl- cotransporter (NKCC1/BSC2) to renin secretion*. Am J Physiol Renal Physiol 289: F1185-92.
- Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A, Schnermann J. (2004 b). *Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion*. Am J Physiol Renal Physiol 286:F848-57.
- Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A. (2001). *Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion*. J Am Soc Nephrol 12:867-874.
- Chappell MC. (2007). *Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure?* Hypertension, 50(4):596–910.

- Chappell MC. (2012). *Nonclassical renin-angiotensin system and renal function*. Compr Physiol, 2(4):2733–5210.
- Chen K, Carey LC, Valego NK, Liu J, Rose JC. (2005). *Thyroid hormone modulates renin and ANG II receptor expression in fetal sheep*. Am J Physiol Integr Comp Physiol 289: R1006-R1014.
- Chen L, Kim SM, Oppermann M, Faulhaber-Walter R, Huang Y, Mizel D, Chen M, Lopez ML, Weinstein LS, Gomez RA, Briggs JP, Schnermann J. (2007). *Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein Gsalpha in juxtaglomerular cells*. Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein Gsalpha in juxtaglomerular cells. F27-37
- Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, Mac Kanna JA, Harris RC. (1999). *Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression*. J Clin Invest 103:953-961.
- Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, McKanna JA, Harris RC. (2001). *Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition*. Am J Physiol Renal Physiol 280:F449–56.
- Cheng HF, Wang SW, Zhang MZ, McKanna JA, Breyer R, Harris RC. (2002). *Prostaglandins that increase renin production in response to ACE inhibition are not derived from cyclooxygenase-1*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283: R638-R646.
- Chiu N, Park I, Reid IA. (1996). *Stimulation of renin secretion by the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram*. J Pharmacol Exp Ther 276:1073-7.
- Chiu YJ, Hu SH, Reid IA. (1999). *Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects*. J Pharmacol Exp Ther 290:16-9.
- Churchill PC, Churchill MC. (1985). *A1 and A2 adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices*. J Pharmacol Exp Ther 232: 589-94.
- Clark AF, Sharp MG, Morley SD, Fleming S, Peters J, Mullins JJ. (1997). *Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology*. J Biol Chem 272: 18185–18190.
- Cohen Y, Rahamimov R, Naveh-Many T, Silver J, Rahamimov R. (1997). *Cohen Y, Rahamimov R, Naveh-Many Where is the "inverting factor" in hormone secretion from parathyroid cells?* Am J Physiol Endocrinol Metab 273:E631-E637.



- Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP. (2006). *Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney*. Proc Natl Acad Sci USA, 103(47):17985–90. doi:10.1073/pnas.0605545103.
- Cruciat CM, Ohkawara B, Acebron SP, Karaulanov E, Reinhard C, Ingelfinger D. (2010). *Requirement of prorenin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling*. Science, 327(5964):459–63. doi:10.1126/science.1179802.
- Danser AHJ, Derkx FHM, Schalekamp MADH, Hense HW, Riegger GAJ, Schunkert H. (1998). *Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans*. J Hypertens.; 16: 853–862.
- Davis JO, Freeman RH. (1976). *Mechanisms regulating renin release*. Physiol Rev 56: 1–56.
- Della Bruna, R., Pinet, F., Corvol, P. & Kurtz, A. (1992). *Calmodulin antagonists stimulate renin secretion and inhibit renin synthesis in vitro*. Am J Physiol 262, F397–F402.
- DellaBruna R., Kurtz A., Corvol P., Pinet F. (1993). *DellaBruna R., KurtRenin mRNA quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells: Short term effects of cAMP on renin mRNA and secretion*. Circ Res 73: 639-648.
- DiBona GF. (2000). *Neural control of the kidney: functionally specific*. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, 279: R1517–R1524.
- Dickinson, DP, Gross, KW, Piccini, N, Wilson, CM. (1984). *Evolution and variation of renin genes in mice*. Genetics, 108: 651-667.
- Ferrão, F, M, Lara, L, S, Lowe, J. (2014). *Renin-angiotensin system in the kidney: What is new?* World J Nephrol; 3(3): 64-76.
- Ferrario CM, Varagic J. (2010). *The ANG-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function*. Am J Physiol Renal Physiol, 298(6):F1297–30510.
- Frank, Schweda. (2015). *Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system*. Pflugers Arch - Eur J Physiol 467:565–576.
- Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreasen D, Hansen PB, Skott O. (2002). *Friis UG, Jensen BL, SeControl of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases*. Circ Res 90:996-1003.

Friis UG, Stubbe J, Uhrenholt TR, Svenningsen P, Nusing RM, Skott O, Jensen BL. (2005). *Friis UG, Stubbe J, Uhrenholt TR, SvenProstaglandin E 2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells.* . Am J Physiol Renal Physiol 289:F989-97.

Friis, UG, Madsen, K, Stubbe, J, Hansen, PBL, Svenningsen, Bie, P, Skott, O, Jensen, BL. (2013). *Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells.* Eur J Physiol, 465:25-37.

Fuchs S, Germain S, Philippe J, Corvol P, Pinet F. (2002). *FuchsExpression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promotor/LacZ transgenic mouse.* Am J Pathol 161(2):717-725.

Fyhrquist F, Saijonmaa O. (Fyhrquist 2008). *Renin-Angiotensin system revisited.* J Intern Med, 264:224-236.

Gambaryan S, Hausler C, Markert T, Pohler D, Jarchau T, Walter U, Haase W, Kurtz A, Lohmann SM. (1996). *Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression.* J Clin Invest 98: 662-70.

Gambaryan S, Wagner C, Smolenski A, Walter U, Poller W, Haase W, Kurtz A, Lohmann SM. (1998). *Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells.* Proc Natl Acad Sci USA 95:9003-8.

Gerber JG, Nies AS. (1983). *The role of histamine receptors in the release of renin.* Br J Pharmacol 79: 57-61.

Gomez, R.A., and Norwood, V.F. (1995). *Developmental consequences of the renin-angiotensin system.* Am. J. Kidney Dis. 26, 409–431.

Gonzalez AA, Luffman C, Bourgeois CR, Vio CP, Prieto MC. (2013). *Gonzalez AAngiotensin II-independent upregulation of cyclooxygenase-2 by activation of the (Pro)renin receptor in rat renal inner medullary cells.* Hypertension, 61(2):443–9. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.

Gonzalez-Villalobos RA, Janjoulia T, Fletcher NK, Giani JF, Nguyen MT, Riquier-Brison AD. (2013). *The absence of intrarenal ACE protects against hypertension.* J Clin Invest, 123(5):2011–23. doi:10.1172/JCI65460.

- Green T, Gonzales AA, Mitchell KD, Navar LG. (2012). *The Complex Interplay between COX-2 and Angiotensin II in Regulating Kidney Function*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 21(1): 7–14.
- Greenberg SG, He XR, Schnermann JB, Briggs JP. (1995). *Greenberg, SEffect of nitric oxide on renin secretion. I. Studies in isolated juxtaglomerular cells*. *Am. J. Physiol.* 268 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 37): F948–F952, 1995.
- Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F. (2006). *Grünberger The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6*. *Circ Res* 99: 1197-206.
- Gwathmey TM, Alzayadneh EM, Pendergrass KD, Chappell MC. (2012). *Novel roles of nuclear angiotensin receptors and signaling mechanisms*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302(5):R518–3010.
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. (1990). *Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion*. *Physiol Rev* 70: 1067–1116.
- Hal JEL. (2003). *Historical perspective of the renin-angiotensin system*. *Mol Biotechnol* 24: 27–39.
- Hansen, PB, Yang, T, Huang, Y, Mizel, D, Briggs, J, Schnermann, J. (2004). *Plasma renin in mice with one or two renin genes*. *Acta Pysiol Scand*, 181: 431-437.
- Hao CM, Breyer MD. (2007). *Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney*. *Kidney Int* 71:1105-15.
- Harding P, Carretero OA, Beierwaltes WH. (2000). *Chronic cyclooxygenase-2 inhibition blunts low - sodium-stimulated renin without changeing haemodynamics*. *J Hypertens* 18:1107-1113.
- Harris R C. (2008). *An update on cyclooxygenase-2 expression and metabolites in the kidney*. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17(1):64-9.
- Harris R C. (2006). *COX-2 and the kidney*. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 (Suppl 1): S37–S42.
- Harris RC. (2013). *Physiologic and pathophysiologic roles of cyclooxygenase-2 in the kidney*. *Trans Am Clin Climatol Assoc.*;124:139-51.
- Harris RC. (2013). *Physiologic and Pathophysiologic Roles of Cyclooxygenase-2 in the Kidney*. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 124: 139–151.

- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. (1994). *Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction*. J Clin Invest 94:2504–2510.
- Harrison-Bernard LM, Zhuo J, Kobori H, Ohishi M, Navar LG. (2002). *Intrarenal AT1 receptor and ACE binding in ANG II-induced hypertensive rats*. Am J Physiol Renal Physiol; 282(1):F19–25.
- Hautmann M, Friis UG, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, Otto C, Schutz G, Schweda F. (2007). *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors*. J Am Soc Nephrol 18:1150-6.
- Hoehler K, Kammerl MC, Schumacher K. (2002). *Role of prostanoids in regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by salt intake*. Am J Physiol Renal Physiol. 283:F294–301.
- Höcherl K, Kammerl MC, Schumacher K, Endemann D, Grobecker HF, Kurtz A. (2002 b). *Höcherl K, Kammerl MC, Schumacher K, EnRole of prostanoids in regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by salt intake*. Am J Physiol Renal Physiol 283:F294-301.
- Hoehler K, Wolf K, Castrop H, Ittner KP, Bucher M, Kees F, Grobecker HF, Kurtz A. (2001). *Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked*. Pflugers Arch 442:821-827.
- Holmer S, Rinne B, Eckardt KU, Le Hir M, Schricker K, Kaissling B, Riegger G, Kurtz A. (1994). *Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney*. Am J Physiol Renal Fluid Elektrolyte Physiol 266: F738-F745.
- Holmer SR, Eckardt KU, LeHir M, Shricker K, Riegger G , Kurtz A. (1993). *Influence of dietary salt intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats*. Pflugers Arch 425: 62-67.
- Horky K, Rojo-Ortega JM, Boucher R, Genest J. (1973). *Role of renal lymph in relation to the renin angiotensin system in the rat*. Physiol Bohemoslov 22: 1-9.
- Horky K, Rojo-Ortega JM, Rodriguez N, Boucher R, Genest J. (1971). *Renin, renin substrate and angiotensin I-converting enzyme in blood of rats*. Am J Physiol 220: 307-311.
- HR, Herschman. (1996). *Prostaglandin synthase 2*. Biochim Biophys Acta, 1299, pp. 125–140.
- Hsueh WA, Baxter JD. (1991). *Human prorenin*. Hypertension; 17:469–479.

- Ichihara A, Suzuki H, Murakami M, Naitoh M, Matsumoto A, Saruta T. (1995). *Ichihara A, Suzuki H, Murakami* Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells. *Eur J Endocrinol* 133:569-77.
- Imbs JL, Schmidt M, Schwartz J. (1975). *Effect of dopamine on renin secretion in the anesthetized dog.* *Eur J Pharmacol* 33:151-7.
- Jane, Weisert. (1990). *Zur mikroskopischen Anatomie der Niere von Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Hamster, eine vergleichende Literaturstudie.* München. S. 6., S.73.
- JC, Parmentier M. Inagami T. Pochet R. Desclin. (1983). *Pituitary dependent renin-like immunoreactivity in the rat testes.* *Endocrinology*:112.1318-1323.
- Jensen BL, Kramer BK, Kurtz A. (1997). *Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells.* *Hypertension* 29:1148-55.
- Jensen BL, Lehle U, Muller M, Wagner C, Kurtz A. (1998). *Interleukin-1 inhibits renin gene expression in As4.1 cells but not in native juxtaglomerular cells.* *Pfluger Arch* 436: 673-678.
- Jensen BL, Schmid C, Kurtz A. (1996). *Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells.* *Am J Physiol* 271:F659-69.
- Jensen, BL, Kurtz, A. (1997). *Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake.* *Kidney Int* 1997. 52:1242-1249.
- JT, Fitzsimons. (1998). *Angiotensin, thirst, and sodium appetite.* *Physiol Rev* 78: 583–686.
- Junqueira, LC; Carneiro, J; Gratzl, M. (2005). *Histologie.* Springer Medizin Verlag Heidelberg. 6. Auflage, S.17-18.
- Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M, Takemitsu T, Nabi AH, Uddin MN. (2007). *Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats.* *J Am Soc Nephrol*, 18(6):1789–9510.
- Keeton TK, Campbell WB. (1980). *The pharmacologic alteration of renin release.* *Pharmacol Rev* 32: 81-227.
- Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, Oppermann M, Huang Y, Mizel D, Briggs JP, Schnermann J. (2007). *Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta 1- and beta 2-adrenergic receptors.* *Hypertension* 50: 103-109.

Kim SM, Chen L, Mizel D, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J. (2007 b). *Low plasma renin and reduced renin secretory responses to acute stimuli in conscious COX-2-deficient mice*. Am J Physiol Renal Physiol 292:F415-22.

Klar J, Vitzthum H, Kurtz A. (2004). *Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells*. Am J Physiol Renal Physiol 286: F349-F355.

Klinke, R, Pape, H, C, Silbernagel, S. (2005). *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thime Verlag KG, Auflage 5, S.208, 328, 332, 389, 390, 787-790.

Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. (2001). *Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension*. Hypertension; 37(5):1329–3510.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. (2007). *The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease*. Pharmacol Rev; 59(3):251–8710.

Kon Y. (1999). *Comparative study of renin containing cells. Histological approaches*. J Vet Med Sci 61:1075-1086.

Kurtz A. (1989). *Cellular control of renin secretion*. Rev. Physiol. Biochem. Pharmac. 113:2-40.

Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Bauer C. (1988). *Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release*. Kidney Int 33:798–803.

Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Taugner R, Bauer C. (1986). *Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J. Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process*. Proc Natl Acad Sci U S A 83:4769–4773.

Kurtz A, Della Bruna R, Pratz J, Caverio I. (1988 b). *Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamin receptors mediating renin release*. J Cardiovasc Pharmacol 12: 658-63.

Kurtz A, Kaissling B, Busse R, Baier W. (1991). *Endothelial cells modulate renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells*. J Clin Invest 88: 1147-54.

Kurtz A, Muff R, Born W, Lundberg JM, Millberg BI, Gnadinger MP, Uehlinger DE, Weidmann P, Hokfelt T, Fischer JA. (1988c). *Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion*. J Clin Invest 82:538-43.

Kurtz A, Pfeilschifter J, Bauer C. (1984). *Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane?* Biochem Biophys Res Commun 124:359-66.

Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Buhle C, Nobiling R, Taugner R, Hackenthal E, Bauer C. (1986c). *Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors*. Am J Physiol 250:C563-71.

Kurtz A, Wagner C. (1999). *Cellular control of renin secretion*. The Journal of Experimental.

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

Kurtz L, Schweda F, de Wit C, Kriz W, Witzgall R, Warth R, Sauter A, Kurtz A, Wagner C. (2007). *Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium*. J Am Soc Nephrol 18(4):1103-11.

Kurtz, A., Götz KH, Hamann M, Wagner C. (1998). *Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4743–4747, 1998.

Lai EY, Wang Y, Persson AE, Manning RD Jr, Liu R. (2011). *Lai EY Pressure induces intracellular calcium changes in juxtaglomerular cells in perfused afferent arterioles*. Hypertens Res 34:942–948.

Leonhardt H, Tillman B, Töndury G. (1987). *Lehrbuch und Atlas, Bd.II Innere Organe*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, S.279.

Levens NR, Peach MJ, and Carey RM. (1981). *Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the control of renal function*. Circ Res 48: 157167.

Li XC, Campbell DJ, Ohishi M, Yuan S, Zhuo JL. (2006). *AT1 receptor-activated signaling mediates angiotensin IV-induced renal cortical vasoconstriction in rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 290(5):F1024–3310.

Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. (2002). *Li YC, Kong J, W1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the reninangiotensin system*. J Clin Invest 110: 229–238.

Liu A, Ballermann BJ. (1998). *TGF-beta type II receptor in rat renal vascular development: localization to juxtaglomerular cells*. Kidney Int 53:716-725.

Liu L, Gonzalez AA, McCormack M, Seth DM, Kobori H, Navar LG. (2011). *Increased renin excretion associated with augmented urinary angiotensin (Ang) II levels in chronic angiotensin II-infused hypertensive rats*. Am J Physiol Renal Physiol; 301(6):F1195–20110.

Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skott O, Briggs JP. (1991). *Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport*. Am J Physiol 260:F486–F493.

Lüllmann-Rauch, Renate. (2006). *Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2. Auflage, S. 437, 438, 440-442, 444, 448, 455.

Machura K, Neubauer B, Steppan D, Kettl R, Grobeta A, Kurtz A. (2012). *Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol 302:F1278–F1285.

Machura K, Neubauer B, Steppan D, Kettl R, Groß A, Kurtz A. (2012). *Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol. 302(10):F1278-85.

Machura, K, Neubauer, B, Müller, H, Kurtz, A, Kurtz, L. (2014). *Connexin 40 is dispensable for vascular renin cell recruitment but is indispensable for vascular baroreceptor control of renin secretion*. European Journal of Physiologie, 10.1007/s00424-014-1615-y.

Mann B, Hartner A, Jensen BL, Kammerl M, Kramer BK, Kurtz A. (2001). *Furosemide stimulates macula densa cyclooxygenase-2 expression in rats*. Kidney Int 59:62–68.

MMatsusaka T, Nishimura H, Utsunomiya H, Kakuchi J, Niimura F, Inagami T, Fogo A, Ichikawa I. (1996). *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: 1867-77.

Matzdorf C, Kurtz A, Hocherl K. (2007). *COX-2 activity determines the level of renin expression but is dispensable for acute upregulation of renin expression in rat kidneys*. Am J Physiol Renal Physiol 292:F1782-90.

Mercure C, Jutras I, Day R, Seidah NG, Reudelhuber TL. (1996). *Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex*. Hypertension 28: 840–846.

Moe O, Tejedor A, Campbell WB, Alpern RJ, Henrich WL. (1991). *Effects of endothelin on in vitro renin secretion*. Am J Physiol 260:E521-5.

Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Klahr S. (1993). *Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney*. Kidney Int. 45:998-1005.



- Mullins LJ, Payne CM, Kotelevtseva N, Brooker G, Fleming S, Harris S, Mullins JJ. (2000). *Granulation rescue and developmental marking of juxtaglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus*. J Biol Chem 275: 40378–40384.
- Münter, K, Hackenthal, E. (1989). *The effects of endothelin on renovascular resistance and renin release*. J Hypertens Suppl 7, S276–S277.
- Nafz B, Berthold H, Ehmke H, Hackenthal E, Kirchheim HR, Persson PB. (1997). *Flow versus pressure in the control of renin release in conscious dogs*. Am J Physiol 273:F200-F205.
- Naruse K, Takii Y, Inagami T. (1981). *Immunohistochemical localization of renin in luteinizing hormone-producing cells of rat pituitary*. Proc Natl Acad Sci USA:78:7579-7583.
- Navar LG, Kobori H, Prieto MC, Gonzalez-Villalobos RA. (2011). *Intratubular renin-angiotensin system in hypertension*. Hypertension 57(3):355–6210.
- Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. (1986). *Arachidonic acid metabolism*. Annu Rev Biochem; 55:69–102.
- Neubauer B, Machura K, Kettl R, Lopez ML, Friebe A, Kurtz A. (2013). *Endothelium-derived nitric oxide supports renin cell recruitment through the nitric oxide-sensitive guanylate cyclase pathway*. Hypertension. 61(2):400-7.
- Neves FA, Duncan KG, Baxter JD. (1996). *Cathepsin B is a prorenin processing enzyme*. Hypertension 27: 514–517.
- Nguyen G. (2011). *Renin, (pro)renin and receptor: an update*. Clin Sci (Lond), 120(5):169–7810.
- Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. (2002). *Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin*. J Clin Invest, 109:1417–27. doi:10.1172/JCI0214276.
- Obermuller, N., Kunchaparty, S., Ellison, D.H. & Bachmann, S. (1996). *Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron*. J Clin Invest 98, 635–640.
- Ortiz-Capisano MC, Ortiz PA, Harding P, Garvin JL, Beierwaltes WH. (2007 c). *Ortiz-Capisano MC, Ortiz PA, HaDecreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase*. Hypertension 49:162-9.

- Pan L, Wang Y, Jones CA, Glenn ST, Baumann H, Gross KW. (2005). *Enhancer-dependent inhibition of mouse renin transcription by inflammatory cytokines*. Am J Physiol Renal Physiol 288: F117–F124.
- Paul M, Poyan M, A, Kreutz R. (2006). *Physiology of local renin-angiotensin systems*. Physiol. Rev; 86(3):747-803.
- Peters J, Farrenkopf R, Clausmeyer S, Zimmer J, Kantachuvesiri S, Sharp MG, Mullins JJ. (2002). *Functional significance of prorenin internalization in the rat heart*. Circ Res 90: 1135–1141.
- Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH. (2004). *Real-Time imaging of renin release in vitro*. Am J Physiol Renal Physiol. Aug; 287(2): F329-35.
- Peti-Peterdi J, Komlosi P, Fuson AL, Guan y, Schneider A, Qi Z, Redha R, Rosivall L, Breyer MD, Bel PD. (2003). *Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells*. J Clin Invest 112:76–82.
- Pfeilschifter J, Kurtz A, Bauer C. (1985). *Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglycerol ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells*. Biochem Biophys Res Commun 127: 903-910.
- Pinet F, Mizrahi J, Laboulandine I, Menard J, Corvol P. (1987). *Regulation of prorenin secretion in cultured human transfected juxtaglomerular cells*. J Clin Invest 80: 724–731.
- Porter JP, Reid IA, Said SI, Ganong WF. (1982). *Stimulation of renin secretion by vasoactive intestinal peptide*. Am J Physiol 243:F306-10.
- Pratt RE, Carleton JE, Richie JP, Heusser C, Dzau VJ. (1987). *Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys*. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7837–7840.
- Prieto MC, Williams DE, Liu L, Kavanagh KL, Mullins JJ, Mitchell KD. (2011). *Enhancement of renin and prorenin receptor in collecting duct of Cyp1a1-Ren2 rats may contribute to development and progression of malignant hypertension*. Am J Physiol Renal Physiol; (2):F581–810.
- Prieto-Carrasquero MC, Kobori H, Ozawa Y, Gutierrez A, Seth D, Navar LG. (2005). *AT1 receptor-mediated enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats*. Am J Physiol Renal Physiol; 289(3):F632–710.
- Rector FC, Jr., Brunner FP, Seldin DW. (1966). *Mechanism of glomerulotubular balance. I. Effect of aortic constriction and elevated ureteropelvic pressure on glomerular filtration rate, fractional*

*reabsorption, transit time, and tubular size in the proximal tubule of the rat.* J Clin Invest, 45(4):590–60210.

Reddi V, Zaglul A, Pentz ES, Gomez RA. (1998). *RedRenin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature.* J Am Soc Nephrol 9:63-71.

Redding KM, Chen BL, Singh A, Re RN, Navar LG, Seth DM. (2010). *Transgenic mice expressing an intracellular fluorescent fusion of angiotensin II demonstrate renal thrombotic microangiopathy and elevated blood pressure.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 298:H1807–18. doi:10.1152/ajpheart.00027.2010.

Rodriguez F, Llinas MT, Gonzalez JD, Rivera J, Salazar FJ. (2000). *Rodriguez F, LlinRenal changes induced by a cyclooxygenase-2 inhibitor during normal and low sodium intake.* Hypertension 36:276-81.

Romeis B. (1989). *Romeis mikroskopische Technik.* München: Urban & Schwarzenberg, 17 Auflage, S. 256-259.

S, Franco V and Oparil. (2006). *Salt sensitivity, a determinant of blood pressure, cardiovascular disease and survival.* J Am Coll Nutr.;25 :247S-255S.

Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. (2013). *Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system.* J Endocrinol, 216(2):R1–1710.

Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C. (2008). *Development of renin expression in the mouse kidney.* Kidney International, 73: 43-51.

Schlatter, E., Salomonsson, M., Persson, A.E. & Greger, R. (1989). *Macula densa cells sense luminal NaCl concentration via furosemide sensitive Na<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup>-K<sup>+</sup> cotransport.* Pflugers Arch 414, 286–290.

Schmidt, Harald. (2007). *Pharmakologie und Toxikologie.* Stuttgart: Schattauer GmbH.

Schnermann J and Briggs. (2012). *Synthesis and secretion of renin in mice with induced genetic mutations.* Kidney Int. 81(6):529-38.

Schnermann J. (1998). *Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion.* Am J Physiol 274:R263–79.

Schricker K, Kurtz A. (1996). *Blockade of nitric oxide formation inhibits the stimulation of the renin system by a low salt intake*. Pflugers Arch 432:187-91.

Schricker, K., and A. Kurtz. (1993). *Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells*. Am. J. Physiol. 265 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 34): F180–F186, 1993.

Schunkert H., Ingel\_nger J.R., Jacob H., Jackson B., Bouyounes H., Dzau V.J. (1992). *Reciprocal feed back regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expression by angiotensin II*. AM J Physiol 263: E863-E869.

Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. (2007). *Renin release*. Physiology, 22: 310-319.

Schweda F, Kurtz A. (2004). *Cellular mechanism of renin release*. Acta Physiol Scand 181:383-90.

Schweda F, Kurtz A. (2011). *Regulation of renin release by local and systemic factors*. Rev Physiol Biochem Pharmacol,161:1-44.

Schweda F, Riegger GA, Kurtz A, Kramer BK. (2000). *Store-operated calcium influx inhibits renin secretion*. Am J Physiol Renal Physiol 279:F170-6.

Schweda F, Segerer F, Castrop H, Schnermann J, Kurtz A. (2005). *Schweda F, SegBlood pressure-dependent inhibition of Renin secretion requires A1 adenosine receptors*. Hypertension 46:780–786.

Schweda. (2014). *Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system*. European Journal of Physiology, 10.1007/s00424-014-1668-y.

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA. (2004). *Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened*. Dev Cell 6: 719–728.

Shi Q, Gross KW, Sigmund CD. (2001). *Retinoic acid-mediated activation of the mouse renin enhancer*. J Biol Chem 276: 3597–3603.

Singh I, Grams M, Wang WH, Yang T, Killen P, Smart A, Schnermann J, Briggs JP. (1996). *Singh I, Grams M, Wang WH, Yang T, KillCoordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt*. Am J Physiol 270:F1027-37.

Skinner SL, McCubbin JW, and Page IH. (1964). *Renal baroreceptor control of acute renin release in normotensive, nephrogenic and neurogenic hypertensive dogs*. Circ Res 15: 522-531.

Skott O, Briggs JP. (1987). *Direct demonstration of macula densa mediated renin secretion*. Science 237:1618–1620.

Slater EE, Defendini R, Zimmerman EA. (1980). *Wide distribution of immunoreactive renin in nerve cells of human brain*. Proc Natl Acad Sci USA,77:5458-5460.

Smith, H, W. (1951). *The Kidney: Structure and Function in Health and Diseases*. USA: Oxford University Press Inc., S. 570.

Stewart DL, Harshfield GA, Zhu H, Hanevold CD. (2015). *Stress and salt sensitivity in primary hypertension*. Curr Hypertens Rep. 17(2):513.

Stichtenoth DO, Marhauer V, Tsikas D, Gutzki FM, Frolich JC. (2005). *Stichtenoth DO, MEffects of specific COX-2-inhibition on renin release and renal and systemic prostanoid synthesis in healthy volunteers*. Kidney Int 68:2197-207.

Tanaka T, Gresik EW, Michelakis AM, Barka T. (1980). *Immunocytochemical localization of renin in kidneys and submandibular glands of SWR/J and C57BL/6J mice*. J Histochem Cytochem; 28: 1113-1118.

Taugner R, Bührle CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R. (1984). *Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms*. Contributions to Nephrology 1984, 43: 76-101.

Taugner R, Buhrlé CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R. (1984). *Morphology of the juxtaglomerular apparatus*. Contr. Nephrol 43:76-101.

Thurau, K. & Schnermann, J. (1965). *The sodium concentration in the macula densa cells as a regulating factor for glomerular filtration (micropuncture experiments)*. Klin Wochenschr 43, 410–413.

Tianxin Yang, Yoshimi Endo, Yuning G Huang, Ann Smart, Josie P Briggs, Jürgen Schnermann. (2000). *Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets*. Am J Physiol Renal Physiol 279: F819–F825.

Todorov V, Muller M, Schweda F, Kurtz A. (2002). *Tumor necrosis factor-alpha inhibits renin gene expression*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283: R1046–R1051.

- Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, Menard J, Schambelan M. (1989). *Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay.* J Clin Invest; 83:679–687.
- Traynor TR, Smart A, Briggs JP, Schnermann J. (1999). *Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2.* Am J Physiol 277:F706-F710.
- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. (1996). *Angiotensin receptors.* J Hypertens. 14:S95-103.
- Vandongen R., Peart W.S., Boyd G.W. (1974). *Effect of angiotensin II and its nonpressor derivatives on renin secretion.* AM J Physiol Feb; 226(2): 277-82.
- Wagner C, Hinder M, Krämer BK, Kurtz A. (1999). *Role of renal nerves in the renin system by reduced renal arterial pressure.* Hypertension 34: 1101-1105.
- Wagner C, Kurtz A. (1998). *Regulation of renal renin release.* Curr Opin Nephrol Hypertens 7: 437-441; 1998.
- Wagner C, Vitzhum H, Castrop H, Schumacher K, Bucher M, Albertin S, Coffman TM, Arendshorst WJ, Kurtz A. (2003). *Differential regulation of renin and Cox-2 expression in the renal cortex of C57Bl/6 mice.* Pflugers Arch- Eur J Physiol 447:214-222.
- Wang JL, Cheng HF, Harris RC. (1999). *Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension.* Hypertension 34:96-101.
- Watkins BE, Davis JO, Lohmeier TE, Freeman RH. (1976). *Intrarenal site of action of calcium on renin secretion in dogs.* Circ Res 39:847-53.
- Wehner R, Gehring W. (2007). *Zoologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 24. Auflage.
- Weihprecht H, Lorenz JN, Schnermann J, Skott O, Briggs JP. (1990). *Effect of adenosine1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus.* J Clin Invest 85:1622–1628.
- Wright, F.S. & Schnermann, J. (1974). *Interference with feedback control of glomerular filtration rate by furosemide, triflocin, and cyanide.* J Clin Invest 53, 1695–1708.
- Yamada, Eichi. (1955). *The fine structure of the renal glomerulus.* Rockefeller University Press, S. 562.

Yang T, Endo Y, Huang YG, Smart A, Briggs JP, Schnermann J. (2000a). *Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets*. Am J Physiol Renal Physiol 279:F819-25.

Yang T, Singh I, Pham H. (1998). *Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake*. Am J Physiol 274:F481–F489.

Yugandhar VG, Clark MA. (2013). *Angiotensin III: a physiological relevant peptide of the renin angiotensin system*. Peptides, 46:26–3210.

Zhuo JL, Imig JD, Hammond TG, Orengo S, Benes E, Navar LG. (2002). *Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT1 receptor*. American Heart Association.

Zhuo JL, Li XC. (2011). *New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II*. Peptides, 32(7):1551–6510.

Zhuo, J, L, Ferrao, FF, M, Zheng, Y, Li, X, C. (2013). *New frontiers in the intrarenal renin-angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms*. Front. Endocrinol.

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Lage der Tubulussegmente: .....	7
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Glomerulus (Abbildung nach Junqueira, 2002) .....	8
Abbildung 1.3: Gefäßarchitektur der Niere (überarbeitete Abbildung nach Dyce et al., 1999).....	10
Abbildung 1.4: Achsen des Renin-Angiotensin-Systems (nach Zhuo et al, 2013) .....	14
Abbildung 2.1: Farbkanaltrennung (Abbildung nach Machura, 2008).....	42
Abbildung 3.1: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von einem Teilstück eines arcuaten Seitenastes einer unbehandelten Wildtyp-Maus . .....	50
Abbildung 3.2: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von zwei afferenten Arteriolen der unbehandelten Wildtyp-Maus. ....	51
Abbildung 3.3: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unbehandelten Wildtyp-Maus. ....	53
Abbildung 3.4: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unbehandelten Wildtyp-Maus. ....	54

Abbildung 3.5: 3D-Rekonstruktion der Renin- und Glattmuskelaktin- Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer mit SC-236 behandelten Wild-Typ-Maus.....	55
Abbildung 3.6: 3D-Rekonstruktion der Renin- und Glattmuskelaktin- Immunoreaktivität von afferenten Arteriolen der mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus .....	56
Abbildung 3.7: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus.....	58
Abbildung 3.8: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer mit SC-236 behandelten Wildtyp-Maus.....	59
Abbildung 3.9: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wild-Typ-Maus.....	60
Abbildung 3.10: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von afferenten Arteriolen einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus.....	61
Abbildung 3.11: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus.. .....	63
Abbildung 3.12: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus. ....	64
Abbildung 3.13: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Level des Wildtyps und der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus.....	65
Abbildung 3.14: Graphische Gegenüberstellung der Plasmanreninkonzentrationen des Wildtyps und der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus.....	66
Abbildung 3.15: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wild-Typ-Maus. ....	67
Abbildung 3.16: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunoreaktivität von afferenten Arteriolen einer unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus.....	68
Abbildung 3.17: Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril behandelten männlichen Wild-typ-Maus.....	69
Abbildung 3.18: Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril behandelten männlichen Wild-typ-Maus.....	70



Abbildung 3.19: Graphische Gegenüberstellung der Renin-mRNA-Level des Wildtyps und der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus; Normierung des Wildtyp-Werts auf eins. ....71

Abbildung 3.20: Graphische Gegenüberstellung der Plasmareninkonzentration des Wildtyps und der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus.....72

Abbildung 3.21: 3D-Rekonstruktion der Renin- und Glattmuskelaktin- Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten weiblichen Wild-Typ-Maus.....73

Abbildung 3.22: 3D-Rekonstruktion der Renin- und Glattmuskelaktin- Immunreaktivität von afferenten Arteriolen einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten weiblichen Wildtyp-Maus.....74

Abbildung 3.23: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalz stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten Wild-Typ- Maus.....76

Abbildung 3.24: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalz stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten Wild-Typ- Maus.....77

Abbildung 3.25: Graphische Gegenüberstellung der Renin-m-RNA-Level des weiblichen Wildtyps der unter Nidrigsalzdiät stehenden weiblichen Wildtyp-Maus und der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus.....78

Abbildung 3.26: Graphische Gegenüberstellung der Plasmareninkonzentrationen des weiblichen Wildtyps, der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus und der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe stehenden weiblichen Wildtyp-Maus.....79

Abbildung 3.27: 3D-Rekonstruktion der Renin- und Glattmuskelaktin- Immunreaktivität eines Teilstücks eines arcuaten Seitenastes einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten männlichen Wild-Typ-Maus.....80

Abbildung 3.28: 3D-Rekonstruktion der Renin- und Glattmuskelaktin- Immunreaktivität von afferenten Arteriolen einer unter Nidrigsalzdiät stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten männlichen Wild-Typ-Maus.....81

Abbildung 3.29: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalz stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten männlichen Wild-Typ- Maus.....82

Abbildung 3.30: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Paraffinschnitten einer unter Nidrigsalz stehenden und mit Enalapril und SC-236 behandelten männlichen Wild-Typ- Maus.....83

Abbildung 3.31: Graphische Gegenüberstellung der Renin-m-RNA-Level des männliche Wildtyps der unter Nidrigsalzdiät stehenden männlichen Wildtyp-Maus und der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus.....84

Abbildung 3.32: Graphische Gegenüberstellung der Plasmareninkonzentrationen des männlichen Wildtyps, der unter Nidrigsalzdiät und Enalaprilgabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus und der unter Nidrigsalzdiät, Enalapril- und SC-236 Gabe stehenden männlichen Wildtyp-Maus.....85

**Abkürzungsverzeichnis:****Chemische und biologische Größen****und Einheiten**

bp	Basenpaare
I.E.	internationale Einheit
M	molar
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)
U	enzymatische Einheit (Unit)

**Physikalische Größen und Einheiten**

°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung (gravity)
g	Gramm
h	Stunde(n)

l	Liter
min	Minute(n)
s	Sekunde(n)
V	Volumen

**Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten**

k	kilo (1x10 <sup>3</sup> )
m	milli (1x10 <sup>-3</sup> )
μ	micro (1x10 <sup>-6</sup> )
n	nano (1x10 <sup>-9</sup> )
p	pico (1x10 <sup>-12</sup> )

<b>3D</b>	dreidimensional
<b>%</b>	Prozent
<b>αSMA</b>	A smooth muscle actin
<b>A.</b>	Arteria
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AC</b>	Adenylatzyklen
<b>ACE</b>	Angiotensin Converting Enzym
<b>ANG</b>	Angiotensin
<b>ANP</b>	Atrial natriuretic peptide
<b>AT-Rezeptoren</b>	Angiotensinrezeptoren
<b>ATP</b>	Adenosintri-phosphat
<b>BAPTA</b>	Ca <sup>2+</sup> -Chelatbildners
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalzium
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat

## Anhang

<b>Calcitonin gene-related peptide</b>	Calcitonin gene-related peptide
<b>cGMP</b>	Cyclisches Guanosinmonophosphat
<b>cGK</b>	cGMP abhängige Protein Kinase
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chlorid
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>cTAL</b>	Dicker aufsteigender Teil der Henleschleife
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ECFP/ANG II</b>	Fusionsproteins
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>eNOS</b>	endotheliale NOS
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HS</b>	Schwefelwasserstoff
<b>iNOS</b>	induzierbare NOS
<b>IRAP</b>	Insulin-regulated aminopeptid
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>JGA</b>	juxtaglomerulärer Apparat
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Kaliumhydrogenphosphat
<b>LS/Ena</b>	Low Salt Enalapril
<b>LS/Ena/SC-236</b>	Low Salt/Enalapril/SC-236
<b>MAP</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NOS</b>	NO-Synthasen
<b>nNOS</b>	neuronale NOS
<b>NPY</b>	Neuropeptide Y
<b>NS</b>	Normal Salt
<b>NS/SC-236</b>	Normal Slat/SC-236
<b>PACAP</b>	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

## Anhang

<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PDE</b>	Phosphodiesterasen
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
<b>PKC</b>	Kalziumabhängige Proteinkinase C
<b>PRR</b>	Proreninrezeptor
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerasekettenreaktion
<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem
<b>Ren</b>	Reningen
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	reverser Transkription
<b>SC-236</b>	selektiver Cyclooxygenase 2 Hemmer
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxy-methyl-) amino-Methan
<b>TRITC</b>	Tetramethylrhodamin
<b>V.</b>	Vena
<b>WT</b>	Wildtyp

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken die mir bei dieser Arbeit geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe des Themas und die Bereitstellung der benötigten Arbeitsmittel und Geräte. Vor allem möchte ich mich für die immerwährende Hilfe in allen Belangen bedanken.

Bei meiner Betreuerin Dr. Katharina Machura möchte ich mich für die fachliche Hilfe und Anleitung bedanken. Besonders für Ihre Geduld und dauernde Hilfestellung über den gesamten Zeitraum der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt dem gesamten Team des Lehrstuhls Physiologie 1 der Universität Regensburg für die unkomplizierte Unterstützung des praktischen Teils dieser Arbeit. Insbesondere bei Dr. Björn Neubauer möchte ich mich für dessen Hilfe in technischen Belangen bedanken.

Nicht zu letzt möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung in allen Lebenslagen und bei dieser Arbeit sowie über das gesamte Studium bedanken. Ohne Sie hätte ich wohl keines von beiden beendet.

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Inhalte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Schwäbisch Hall, den 06.06.2020

Fabian Herrmann